



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS



Degradação de Compostos Aromáticos por Microrganismos Halofílicos e Aplicação destes na Biorremediação da Água de Produção de Petróleo

Maricy Raquel Lindenbah Bonfá

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Regina Durrant

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção de Título de Doutor em
Ciências de Alimentos.

Campinas, Janeiro de 2009.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

B641d Bonfá, Maricy Raquel Lindenbah
Degradação de compostos aromáticos por microrganismos
halofílicos e aplicação destes na biorremediação de água de produção
de petróleo / Maricy Raquel Lindenbah Bonfá. -- Campinas, SP: [s.n.],
2009.

Orientador: Lucia Regina Durrant
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.Faculdade
de Engenharia de Alimentos

1. Biorremediação. 2. Biodegradação. 3. Bactérias halofílicas.
4. PAHs. I. Durrant, Lucia Regina. II. Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Degradation of aromatic compounds by halophilic microorganisms and their
application in bioremediation of water production oil

Palavras-chave em inglês (Keywords): Bioremediation, Biodegradation, Halophilic bacteria,
HPAs

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Lucia Regina Durrant

Márcia Luzia Rizzatto

Fabiana Fantinatti Garboggini

Marta Cristina Teixeira Duarte

Andréa Roberta Clemente

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lucia Regina Durrant
(Orientadora)

Profa. Dra. Márcia Luzia Rizzatto
(Membro)

Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte
(Membro)

Profa. Dra. Fabiana Fantinatti Gaborggini
(Membro)

Andréa Roberta Clemente
(Membro)

Profa. Dra. Eleni Gomes
(Suplente)

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

Profa. Dra. Márcia Freire dos Reis
(Suplente)

*Aos meus pais pelo apoio e
incentivo em todos os
momentos,*
DEDICO

“**Agradecimento.** S.m. 1. Ato ou efeito de agradecer. 2. Gratidão, reconhecimento. 3. Palavras ou fatos com que a gratidão se manifesta.”

Aurélio Buarque de Holanda Ferreira

“...**agradecimento(s)**

Página opcional na qual o autor agradece àqueles que realmente contribuíram de maneira relevante para elaboração do trabalho.”

Normas para Elaboração de Dissertações e Teses 3ª Edição

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus que me deu a vida e a possibilidade de escolher quais caminhos percorrer.

Aos meus pais Sonia e César que me educaram e me deram suporte para que tudo que sou fosse possível acreditaram em mim e sempre me confortaram com suas palavras.

Ao meu irmão em quem muitas vezes me espelhei.

Aos meus queridos avôs que sempre acreditaram em meu potencial e a minha família, tios, primos e primas.

A Profa. Dra. Lucia Regina Durrant que antes mesmo de me conhecer confiou a mim este tão sonhado trabalho e me auxiliou durante o desenvolvimento desta tese, me abriu caminhos e teve um papel muito importante em minha formação profissional e pessoal.

Agradeço também a Profa. Dra. Eleni Gomes a quem também devo minha experiência em pesquisa, incentivo em seguir pelos caminhos científicos e em quem me espelho como profissional.

A Profa. Dra. Fabiana Fantinatti Gaborggini que me auxiliou em experimentos e também na versão final desta tese.

À banca examinadora Profa. Dra. Márcia Luzia Rizzatto, Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte, Profa. Dra. Andrea Roberta Clemente, Profa. Dra. Márcia Freire dos Reis, Profa. Dra. Rose Mary Gondim Tomaz, que me auxiliaram muito nas correções enriquecendo este trabalho.

A FAPESP e a CAPES pelo apoio financeiro e à UNICAMP pela excelente educação pública e de qualidade.

À Profa. Dra. Sara Cuadros Orellana que além da amizade me ajudou desde o princípio deste trabalho e foi companheira nas horas difíceis que passei em meu estágio na Espanha.

Ao Prof. Dr. Antonio Ventosa que me aceitou de braços abertos na Universidade de Sevilha (Espanha) em um dos momentos mais difíceis do meu doutorado, que me ensinou como ser um pesquisador exemplar e uma pessoa maravilhosa ao mesmo tempo.

À Profa. Encarnación Mellado que me orientou na Universidade de Sevilha e me ensinou quase tudo o que sei sobre biologia molecular.

Ao engenheiro químico da Petrobrás Maurício Grimaldi e também à Petrobrás pelas amostras de água de produção de petróleo fornecidas.

Ao Prof. Dr. Francisco Eduardo Rodríguez Valera pela orientação na Universidade de Alicante, Espanha.

Às minhas queridas amigas Renata, Giovanna, Primacy, Flávia, Livia, Francine, Verônica, Luciana e Aynara que tiveram muita paciência em meus momentos de estresse.

Aos meus queridos amigos de graduação Luciane, Renato, Gustavo e Vitor, que mesmo distante sempre estiveram em meu pensamento.

Aos amigos do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, Isis, Cristiano, Andréia, Kethlen, Eli, Fábio, Eder, Beto, Cristina e Fernanda.

Aos meus amigos do curso de Especialização em Engenharia Ambiental da FEQ, Camille, Otávio e Rafa que tornaram as árduas aulas de sábado muito mais divertidas.

Aos meus amigos do Laboratório de Halófilos da Universidade de Sevilha, Lourdes, Rafa, Cristina Fernandez, Cristina Sanchez, Mercedes, Javi, Montse, Inma, Sara e Virginia.

Aos meus companheiros e amigos de trabalho da Tetra Pak Daniela, Fernanda, Tiago, Ana, Sérgio, Seba, Márcio e Luiz. Aos amigos Denise, Ronaldo, Roberto, Fernando, Miltinho e Tiago que alegraram minhas poucas horas livres durante a escrita desta tese.

Enfim a todos que eu possa ter esquecido de mencionar e que de alguma forma fizeram parte deste trabalho e da minha vida.

**“Há mais pessoas que desistem do
que pessoas que fracassam.”**

Henry Ford

**“Embora ninguém possa voltar
atrás e fazer um novo começo....
todos podem começar agora e
escrever um novo final.”**

Francisco Cândido Xavier

**“No llores porque ya se
terminó... sonríe, porque
sucedió.”**

Gabriel García Márquez

Índice Geral

Índice Geral	xi
Índice de figuras.....	xiv
Índice de tabelas.....	xvi
Abreviações	xvii
Resumo.....	19
Abstract	21
1 Introdução	23
2 Revisão Bibliográfica	25
2.1 <i>Microrganismos halofílicos</i>	25
2.2 Bactérias Halofílicas	25
2.3 Arquéias.....	27
2.4 Arquéias halofílicas.....	28
2.5 Ambientes extremos: hipersalinos	30
2.6 Potencial de aplicação na indústria biotecnológica.....	33
2.7 Hidrocarbonatos aromáticos policíclicos.....	34
2.8 Ocorrência de compostos aromáticos em ambientes hipersalinos	35
2.9 Metabolismo de compostos aromáticos.....	36
2.9.1 Biossurfactantes	36
2.9.2 Mecanismo de clivagem de anéis por dioxigenases	37
2.10 Biodegradação de composto aromáticos.....	40
2.11 Biorremediação de água de produção de petróleo	42
2.12 Estudos moleculares de degradação de compostos aromáticos por microrganismos halofílicos.....	44
2.13 <i>Referências Bibliográficas</i>	46
3 Objetivos	55
3.1 <i>Objetivo geral</i>	55
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	55
4 Degradação de compostos aromáticos por haloarquéias	57
4.1 <i>Introdução</i>	57
4.2 <i>Material e metodologia</i>	58
4.2.1 <i>Linhagens utilizadas</i>	58
4.2.2 <i>Condições de cultivo e preservação</i>	59
4.2.3 <i>Enriquecimento para isolamento de linhagens de haloarquéias de salinas brasileiras</i>	59
4.2.4 <i>Microscopia</i>	60
4.2.5 <i>Crescimento das linhagens em compostos monoaromáticos com adição de extrato de levedura</i>	61

4.2.6	Crescimento das linhagens em compostos monoaromáticos como única fonte de carbono	62
4.2.7	Degradação de compostos monoaromáticos.....	63
4.2.8	Crescimento das linhagens de haloarquérias em hidrocarbonetos aromáticos policíclicos com adição de extrato de levedura	64
4.2.9	Crescimento das linhagens de haloarquérias em hidrocarbonetos aromáticos policíclicos como única fonte de carbono	64
4.2.10	Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	65
4.2.11	Identificação das linhagens de haloarquérias	66
4.2.11.1	Extração de DNA	66
4.2.11.2	Eletroforese de DNA em géis de agarose.....	68
4.2.11.3	Amplificação do Gene que codifica o fragmento 16S do RNAr nas linhagens estudadas	68
4.2.11.4	Sequenciamento do produto de PCR	69
4.2.11.5	Comparação das sequências de DNA com o banco de dados	69
4.2.11.6	Construção das árvores filogenéticas	69
4.2.12	Amplificação dos genes de catabólicos em haloarquérias por PCR	69
4.3	Resultados e discussão	71
4.3.1	Enriquecimento para isolamento de linhagens de haloarquérias de salinas brasileiras.....	71
4.3.2	Crescimento das linhagens de haloarquérias em compostos monoaromáticos com adição ou não de extrato de levedura	72
4.3.2	Degradação de ácidos monoaromáticos.....	74
4.3.4	Crescimento das linhagens de haloarquérias em compostos aromáticos policíclicos com adição ou não de extrato de levedura	78
4.3.5	Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	81
4.3.6	Identificação através da amplificação do fragmento 16S do RNAr das linhagens de haloarquérias	86
4.3.7	Amplificação dos genes de dioxigenases das haloarquérias por PCR	90
4.4	Conclusões	93
4.5	Referências Bibliográficas	95
5	Degradação de fenol por bactérias halofílicas	101
5.1	Introdução.....	101
5.2	Material e metodologia.....	102
5.2.1	Linhagens utilizadas	102
5.2.2	Condições de cultivo e preservação	102
5.2.3	Isolamento de microrganismos de outros ambientes salinos.....	103
5.2.4	Isolamento de microrganismos halofílicos presentes em água de produção de petróleo	103
5.2.5	Identificação das linhagens de bactérias halofílicas isoladas	104
5.2.6	Crescimento de bactérias halofílicas em fenol.....	104
5.2.7	Degradação de fenol por bactérias halofílicas	105
5.2.8	Produção de biossurfactantes por bactérias halofílicas	105
5.2.4	Identificação das linhagens de bactérias halofílicas	106
5.2.5	Amplificação de genes catabólicos em bactérias halofílicas.....	106
5.2.5.1	Clonagem de fragmentos de PCR	106
5.3	Resultados e discussão	107
5.3.1	Isolamento de microrganismos de outros ambientes salinos.....	107
5.3.2	Identificação das bactérias halofílicas isoladas.....	107
5.3.3	Crescimento de bactérias halofílicas em fenol.....	109

5.3.4	<i>Degradação de fenol por bactérias halofílicas</i>	111
5.3.5	<i>Produção de biossurfactantes por bactérias halofílicas</i>	115
5.3.6	<i>Amplificação de genes catabólicos</i>	117
5.3.7	<i>Clonagem de fragmentos de PCR de Halomonas organivorans</i>	118
5.4	<i>Conclusões</i>	121
5.5	<i>Referências Bibliográficas</i>	122
6	<i>Biorremediação da água de produção de petróleo por microrganismos halofílicos</i>	125
6.1	<i>Introdução</i>	125
6.2	<i>Material e metodologia</i>	126
6.2.1	<i>Biorremediação da água produzida em extração de petróleo por haloarquéias</i>	126
6.2.2	<i>Análise da demanda química de oxigênio</i>	126
6.2.3	<i>Biorremediação da água produzida em extração de petróleo por bactérias halofílicas e consórcios microbianos</i>	127
6.2.4	<i>Produção de Biossurfactantes em Água Produzida na Extração de Petróleo</i>	127
6.3	<i>Resultados e discussão</i>	128
6.3.1	<i>Biorremediação da água produzida em extração de petróleo por haloarquéias</i>	128
6.3.2	<i>Biorremediação da água produzida em extração de petróleo por bactérias halofílicas e consórcios microbianos</i>	130
6.3.3	<i>Produção de Biossurfactantes em Água Produzida na Extração de Petróleo</i>	132
6.4	<i>Conclusões</i>	134
6.5	<i>Referências bibliográficas</i>	135
7	<i>Conclusões gerais</i>	136

Índice de figuras

2 Revisão bibliográfica

Figura 2.1:	Exemplos de HAP	34
Figura 2.2:	Rotas de degradação do fenol e protocatecuato	38
Figura 2.3:	Rota de degradação do gentisato	38

4 Degradação de compostos aromáticos por haloarquérias

Figura 4.1:	Salinas de Nossa Senhora do Socoro-SE	71
Figura 4.2:	Crescimento da linhagem BO6 em ácidos aromáticos	73
Figura 4.3:	Crescimento da linhagem AA31 em ácidos aromáticos	73
Figura 4.4:	Crescimento da linhagem AA35 em ácidos aromáticos	73
Figura 4.5:	Crescimento da linhagem AA41 em ácidos aromáticos	73
Figura 4.6:	Degradação do ácido p-hidroxibenzóico	76
Figura 4.7:	Degradação do ácido benzóico	77
Figura 4.8:	Degradação do ácido salicílico	77
Figura 4.9:	Crescimento da linhagem BO7 em HPAs	80
Figura 4.10:	Crescimento da linhagem PR13 em HPAs	80
Figura 4.11:	Crescimento da linhagem MM17 em HPAs	80
Figura 4.12:	Crescimento da linhagem MM27 em HPAs	80
Figura 4.13:	Crescimento da linhagem <i>H. volcanii</i> em HPAs	81
Figura 4.14:	Degradação do naftaleno	84
Figura 4.15:	Degradação do fenantreno	84
Figura 4.16:	Degradação do antraceno	85
Figura 4.17:	Degradação do pireno	85
Figura 4.18:	Degradação do 1,2-benzoantraceno	86
Figura 4.19:	Árvore filogenética das linhagens de haloarquérias da coleção de culturas do LSFM	86
Figura 4.20:	Gel de eletroforese contendo a reação de PCR para o 16S da haloarquéia AR71	89
Figura 4.21:	Árvore filogenética da linhagem de haloarquéia AR71	90
Figura 4.22:	Gel de agarose com os produtos de PCR utilizando os <i>primers</i> para gentisato 1,2 dioxigenase (banda de 834 pb)	91

5 Degradação de fenol por bactérias halofílicas

Figura 5.1:	Crescimento de microrganismos halofílicos isolados de amostras de Huelva-Espanha	107
Figura 5.2:	Amplificação do gene 16 S das linhagens de bactérias halofílicas	108
Figura 5.3:	Árvore filogenética das linhagens de bactérias halofílicas	109
Figura 5.4:	Crescimento das bactérias halofílicas em fenol	110
Figura 5.5:	Cromatogramas demonstrando a degradação do fenol	112

Figura 5.6:	Crescimento da bactéria <i>M. tunisiensis</i> enquanto degrada o fenol	113
Figura 5.7:	Crescimento da bactéria <i>A. aquaeolei</i> enquanto degrada o fenol	113
Figura 5.8:	Crescimento da bactéria <i>H. organivorans</i> enquanto degrada o fenol	114
Figura 5.9:	Amplificação dos genes que das dioxigenases	118
Figura 5.10:	Gel de eletroforese dos clones dos genes de catecol 1,2 dioxigenase e protocatecuato 3,4 dioxigenase	119

6 Biorremediação da água de produção de petróleo por microrganismos halofílicos

Figura 6.1:	Eficiência da redução da DQO em efluente esterilizado ou bruto por linhagens de haloarquéias e outros tratamentos	129
Figura 6.2:	Eficiência da redução da DQO em efluente bruto ou esterilizado por linhagens de bactérias halofílicas, consórcios microbianos e outros tratamentos	131

Índice de tabelas

2 Revisão bibliográfica

Tabela 2.1:	Principais dioxigenases de clivagem de anéis	39
--------------------	--	----

4 Degradação de compostos aromáticos por haloarquéias

Tabela 4.1:	Avaliação visual do crescimento das linhagens	62
Tabela 4.2:	Tempo de retenção dos ácidos aromáticos analisados por CLAE	63
Tabela 4.3:	Tempo de retenção dos padrões de HPAs	66
Tabela 4.4:	Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de genes responsáveis pela degradação de compostos aromáticos	70
Tabela 4.5:	Relação de linhagens isoladas de salinas brasileiras	71
Tabela 4.6:	Crescimento de haloarquéias em ácidos aromáticos	72
Tabela 4.7:	Degradação dos ácidos aromáticos p-hidroxibenzóico, benzóico e salicílico, pelas	76
Tabela 4.8:	Crescimento das linhagens em meio contendo HPAs	79
Tabela 4.9:	Porcentagem de degradação de HPAs das linhagens em meios contendo extrato de levedura	81

5 Degradação de fenol por bactérias halofílicas

Tabela 5.1:	Crescimento das bactérias halofílicas em fenol como única fonte de carbono e energia	110
Tabela 5.2:	Porcentagem de degradação do fenol pelas bactérias halofílicas	111
Tabela 5.3:	Medida de tensão superficial, emulsificação e formação de halo em cultivos de bactérias halofílicas	116
Tabela 5.4:	Resultado do BLAST realizado a partir da sequência clonada do gene de catecol 1,2 dioxigenase	119
Tabela 5.5:	Resultado do BLAST realizado a partir da sequência clonada do gene de Protocatecuato 3,4 dioxigenase	120

6 Biorremediação da água de produção de petróleo por microrganismos halofílicos

Tabela 6.1:	Redução da DQO pelas linhagens de haloarquéias em meio bruto ou esterilizado	128
Tabela 6.2:	Redução da DQO pelas linhagens de bactérias halofílicas, consórcios e outros tratamentos em meio bruto ou esterilizado	130
Tabela 6.3:	Tensão superficial, emulsificação e formação de halo da bactérias halofílicas crescidas em água de produção individualmente ou em consórcios microbianos	133

Abreviações

1,2 CTD	catecol 1,2 dioxigenase
3,4 PCD	protocatecuato 3,4 dioxigenase
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
DNA	ácido desoxiribonucleico
dNTP	desoxinucleotídeos
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
HAP	hidrocarboneto aromático policíclico
LSFM	Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana
PCR	reação em cadeia da polimerase
RNA	ácido ribonucleico
RNAr	RNA ribossômico
TAE	tris-acetato-EDTA
TE	tris-HCl-EDTA

Resumo

Os microrganismos halofílicos são aqueles capazes de viver em ambientes salinos. Dentre eles encontram-se, por exemplo, as bactérias halofílicas e as haloarquéias. Estas duas classes de organismos foram o objeto de estudo deste projeto. Estes microrganismos foram testados quanto à habilidade de degradação de compostos monoaromáticos e poliaromáticos. A capacidade de degradação destes compostos por microrganismos halofílicos é de extrema importância já que ambientes salinos estão sujeitos a contaminações por compostos tóxicos, além de muitos efluentes industriais, como por exemplo, a água de produção de petróleo, possuir alta salinidade. As linhagens de haloarquéias testadas apresentaram a capacidade de crescer e degradar ácidos aromáticos como única fonte de carbono e energia. A degradação foi menor em presença de 0,05% de extrato de levedura. Estas mesmas linhagens também apresentaram a capacidade de degradar HAP em presença de 0,05% de extrato de levedura. Foram utilizados *primers* para a amplificação de genes que sintetizam catecol 1,2-dioxigenase, protocatecuato 3,4-dioxigenase e gentisato 1,2-dioxigenase. Somente a linhagem *Halococcus morhuaea* apresentou o gene da gentisato 1,2-dioxigenase. As haloarquéias estudadas foram identificadas através da amplificação e sequenciamento do gene RNAr 16S e foram identificadas como pertencentes ao gênero *Haloferax*. Foram isoladas 7 linhagens de haloarquéias a partir de coletas realizadas no Brasil (Nossa Senhora do Socorro-SE e Arraial do Cabo-RJ), uma delas foi identificada como *Halosarcina pallida*. Duas linhagens de bactérias halofílicas foram isoladas em meio contendo 3 mM de fenol como única fonte de carbono e energia, a linhagem HU que foi isolada de uma região salina contaminada em Huelva-Espanha e outra linhagem AP isolada a partir de água de produção de petróleo (Petrobrás/São Sebastião-SP). Estas foram identificadas como *Modicisalibacter tunisiensis* e *Arhodomonas aquaeolei*, respectivamente. As

duas linhagens, além de *Halomonas organivorans* demonstraram a capacidade de degradar fenol. *Monodicalibacter tunisiensis* degradou 3 mM de fenol após 72 horas. Nas três linhagens foram encontrados os genes de degradação das enzimas catecol 1,2-dioxigenase e protocatecuato 3,4-dioxigenase. Todas as linhagens de haloarquéias e bactérias halofílicas foram utilizadas para a biorremediação da água de produção de petróleo e reduziram a DQO deste efluente. A linhagem AA31 promoveu a maior redução da DQO do efluente bruto (87,47%) dentre as haloarquéias. Já entre as bactérias *H. organivorans* promoveu a maior redução da DQO deste efluente (89,5%). Estes resultados demonstram o grande potencial de degradação de compostos aromáticos pelas linhagens estudadas, assim como para a biorremediação da água de produção de petróleo.

Abstract

The halophilic microorganisms are those able to live in saline environments. Among them are, for example, halophilic bacteria and haloarchaea. These two classes of organisms have been the aim of study of this Project. These microorganisms were tested for their ability to degrade monoaromatic and polyaromatic compounds. The capacity of degradation of these compounds by halophilic microorganisms is extremely important because saline environments are subject to contamination by toxic compounds, and many industrial effluents, such as the wastewater of oil production have high salinity. The strains of haloarchaea tested here were able to grow and degrade aromatic acids as sole source of carbon and energy. There was a decrease in the degradation when 0.05% of yeast extract was added. These same strains were also able to degrade PAHs in the presence of 0.05% of yeast extract. Primers were used for the amplification of genes that synthesize catechol 1,2-dioxygenase, protocatechuate 3,4-dioxygenase and gentisate 1,2-dioxygenase. *Halococcus morhuaea* was the only strain showing the gene for gentisate 1,2-dioxygenase. The haloarchaea strains were identified by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene and were identified as belonging to the genus *Haloferax*. Seven haloarchaea strains were isolated from samples collected in Brazil (Nossa Senhora do Socorro-SE and Arraial do Cabo-RJ), one of them was identified as *Halosarcina pallida*. Two halophilic bacterial strains were isolated in medium containing 3 mM phenol as the sole source of carbon and energy, strain HU, which was isolated from a contaminated region of salt marsh in Huelva, Spain and strain AP isolated from wastewater from oil production (Petrobrás / São Sebastião-SP). These two strains were identified as *Modicisalibacter tunisiensis* and *Arhodomonas aquaeolei*, respectively. The two strains and *Halomonas organivorans* demonstrated the ability to degrade phenol. HU degraded 3 mM of phenol after 72 hours. These three strains have the genes for the enzyme catechol 1,2-dioxygenase and protocatechuate 3,4-dioxygenase. All the halophilic bacteria and

haloarchaea strains were used for bioremediation of water from oil production and reduced the COD of effluent. Among the haloarchaea, strain AA31 promoted the highest reduction of COD present in the natural effluent (87.47%). Among the bacteria *H. organivorans* promoted the highest reduction of COD of the effluent (89.5%). These results demonstrate the great potential for degradation of aromatic compounds by the strains studied, as well as for the bioremediation of water produced during oil production.

1 Introdução

O desenvolvimento industrial acelerado e a utilização de novos processos e a síntese de moléculas sintéticas, tais como compostos aromáticos, têm aumentado a contaminação ambiental a nível global. Estes freqüentemente contaminam ambientes hipersalinos, como lagoas, solos, lagoas próximas a estuários de rios e ambientes marinhos, através de vazamento de combustível extraído de tanques subterrâneos, derramamentos acidentais, água residuária da atividade de extração de petróleo ou atividade biogênica, como por exemplo, a degradação natural de compostos lignocelulósicos.

A água residuária da extração de petróleo é altamente salina e contém uma mistura complexa de hidrocarbonetos, muitos dos quais são altamente tóxicos. Nas proximidades dos poços de extração de petróleo, o solo pode ser contaminado por este efluente, tornando-se um ambiente propício para o desenvolvimento de organismos halófilos, o mesmo ocorrendo com as lagoas de descarte dessas águas.

Com o aumento da preocupação em preservar o meio ambiente, as tecnologias voltadas para a recuperação e despoluição de áreas degradadas tem ganhado atenção. A biorremediação tem sido utilizada como método de biodegradação natural através da otimização de processos biológicos e esse método tem mostrado ser econômico, versátil e o que mais se aproxima 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 desenvolvimento e otimização de processos de biorremediação nestes ambientes contaminados por compostos aromáticos é de grande relevância. Para isso são necessários microrganismos capazes de sobreviver em tais condições além, de

possuírem um potencial de biodegradação, isso por que, tentativas de utilizar microrganismos mesofílicos na biorremediação de ambientes com alta concentração de sais não foram bem sucedidas. No entanto, quando foram utilizados microrganismos halofílicos ou halotolerantes esses foram capazes de degradar *n*-alcano e hidrocarbonetos aromáticos em presença de altas concentrações de sais.

Um dos grupos de arqueias interessantes é o das halofílicas (ordem Halobacteriales), por serem facilmente cultivadas, de fácil manipulação genética e por possuírem uma versatilidade metabólica relativamente alta, quando comparadas com outros grupos de microrganismos extremofílicos (termofílicos, metanogênicos, redutores de enxofre). Além disso, os microrganismos halofílicos produzem enzimas estáveis, capazes de atuar em altas concentrações de salinidade sem precipitarem ou desnaturarem.

A habilidade destes microrganismos para oxidar hidrocarbonetos na presença de sal é utilizada para o tratamento biológico de ecossistemas salinos contaminados com produtos de petróleo. Muitos casos de sucesso de biorremediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos têm sido reportados usando halofílicos em ambientes marinhos, no Ártico e na Antártida, em fluidos ricos em sais, em pântanos salinos na Lousiana, em reatores de biofilme e em água salina contaminada com compostos fenólicos.

Recentemente o potencial biotecnológico das arqueias halofílicas começou ser considerado no âmbito ambiental, no entanto, pouco se sabe sobre o seu metabolismo frente a compostos aromáticos e sobre o seu sistema enzimático. O isolamento de linhagens capazes de metabolizar compostos aromáticos e a caracterização dos seus metabólicos intermediários será uma importante contribuição para o desenvolvimento de novas biotecnologias envolvendo esses microrganismos.

Desse modo, foi proposto um projeto no qual linhagens de microrganismos halofílicos foram utilizados para degradar compostos aromáticos tóxicos e efluentes da indústria petrolífera.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Microrganismos halofílicos

Os microrganismos especializados em viver em ambientes salinos são denominados halofílicos, enquanto aqueles capazes de crescer melhor em ausência de sal, mas que toleram concentrações elevadas são conhecidos como halotolerantes (KUSHNER, 1978).

Nos habitats hipersalinos coexistem uma grande variedade de seres vivos, dentre os quais estão descritos alguns organismos superiores, como o crustáceo *Artemia salina*, larvas de mosca do gênero *Ephydra* e alguns eucariotos flagelados fotossintéticos pertencentes ao gênero *Dunaliella* e *Asteromonas*, diatomáceas e um heterogêneo grupo de procariotas (Archaea e Bacteria) (RODRÍGUEZ-VALERA et al., 1985; RODRÍGUEZ-VALERA, 1988; GRANT et al., 1989; VENTOSA et al., 1998; OREN, 2002; VENTOSA, 2006). A diversidade presente nestes ambientes hipersalinos varia em função de vários parâmetros como a salinidade, a composição iônica, o pH, a temperatura e a solubilidade do oxigênio (RODRÍGUEZ-VALERA, 1988; JAVOR, 1989; OREN, 1993).

2.2 Bactérias Halofílicas

As bactérias halofílicas são um grupo de microrganismos versátil que sobrevive a altas concentrações de sal e, além disso, são adaptados à vida em baixas escalas de salinidade (VENTOSA et al., 1998).

Para Kamecura (1998), as bactérias halofílicas são um grupo de microrganismos bem definidos que crescem em ambientes com uma concentração de sais entre 2,5 a 5,2 M de NaCl. As bactérias halofílicas moderadas apresentam um crescimento ótimo em meios que contêm entre 0,5 e

2,5 M (aprox. 3-15%) de NaCl (KUSHNER; KAMECURA, 1988; VENTOSA et al., 1998). Alguns são capazes de crescer em uma faixa de salinidade muito maior, chegando inclusive a 4 M (aprox. 25%) de NaCl. Esta necessidade e tolerância variam de acordo com as condições de crescimento, com a temperatura e a composição do meio de cultivo (RENGEL, 2006).

A bactéria *Salinibacter*, é a única bactéria até hoje encontrada em ambientes extremamente halofílicos, e é capaz de viver em ambientes com salinidade superior a 3 M de NaCl (RODRÍGUEZ-VALERA, 1988; BENLLOCH et al., 2002; VENTOSA, 2006).

Salinibacter ruber é a única espécie conhecida que vive em cristalizadores de salinas. Este gênero compartilha com *Halobacterium* o uso de K⁺ como um soluto compatível, uma característica raramente encontrada entre os halofílicos do domínio *Bacteria* (a maioria das bactérias halofílicas sintetiza ou acumula solutos orgânicos para manter o balanço hídrico celular). Em contraste com o altamente hidrolítico *Rhodothermus*, a *Salinibacter* cresce melhor em presença de aminoácidos doadores de elétron, similar a *Halobacterium*. Assim, embora filogeneticamente único, percebe-se que *Halobacterium* e *Salinibacter* são um caso de convergência, na qual estratégias fisiológicas são convergidas ao longo de um mesmo padrão, provavelmente pela demanda do ambiente extremo que estes microrganismos compartilham (MADIGAN; MARTINKO, 2006).

Por muitos anos a taxonomia das bactérias halofílicas foi bastante confusa, por um lado porque a classificação não era baseada no sistema de DNA ribossomal e sim por um sistema baseado apenas em dados morfológicos e bioquímicos e por outro, por que as espécies encontradas adentravam ao gênero dos *Halobacterium*, pertencentes ao *Dominio Bacteria*.

2.3 Arquéias

A ascensão de *Archaea* como um novo domínio, foi consequência da recente elevação no modo de classificar os organismos. A este grupo pertencem procariotos não mais incluídos dentre as bactérias. O equivalente foi realizado para *Eukarya* (eucariotos) e *Bacteria*, dividindo então os organismos em três domínios ou linhas de descendência (DYALL-SMITH; DANSON, 2001; CUADROS-ORELLANA, 2003). Este fato se deve à criação de uma árvore filogenética universal da vida com base na comparação de seqüências do RNAr 16 S e 18 S (WOESE et al., 1990).

O domínio *Archaea* está subdividido em três reinos – Euryarchaeota, Crenarchaeota e Korarchaeota. Todas as espécies de Crenarchaeota e Korarchaeota são termofílicos, as Euryarchaeota compreendem os halofílicos, os redutores de sulfeto e enxofre, termofílicos heterotróficos e metanogênicos (DYALL-SMITH; DANSON, 2001). Entretanto, estudos moleculares e filogenéticos indicam que *Archaea* pode ser ainda mais diverso (BINTRIM, et al., 1997).

As arquéias são procariotos, se assemelhando às eubactérias somente quando observadas por meio de microscópio. Porém, existem diferenças em sua composição química que claramente as distinguem das bactérias, como por exemplo, a ausência de ácido murâmico ou D-aminoácidos em sua parede celular (PELCZAR et al., 1996). Seus lipídeos são do tipo isoprenóide, como os diéters de glicerol ou os tetraéters de glicerol. Geralmente os antibióticos inibidores de síntese protéica, como cloranfenicol ou tetraciclina, não atuam nas células das arquéias. A partir dessas características, tem-se inferido que arquéias estariam numa posição filogenética intermediária entre bactérias e eucariotos (KÖNIG; STETTER, 1989).

2.4 Arquéias halofílicas

As arquéias halofílicas ou haloarquéias são filogeneticamente distintas de bactérias e eucariotos, e são classificadas dentro do *Domínio Archaea*. Elas exibem características de arquéias, incluindo a transcrição de DNA e tradução de proteínas de eucariotos assim como seus lipídeos, e algumas características como a parede celular composta de glicoproteínas semelhante às de bactérias (JOO; KIM, 2004).

Esses organismos pertencem à família Halobacteriaceae e são capazes de sobreviver bem em altas concentrações de cloreto de sódio e outros sais. A taxonomia desses microrganismos é baseada principalmente em dados de sequência de RNAr 16 S, porém a maior parte da evidência para a divisão desses organismos resulta da combinação entre a hibridização de ácidos nucleicos e a análise de lipídeos polares de membrana. Estes organismos vivem em ambientes hipersalinos, como o Mar Morto, lagoas hipersalinas naturais e lagoas de cristalização, além destes locais, podem ser encontrados em produtos protéicos (peixes e couros) salgados com sal marinho, causando sua deterioração (GRANT; LARSEN, 1989).

Segundo Rodríguez e colaboradores (1998) a característica primária deste grupo é a necessidade de no mínimo 1,5 M de NaCl. Estes organismos acumulam K⁺ intracelularmente para osmoregulação, requerem adaptações de proteínas intracelulares e de membranas para manter suas atividades e sua estabilidade em 4 M de KCl ou 5 M de NaCl, esta concentração equivale a aproximadamente quatro vezes a salinidade da água do mar (MARHUENDA-EGEA; BONETE, 2002). Porém, o ambiente das haloarquéias não é caracterizado somente por altas concentrações de sal, mas também por altos níveis de luz solar e o perigo de dessecação (SOPPA, 2005)

A morfologia celular das haloarquéias é bastante diversificada, variando de bastonetes a formas geométricas incomuns, como quadrados ou triângulos, encontrados em algumas espécies do

gênero *Haloarcula*. Além disso, a morfologia pode variar de acordo com as condições de cultivo (GRANT; LARSEN, 1989).

As haloarquéias não possuem parede celular rígida, com exceção dos halococos. São Gram negativas, seu envoltório celular é composto por uma membrana plasmática, uma camada superficial, denominada camada S, composta por glicoproteínas ancoradas à membrana plasmática, de forma a deixar espaços que funcionam como um espaço periplasmático. Estas glicoproteínas consistem de 22 a 24 dissacarídeos (glicose-galactose), as proteínas contêm alta proporção de aminoácidos como ácido aspartâmico e glutâmico, e sais de sódio que associados são essenciais para manter a estrutura celular e diluídos conduzem para uma repulsão entre os grupos carboxílicos livres, levando a desintegração da parede e lise da célula. Este mecanismo pode ser também desencadeado em baixas concentrações de sal quando a morfologia celular sofre distorções (EINSENBERG et al., 1992; BULLOCK, 2000).

Vias de regra são quimiorganotróficos e crescem em meio complexo contendo peptona e extrato de levedura (OCHSENREITER et al., 2002). A maioria delas são aeróbias obrigatórias, embora algumas espécies de *Halobacterium* possam gerar ATP por fotofosforilação através do pigmento bacteriorodopsina, um pigmento púrpuro que se comporta como uma bomba de prótons em presença de luz, podendo gerar energia suficiente para aumentar os níveis de ATP quando há limitações de oxigênio (GRANT; LARSEN, 1989). Outros pigmentos carotenóides podem estar presentes, como bacterioruberina, que proporcionam coloração avermelhada à membrana celular e aos ambientes que colonizam (OREN, 2002).

As proteínas de haloarquéias são resistentes a altas concentrações de sal (halotolerantes) ou precisam de sal para sua atividade (halofílicas). Por exemplo, um grupo de proteínas que possuem uma razão elevada de aminoácidos ácidos para aminoácidos básicos, é um provável caráter

necessário para atividade em alta salinidade, uma característica compartilhada também com algumas bactérias halofílicas. A superfície com carga negativa é importante para solvatação dessas proteínas, e para prevenir a desnaturação, agregação e precipitação que geralmente são os resultados de uma proteína não halofílica exposta a altas concentrações de sal (DASSARMA; ARORA, 2001; DYALL-SMITH; DANSON, 2001).

Segundo DasSarma e Arora (2001) haloarquérias são consideradas um grupo com grande potencial para aplicações biotecnológicas. Muitas formações geológicas como reservas de petróleo estão associados a salinas, por isso haloarquérias podem ser utilizadas para biorremediação de ambientes hipersalinos e desertos contaminados (DYALL-SMITH; DANSON, 2001). A capacidade destes microrganismos para sobreviver em ambientes extremos naturalmente, tais como efluentes industriais e na água produzida associada a atividades de extração de petróleo, suportando extremos de pH, temperatura e salinidade, torna as haloarquérias especialmente interessantes para a degradação de poluentes tóxicos (WOOLARD; IRVINE, 1995; KARCHER et al., 2001).

Os mecanismos moleculares para adaptação a ambientes hipersalinos estão sendo estudados, sendo que os genes envolvidos na síntese e acumulação de solutos compatíveis e outras regulações têm sido foco de investigações recentes a partir do desenvolvimento de ferramentas genéticas e análises bioquímicas (DASSARMA; ARORA, 2001).

2.5 Ambientes extremos: hipersalinos

Ward e Brock (1978) definiram ambientes hipersalinos extremos como “ambientes nos quais existe uma baixa diversidade de espécies e que estão ausentes alguns grupos taxonômicos”. Entretanto, estudos realizados nos últimos anos revelam que estes microrganismos extremofílicos não são encontrados de maneira tão reduzida como se pensava no início (RENGEL, 2006). Muitos

trabalhos realizados até o momento corroboram este fato (OREN, 1993; OREN, 2002; VENTOSA et al., 1998; BENLLOCH et al., 2002; VENTOSA, 2006).

Os ambientes hipersalinos constituem um exemplo característico de habitats extremos. Estes compreendem tanto solos quanto ambientes aquáticos, os quais possuem uma alta concentração de íons, elevadas ou baixas temperaturas, baixas concentrações de nutrientes e oxigênio (JAVOR, 1989).

Habitats hipersalinos são comuns em todo planeta, porém ambientes extremamente hipersalinos são bastante raros. Muitos destes ambientes estão localizados em áreas quentes e áridas. Os lagos salinos podem variar na composição iônica, sendo que esta depende de diversos fatores como a topografia circundante, geologia e clima (MADIGAN; MARTINKO, 2006).

Os cristalizadores solares de salinas representam um modelo de meio hipersalino saturado. As lagoas costeiras concentram a água do mar por evaporação, levando a precipitação do NaCl. Isto ocorre a uma concentração de cerca de dez vezes a da água do mar (aprox. 35% de sais dissolvidos). Esse processo é de interesse na indústria de produção de sal marinho para consumo humano, mas possui também dimensões geológicas e ecológicas de primeira magnitude (RENGEL, 2006).

O cristalizador é um modelo heterotrófico onde a energia deriva da oxidação de uma série de compostos orgânicos acumulados pela biomassa da alga *Dunaliella* em estágios prévios de concentração de sal. De fato, este sistema é um modelo simplificado de sistemas muito mais complexos, como o solo, o oceano profundo ou os sedimentos de meios aquáticos, que funcionam também fechando o ciclo do carbono com a degradação heterotrófica de toda a biomassa acumulada fotossinteticamente. Portanto, poderia ter uma importância chave na compreensão destes sistemas, que por sua vez são a chave da ecologia do planeta.

A precipitação de sal marinho é um dos poucos processos que deram origem às rochas sedimentares de halita (sal gema), um dos minerais mais comuns. As salinas, por sua vez, proporcionam um nicho ecológico de grande importância e extensão na história da Terra.

A vida em condições de saturação de NaCl, não é fácil e são poucos os organismos que toleram estas condições de hipersalinidade. Além disso, a concentração de sais de magnésio, também abundantes no estoque marinho, representa um estresse adicional. Apesar disso, as águas dos cristalizadores possuem um elevado conteúdo de biomassa, que corresponde fundamentalmente a dois tipos celulares: as arqueias halofílicas extremas ou haloarqueias, e as bactérias halofílicas extremas do gênero *Salinibacter*, além da alga *Dunaliella* (OVREAS et al., 2003; BENLLOCH, et al., 2002; ANTON et al., 2000). Ambos os grupos de organismos são heterótrofos aeróbicos que degradam a matéria orgânica acumulada em fases prévias de concentração, tornando sua presença essencial para permitir a precipitação do NaCl eficientemente, já que sua forte pigmentação avermelhada, proveniente desses microrganismos, atua como uma armadilha para raios infravermelhos, aumentando a temperatura da água e permitindo a evaporação dessa salmoura tão higroscópica.

A microbiota destes cristalizadores é um dos sistemas biológicos melhor conhecidos. Na Espanha, foi possível cultivar cepas representativas dos filotipos mais abundantes nas salinas de Santa Pola (Espanha): a haloarqueia *Haloquadratum walsbyi* que possui uma morfologia quadrada muito característica, e a bactéria *Salinibacter ruber* (BOLHUIS et al., 2004, ANTON et al., 2002). As linhagens “tipo” de ambas as espécies tiveram seus genomas completamente seqüenciados. Foram construídas bibliotecas de fosmídeos do DNA extraído diretamente da água dos cristalizadores dessas salinas e foram seqüenciados clones contendo genes para rodopsinas, além de outros genes de interesse taxonômico ou fisiológico (PAPKE et al, 2003).

2.6 Potencial de aplicação na indústria biotecnológica

Os microrganismos halofílicos produzem enzimas estáveis (incluindo muitas enzimas hidrolíticas como as DNAses, lipases, amilases e proteases), capazes de atuar em alta concentração de sais sem precipitar ou desnaturar. Muitas enzimas halofílicas são inativadas e desnaturadas em concentração abaixo de 1M de NaCl. Os solutos compatíveis produzidos por estes organismos têm apresentado grande interesse para estabilização de biomoléculas como, enzimas, DNA e membranas (JOO; KIM, 2004).

Os biossurfactantes e os exopolissacarídeos aumentam a degradação de petróleo contaminante do solo e água, pois disponibilizam o petróleo requerido pelos organismos para que eles se multipliquem e produzam também estes biossurfactantes em um ambiente contaminado. Biossurfactantes produzidos por microrganismos halofílicos ou halotolerantes podem acelerar significativamente a despoluição de ambientes salinos contaminados com petróleo. Em casos de contaminação em ambientes com alta salinidade e temperatura, a aplicação de biossurfactantes para a microbiota *in situ*, aumenta e disponibiliza o petróleo facilitando sua biodegradação (JOO; KIM, 2004).

A habilidade destes microrganismos para oxidar hidrocarbonetos em presença de sal é utilizada para o tratamento biológico de ecossistemas salinos contaminados com produtos de petróleo. Muitos casos de sucesso de biorremediação de hidrocarbonetos têm sido reportados usando halofílicos em ambientes marinhos, no Ártico e na Antártida, em fluidos ricos em sais, em pântanos salinos na Louisiana, em reatores de biofilme e em água salina contaminada com compostos fenólicos (JOO; KIM, 2004).

2.7 Hidrocarbonatos aromáticos policíclicos

O termo hidrocarboneto aromático policíclico (HAP) se refere a hidrocarbonetos que tenham dois ou mais anéis benzênicos arranjados em linha, ângulo ou aglomerados (**FIGURA 01**). São uma classe de poluentes tóxicos ao meio ambiente que têm se acumulado devido a atividades antropogênicas. São hidrofóbicos e o que leva a persistirem no ambiente é esta baixa solubilidade em água (CERNIGLIA, 1992). Muitos HAPs são carcinogênicos e teratogênicos.

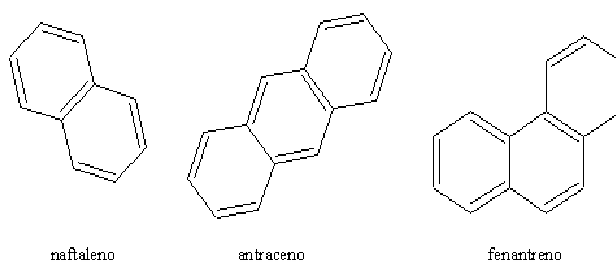


FIGURA 2.1: Exemplos de HAP

Geralmente, a solubilidade e a volatilidade diminuem e a hidrofobicidade cresce com o aumento do número de anéis benzênicos do HAP (JUHASZ; NAIDU, 2000).

A maior fonte de HAPs é a queima da lignina, proveniente de matéria orgânica vegetal. São formados naturalmente durante a produção térmica geológica e durante a queima de vegetação nas florestas e carvão vegetal. Entretanto, fontes antropogênicas, particularmente a queima de combustíveis, processos pirólicos, derramamento de produtos de petróleo, incineração de resíduos e queimas domésticas, são fontes significativas de HAPs no ambiente. Em países industrializados, as atividades de combustão antropogênicas são a principal fonte de HAPs (JUHASZ; NAIDU, 2000).

2.8 Ocorrência de compostos aromáticos em ambientes hipersalinos

Ambientes marinhos e regiões costeiras estão expostos a compostos fenólicos antropogênicos e biogênicos, os quais se acumulam em sedimentos superficiais. Além disso, compostos aromáticos são produzidos naturalmente através da degradação da lignina, a qual está presente abundantemente nos sedimentos de estuários (LOVELL et al., 2002).

O desenvolvimento de novas tecnologias e novos materiais fez com que os efluentes industriais se tornassem cada vez mais complexos. Compostos aromáticos são encontrados em fibras de poliéster, filmes, garrafas de polietileno tereftalato (PET) e outros plásticos. As águas residuárias de indústrias têxteis, freqüentemente contêm elevada concentração (cerca de 100 g.L⁻¹) de sais de cloro, os quais são adicionados durante o processo de tingimento, além de resíduos de corantes (KARCHER et al., 2001).

A água residuária da atividade de extração de petróleo é altamente salina e contém uma mistura complexa de hidrocarbonetos, muitos dos quais são altamente tóxicos. Nas proximidades dos poços de extração de petróleo, o solo pode ser contaminado por essa água, tornando-se um ambiente propício para o desenvolvimento de organismos halofílicos, o mesmo ocorrendo com as lagoas de descarte dessa águas (ADKINS et al., 1993).

A biodegradação de hidrocarbonetos por populações naturais de microrganismos representa o mecanismo primário para eliminação do petróleo e outros hidrocarbonetos poluentes do ambiente (LEAHY; COLWELL, 1990). Compostos aromáticos freqüentemente contaminam ambientes hipersalinos, como lagos, solos, lagoas próximas a estuários e rios e ambientes marinhos (VENTOSA; NIETO, 1995).

2.9 Metabolismo de compostos aromáticos

2.9.1 Biosurfactantes

Os surfactantes biológicos, ou biosurfactantes, são biomoléculas que apresentam uma porção lipofílica e outra hidrofílica. A porção lipofílica ou apolar é formada pela cadeia hidrocarbônica de um ácido graxo ou anel esterol. Já a porção hidrofílica ou polar é formada pelo grupo carboxil dos ácidos graxos ou aminoácidos, pelo grupo fosforil dos fosfolipídeos, pelo grupo hidroxil dos sacarídeos, e também pelos peptídeos. A maioria dos biosurfactantes são produzidos por bactérias, leveduras e fungos, durante o cultivo em várias fontes de carbono (MORIKAWA et al., 2000).

Os biosurfactantes são compostos naturais, biodegradáveis e podem ser menos tóxicos que os surfactantes sintéticos. Devido a sua estrutura diferenciada, os biosurfactantes apresentam várias propriedades que podem ser exploradas comercialmente, como redução das tensões superficial e interfacial do meio aquoso, remediação de compostos orgânicos e metálicos, podendo também ser usados como aditivos em cosméticos e no controle biológico. Esta extensa gama de aplicações dos biosurfactantes tem aumentado o interesse em sua produção, mas muito pouco ainda se sabe a respeito da distribuição de microrganismos produtores dessas substâncias no meio ambiente (BODOUR; MILLER-MAIER I., 1998). A surfactina é um dos muitos biosurfactantes existentes e pode ser produzido por *Bacillus subtilis*. Apresenta grande importância, o que tem aumentado grandemente o interesse biotecnológico em sua produção, além de atrair cada vez mais a atenção da indústria farmacêutica (KOWALL et al., 1998).

Em poços de petróleo, alguns microrganismos, são capazes de degradar óleos e produzirem biosurfactantes extracelulares. Nesse caso, os biosurfactantes facilitam a degradação microbiana através da emulsificação do substrato. Contudo, alguns microrganismos que não apresentam a capacidade de degradar óleos também produzem biosurfactantes. Uma explicação possível é a de

que os biossurfactantes são produzidos como substâncias antimicrobianas, para defender as células de possíveis ataques efetuados por outros microrganismos (MORIKAWA et al., 2000).

2.9.2 Mecanismo de clivagem de anéis por dioxigenases

Dioxigenases de fissão de anéis são oxiredutases que constituem enzimas centrais para a reciclagem de compostos aromáticos nos microrganismos. Elas catalizam a abertura de anéis aromáticos hidroxilados por incorporação de dois átomos de oxigênio (O_2) nos substratos, e podem ser classificados em dois diferentes grupos de acordo com o modo da fissão do anel (HARAYAMA; REKIK, 1989). Enzimas intradiol clivam o anel entre dois grupos hidroxilas (rota *ortho*), enquanto que enzimas do tipo extradiol clivam o anel entre um grupo hidroxila e outro adjacente carbônico não hidroxilado (rota *meta*). As subfamílias de enzimas intra e extradiol dioxigenases diferem primariamente em seqüência 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 da clivagem do anel.

Catecol e protocatecuato 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 protocatecuato divide a rota beta-cetoadipato incluindo seis enzimas no catabolismo de diversos compostos fenólicos para intermediários do ciclo do ácido cítrico. Catecol pode ser degradado por uma ou outra via: intradiol ou do extradiol. Na primeira a reação é catalisada pela catecol 1,2-dioxigenase e catecol 2,3-dioxigenase, respectivamente. Já na segunda, as enzimas envolvidas são protocatecuato 3,4-dioxigenase e protocatecuato 4,5-dioxigenase (**Figura 2.2**).

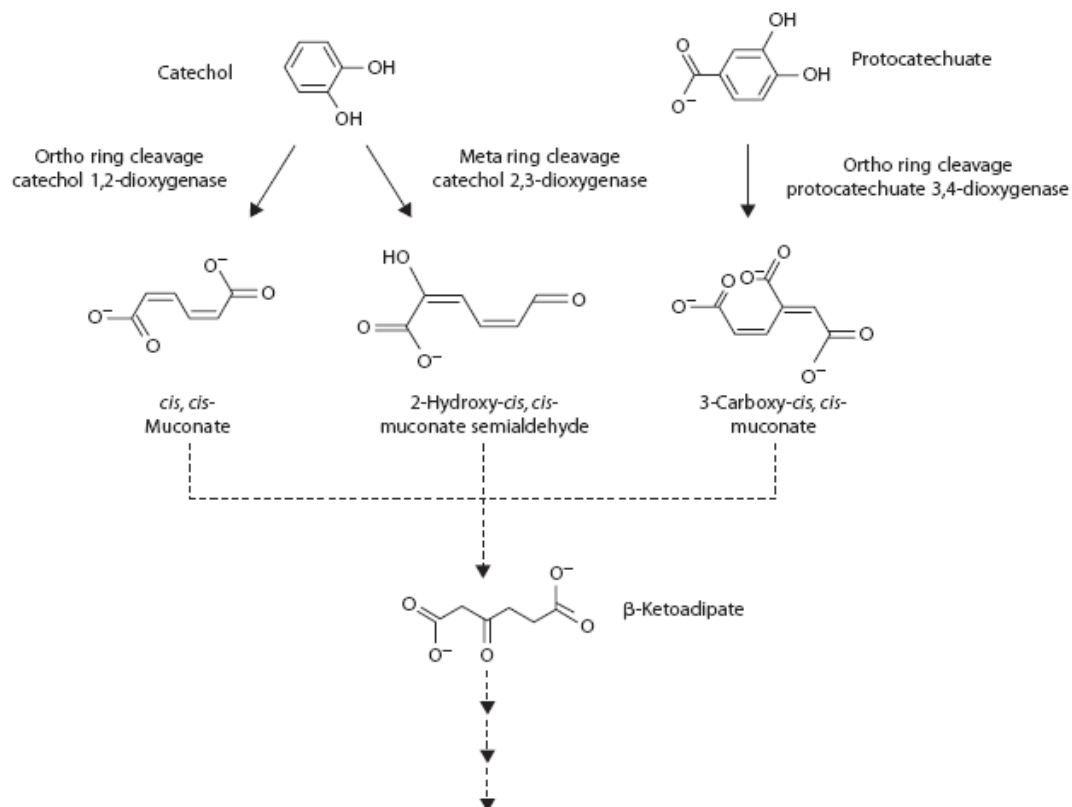


FIGURA 2.2: Rotas de degradação do fenol e protocatecuato (BORGNE et al., 2008)

O gentisato pode ter seu anel clivado pela oxidação por gentisato 1,2-dioxygenase formando metilpiruvato (LACK, 1974), que é depois isomerizado para fumarilpiruvato (BAYLY; BARBOUR, 1984) ou convertido sem isomerização para metabólitos centrais, como ácido citraconico (BAYLY et al., 1984) (Figura 2.3).

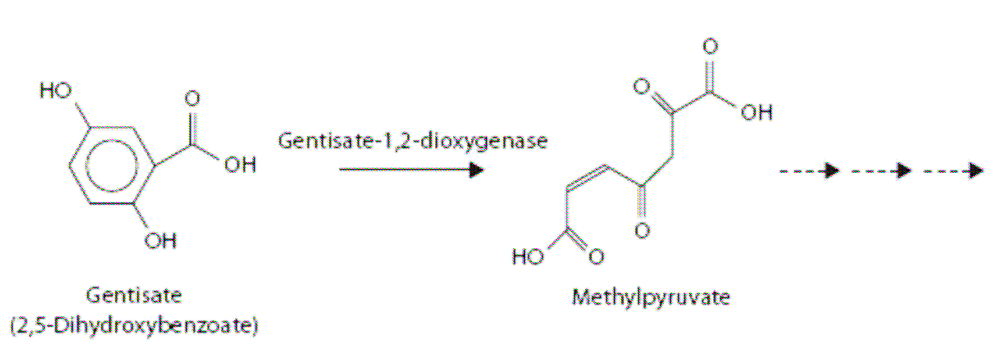


FIGURA 2.3: Rota de degradação do gentisato (BORGNE et al., 2008)

Assim, homoprotocatecuato (3,4-dihidroxifenilacetato) e homogentisato servem como substrato para dioxigenases de fissão de núcleos benzênicos. Homoprotocatecuato é catabolizada para intermediários do ciclo de krebs via clivagem extradiol pela homoprotocatechuato 2,3-dioxigenase (ROPER et al., 1993), enquanto homogentisato é convertida a maleilacetoacetado pela ação da homogentisato 1,2-dioxigenase (ARIAS-BARRAU et al., 2004). Uma lista das principais dioxigenases aqui discutidas, seu número de classificação enzimática (E.C.) e sua reação de catálise estão apresentados na **Tabela 2.1**.

Tabela 2.1: Principais dioxigenases de clivagem de anéis

Dioxigenases	E.C.	Reação
Intradiol (Orto-Cleavage)		
Catecol 1,2-DO	1.13.11.1	Catecol + O ₂ = cis,cis-muconato
Protocatechuato 3,4-DO	1.13.11.3	3,4-dihidroxibenzoato + O ₂ = 3-carboxi-cis,cis-muconato
Extradiol (Meta-Cleavage)		
Catecol 2,3-DO	1.13.11.2	Catecol + O ₂ = 2-hidroxiuconate semialdeído
Protocatecuato 4,5-DO	1.13.11.8	Protocatecuato + O ₂ = 4-carboxi-2-hidroxiuconic semialdeído
Homoprotocatecuato 2,3-DO	1.13.11.15	3,4-dihidroxifenilacetate + O ₂ = 2-hidroxi-5-carboximethylmuconate semialdeído.
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

A larga distribuição e a relativamente baixa quantidade de espécie de mono e dioxigenases entre as eubacterias sugerem que os genes codificados por essas enzimas sejam freqüentemente mobilizados a criar novas rotas metabólicas híbridas, com um aumento do número de espécies capazes de degradar compostos aromáticos (COPLEY, 2000 *apud* IZZO et al, 2005).

2.10 Biodegradação de composto aromáticos

A biodegradação de compostos aromáticos tem sido um dos aspectos do catabolismo microbiano mais explorado nos últimos anos, tanto em microrganismos procariotos como nos eucariotos.

A utilização de consórcios microbianos (culturas mistas) é uma estratégia eficiente para a recuperação de áreas contaminadas. Ao reunir-se 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).

A ocorrência da biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos (possuem estrutura química em cadeias abertas) e aromáticos também foi demonstrada em ambientes extremos, tal como em solo com pH extremamente baixo (STAPLETON *et al.*, 1998), em ambientes com temperaturas elevadas (FEIKENHAUER; MARK, 2003), além da utilização de microrganismos psicrotolerantes (que sobrevivem em baixas temperaturas), na biodegradação de substratos aromáticos (BARANIECKI *et al.*, 2002).

Estudos sobre o efeito da salinidade na taxa de degradação de compostos aromáticos foram realizados. Rhykerd e colaboradores (1995) estudaram dois tipos diferentes de solos contaminados com óleo de motor, um arenoso e outro argiloso, e observaram que em ambos os solos a taxa de biorremediação é inversamente proporcional ao aumento da salinidade.

Walker e Brock (1975) sugeriram que a salinidade atua reduzindo a atividade metabólica dos microrganismos. Segundo o trabalho de Ward e Brock (1978), isso não ocorre devido à diminuição da quantidade de oxigênio dissolvido, mas sim em função do aumento da salinidade, pois a re-aeração do meio não resulta em estimulação do metabolismo. A ausência de nutrientes orgânicos também não é um fator limitante, segundo os autores.

As bactérias halofílicas moderadas constituem uma importante alternativa para os tratamentos microbiológicos convencionais utilizados na degradação de compostos tóxicos, como é o caso dos processos industriais que geram efluentes salinos, o que ocorre na produção de pesticidas, herbicidas, determinados produtos farmacêuticos e processos de extração de petróleo e gás (OREN et al., 1992; 1993; LEFEBVRE; MOLETTA, 2006).

Os estudos das bactérias halofílicas moderadas capazes de degradar compostos aromáticos têm aumentado consideravelmente nos últimos anos, o que pode ser confirmado com as atuais pesquisas. Oren e colaboradores (1991) demonstraram a degradação de vários compostos aromáticos nitro-substituídos em concentrações salinas de 13-14% pelas bactérias *Halanaerobium praevalens* e *Orenia marismortui*. Além disso, a partir de distintos ambientes hipersalinos, foram isolados microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos, incluindo hexanos e fenantrenos (MCMEEKIN et al., 1993; MARGESIN; SCHINNER, 2001; PEYTON et al., 2004). Gauthier e colaboradores (1992) descreveram a primeira espécie de *Marinobacter*, *M. hydrocarbonclasticus*, cujo nome se deve a capacidade desta de degradar hidrocarbonetos.

Várias cepas pertencentes à família *Halomonadaceae* são capazes de utilizar como fonte de carbono e energia o herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (MALTESEVA et al., 1996). Os genes responsáveis pela degradação destes compostos foram clonados e transferidos a outras bactérias halofílicas moderadas, conferindo a estas a capacidade para hidrolisar o 2,4-D (KLEINSTEUBER et al., 2001).

Woolard e Irvine (1994) utilizaram bactérias halofílicas moderadas isoladas de solos hipersalinos para o tratamento biológico de efluentes hipersalinos.

Um dos principais contaminantes industriais é o fenol. Muitas espécies halofílicas moderadas pertencentes ao gênero *Halomonas* são capazes de degradar este composto. Assim, *Halomonas venusta* isolada de água do mar é capaz de crescer em meios contendo fenol (MUÑOZ et al., 2001).

Recentemente, García e colaboradores (2005b) realizaram estudos em habitats salinos do sul da Espanha centrando a caracterização de bactérias halofílicas moderadas capazes de degradar diferentes compostos aromáticos. A caracterização dos isolamentos determinou que as espécies do gênero *Halomonas* são as principais responsáveis desta biodegradação. Assim, a bactéria halofílica moderada *Halomonas organivorans* é capaz de degradar um grande número de compostos aromáticos (ácido benzóico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido cinâmico, ácido salicílico, ácido fenilacético, ácido fenilpropionico, ácido p-cumárico, ácido ferrúlico e fenol) (GARCIA et al., 2004). *Thalassobacillus devorans* é outra espécie halofílica isolada por Garcia et al., (2005) em salinas do sul de Espanha, a qual se caracteriza por sua capacidade de degradar fenol.

Entre as arqueias, há poucos relatos do isolamento de cepas capazes de degradar compostos aromáticos. Existem alguns estudos feitos por Kulichevskaya e colaboradores (1992), de arqueias presentes em poços de petróleo na Rússia. Em um outro trabalho realizado por Emerson (1994), foi descrito o isolamento de uma linhagem de haloarqueia no Estado de Michigan (EUA), a qual foi identificada como *Haloferax volcanii* D1227 que cresce em ácido benzóico como única fonte de carbono.

2.11 Biorremediação de água de produção de petróleo

A água de produção de petróleo é um efluente salino gerado durante a extração de petróleo tanto *onshore* quanto *offshore*. Volumes substanciais de água salina 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 (SAUER, 1991), e até exceder em 10 vezes o volume de óleo produzido (RIBEIRO, 1995). O alto teor de sal, a mistura complexa de compostos orgânicos e inorgânicos, e o óleo presente na água de produção apresentam desafios ao emprego de

tratamentos biológicos, sendo, nos últimos anos estudadas tecnologias alternativas para degradação de seus contaminantes orgânicos. Os componentes deste efluente geralmente incluem minerais dissolvidos, constituintes oleosos dissolvidos e dispersos, produtos químicos empregados durante o processo de produção, sólidos e gases dissolvidos (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2000).

A indústria petroquímica tem aumentado gradativamente a capacidade de explorar águas profundas. A consequência deste avanço químico é o risco de contaminação ambiental por poluentes, que obrigatoriamente contém esses efluentes com altas concentrações de sal, juntamente com uma enorme variedade de compostos orgânicos (FREIRE et al., 1998).

O solo ao redor dos poços de extração pode também ser contaminado por esta água residuária. 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 ou em tanques e lagoas para tratamento posterior. Nos locais de descarte desses resíduos podem ser encontrados microrganismos halofílicos (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2000; CUADROS-ORELLANA, 2003).

Devido à presença de altas concentrações de sais nestes efluentes, é esperada a presença de microrganismos halofílicos, os quais podem estar envolvidos na degradação dos compostos aromáticos presentes no petróleo contaminante. Dessa forma, haloarquérias e bactérias halofílicas podem ser empregadas na biorremediação da água produzida na extração de petróleo (DASSARMA; ARORA, 2001; DYALL-SMITH; DANSON, 2001).

2.12 Estudos moleculares de degradação de compostos aromáticos por microrganismos halofílicos

O estudo da identificação de vias metabólicas alternativas de degradação de compostos aromáticos, assim como, a clonagem molecular de genes neste processo, são algumas das tendências de pesquisa sobre biodegradação de compostos aromáticos em ambientes salinos (FAIRLEY et al., 2002).

A evolução de genes catabólicos é um campo intrigante de investigação microbiológica. *Clusters* de genes codificados para o catabolismo de compostos aromáticos são geralmente encontrados em elementos genéticos móveis, como *transposons* (WYNDHAM et al., 1994) ou plasmídios (SAYLER et al., 1990), que facilitam a transferência horizontal de genes e, assim, a rápida adaptação de microrganismos a novos poluentes (DÍAZ, 2004). Realmente, a transferência de genes plasmidiais é provavelmente um dos mais importantes processos que regula a conjunto ambiental de genes de degradação e rotas metabólicas (VAN DER MEER et al., 1992), proporcionando um aumento do mosaico de *operons* catabólicos e garantindo a variabilidade necessária para ocorrer evolução. O metabolismo bacteriano versátil pode ser auxiliado via combinação de diferentes altos e baixos *operons* catabólicos, assim chamada expansão vertical, na qual novas rotas periféricas são adquiridas e direcionam substratos para rotas de degradação existentes (BARBIERI et al., 2001). Outra plasticidade genômica pode resultar na expressão ou repressão de *sets* de genes mediados por elementos transponíveis ou inserção de seqüências (VAN DER MEER et al., 1992).

A pressão seletiva é claramente o principal fator que afeta a evolução de genes catabólicos (JANSSEN et al., 2005). Como exemplo, *Acinetobacter* isolada de ambientes contaminados e não contaminados com petróleo (RATAJCZAK et al., 1998), contém genes para degradação de alcanos de cadeia longa (*alk genes*) diferentemente: no isolado de ambientes contaminados são codificados

plasmidialmente, enquanto no isolado de ambiente não contaminado com altos níveis de alcanos os genes são codificados cromossomicamente.

Microorganismos que vivem em ambientes salinos e hipersalinos podem também sofrer uma pressão seletiva particular não somente pelas condições físico-químicas extremas, mas também por específicos tipos de vírus e elementos transponíveis que ocorrem nestes ambientes (DAHLBERG; HERMANSSON,1995).

De acordo com Ventosa e colaboradores (1998), bactérias halofílicas apresentam um enorme catabolismo versátil. Recentemente, García e colaboradores (2005a) testaram este catabolismo versátil de degradação de compostos aromáticos em bactérias halofílicas utilizando uma aproximação ecológica. Neste estudo, muitos dos isolados pertenciam ao gênero *Halomonas*, provavelmente porque o *screening* foi realizado em condições restritas de temperatura. Apesar disso, isolados do gênero *Salinicoccus* e *Halobacillus* foram descritos pela primeira vez como capazes de degradar compostos aromáticos, e novos representantes de outros gêneros conhecidos foram incluídos como degradadores de compostos aromáticos, uma *Marinobacter*, também foi descrita.

2.13 Referências Bibliográficas

ADKINS, J. P., MADIGAN, M. T., MANDELCO, L., WOESE, C. L., TANNER, R. S. *Arhodomonas aquaeolei* gen. Nov., sp. Nov., an Aerobic Halophilic Bacterium Isolated from a Subterranean Brine. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43 (3), p. 514-520, 1993.

ANTON J, OREN A, BENLLOCH S, RODRIGUEZ-VALERA F, AMANN R, ROSSELLO-MORA R. *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 52(Pt 2), p. 485-91, 2002.

ANTON J, ROSSELLO-MORA R, RODRIGUEZ-VALERA F, AMANN R. Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. **Appl Environ Microbiol**. v. 66(7), p. 3052-7, 2000.

ARIAS-BARRAU, E., OLIVERA, E. R., LUENGO, J. M., FERNANDEZ, C., GALAN, B., GARCIA, J. L., DIAZ, E., MINAMBRES, B. The homogentisate pathway: a central catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine, and 3-hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*. **J. Bacteriol**. v. 186, p. 5062-5077, 2004.

BARANIECKI, C. A. AISLABIC, J., FOGHT, J. M. Characterization of *Sphingomonas* sp. Ant 17, an aromatic hydrocarbon degrading bacterium isolated from Antarctic soil. **Microb. Ecology**. v. 43, p. 44-54, 2002.

BARBIERI P, ARENGHI FLG, BERTONI G, BOLOGNESE F, GALLI E. Evolution of catabolic pathways and metabolic versatility in *Pseudomonas stutzeri* OX1. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 79, p. 135-140, 2001.

BAYLY R. C., CHAPMAN P. J., DAGLEY S., DIBERARDINO D. Purification and some properties of maleylpyruvate hydrolase and fumarylpyruvate hydrolase from *Pseudomonas alcaligenes*. **J. Bacteriol**. v. 143, p. 70-7, 1984.

BAYLY, R. C., BARBOUR, M. G. The degradation of aromatic compounds by the meta and gentisate pathways, p. 253-294. In D. T. Gibson (ed.), *Microbial degradation of organic compounds* (1984), vol. 13. Marcel Dekker Inc. New York, N.Y.

BENLLOCH S, LOPEZ-LOPEZ A, CASAMAYOR EO, OVREAS L, GODDARD V, DAAE FL, SMERDON G, MASSANA R, JOINT I, THINGSTAD F, PEDROS-ALIO C, RODRIGUEZ-VALERA F. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. **Environ Microbiol**. v. 4(6), p. 349-60, 2002.

BINTRIM, S. B., DONOHUE, T. J., HANDELSMAN, J., ROBERTS, G. P., GOODMAN, R. M. Molecular Phylogeny of Archaea From Soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 94, p. 277-282, 1997.

BOLHUIS H, POELE EM, RODRIGUEZ-VALERA F. Isolation and cultivation of Walsby's square archaeon. **Environmental Microbiology** v. 6(12),p. 1287-91, 2004.

BODOUR, A. A., MILLER-MAIER, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v.32, p.273-280, 1998.

BULLOCK, C. The Archaea – a Biochemical Perspective. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 28, p. 186-191, 2000.

CERNIGLIA, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation**, v. 2(2-3), p. 351-68, 1992.

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.

DAHLBERG C, HERMANSSON M. Abundance of Tn3, Tn21, and Tn501 transposase (tnpA) sequences in bacterial community DNA from marine environments. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 61, p. 3051-3056, 1995.

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

DÍAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. **Int. Microb.**, v. 7, p.173-80, 2004.

DYALL-SMITH, M., DANSON, M. The life of brine: Halophiles in 2001. **Genome Biology**. v. 2 (12), p. 4033.1-4033.3, 2001.

EINSENBURG, H., MEVARECH., ZACCAI, G. Biochemical, structural, and molecular genetic aspects of halophilic. **Advances in Protein chemistry**. v. 43, p.1-62, 1992

EMERSON, D., CHAUHAN, S., ORIEL, P., BREZNAK, J.A. Haloferax sp. D1227, a halophilic archaeon capable of growth on aromatic compounds. **Archives of Microbiology**, v.161, p.445-452, 1994.

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 unusual pathway involving an intramolecular migration shift (NIH shift). **Applied and Environmental microbiology**, v. 68(12): p.6246-6255, 2002.

FEIKENHAUER, H., MARK, H. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons at high temperatures. **Water Science and Technology**, v. 47(10), p.123-130, 2003.

FREIRE, D. D. C., CAMMAROTA, M. C., SANT'ANNA JR., G. L. Biological Treatment of High Saline Produced Waters. **LABS 3**, Paper 34, 1998.

GARCÍA 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.1789-95, 2005b

GARCÍA, M. T., VENTOSA, A., MELLADO, E. Catabolic versatility of aromatic compound-degrading halophilic bacteria. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v.54 (1), p. 97-109, 2005.

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

GAUTHIER, M.J., LAFAY, B., CHRISTEN, R., FERNÁNDEZ, 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.

GRANT, W. D., LARSEN, H. Extremely Halophilic Archaeobacteria, order halobacteriales ord. Nov. In: Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfennig, N., Holt, J.G. (1989) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. v.3, Baltimore: ed. Williams, Wilkins.

HARAYAMA S, REKIK M. Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. **J. Biol Chem.**, v. 264, p. 15328-33, 1989.

HARWOOD CS, PARALES RE. The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. **Annu. Ver. Microbiol.**, 1996, 50, 553-90.

IZZO, V., NOTOMISTA, E., PICARDI, A., PENNACCHIO, F., DONATO, A. The thermophilic archaon *Sulfolobus solfataricus* is able to grow on phenol. **Reserch in Microbiology**, v. 156, p. 677-689, 2005.

JANSSEN DB, DINKLA IJT, POELARENDs GJ, TERPSTRA P. Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 1868–1882, 2005.

JAVOR, B.J. (ed.) (1989). Hypersaline Environments. Microbiology and Biogeochemistry. Springer-Verlag: Berlin.

JOO, W., KIM, C. Proteomics of Halophilic archaea. **Journal of Chromatography B** v. 815, p. 1-2, 2004.

JUHASZ, A. L., NAIDU, R. Bioremediation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: a Review of the Microbial Degradation of Benzo[a]pyrene. **International Biodeterioration**. v. 45, p. 57-88, 2000.

KAMECURA, M. Diversity of extremely halophilic bacteria. **Extremophiles**, v. 2, p. 289-295, 1998.

KARCHER, S., KORNMULLER, A., JEKEL, M. Cucurbituril for Water Treatment. Part I: Solubility of Cucurbituril and sorption of Reactive dyes. **Water Reaserch**. v. 35 p. 3309-3316, 2001.

KLEINSTEUBER, S. RUDIGER, A., ANTRANIKIAN, G., JORGENSEN, P. L., LADENSTEIN, R. Expression of the 2,4-D degradative pathway of pJP4 in na alkaliphilic, moderately halophilic soda lake isolate, *Halomonas* sp. EF43. **Extremophiles**. v. 5, p.375-384, 2001.

KÖNIG, H., STETTER, K. O. Archaeobacteria. In: STALEY, J. T., BRYANT, M. P., PFENNIG, N., HOLT, J. G. (Eds.) *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. v. 3, Baltimore: ed. Williams, Wilkins, 1989.

KOWALL, M., VATER, J., KLUGE, B. STEIN, T., FRANKE, P., ZIESSOW, D. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.204, p.1-8, 1998.

KULICHEVSKAYA, I.S., MILEKHINA, E.I., BORZENKOV, I. A., ZVYAGINTSEVA, I.S., BELYAEV, S. S. Oxidation of Petroleum hydrocarbons by extremely halophilic archaebacteria. **Mikrobiologiya** (Tradução para o inglês) v. 60, p. 596-601, 1992

KUSHNER, D. J. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. En: D.J. Kushner (ed.). **Microbial Life in Extreme Environments**. Academic Press: London. 1978, 317-368 p.

KUSHNER, D.J., KAMECURA, M. Physiology of Halophilic bacteria. In: Rodríguez-Valera (ed.). Halophilic Bacteria. CRC Press: Boca Raton. vol. I, 1988, 109-140p.

LACK L. The enzymatic oxidation of gentisic acid. **Biochem. Biophys. Acta**, v.34, p.117-23, 1974.

LEAHY, J. G., COLWELL, R. R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. **Microbiological Reviews**, v. 54 (3), p. 305-315, 1990.

LEFEBVRE, O., MOLETTA, R. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review. **Water Research**. v. 40(20), p.3671-3682 2006.

LOVELL, C. R., ERIKSEN, N. T., LEWITUS, A. J., CHEN, Y. P. Resistance of the Marine Diatom *Thalassiosira* sp to Toxicity of Phenolic Compounds. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 229, p. 11-18, 2002.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M. Brock biology of microorganisms. 11th, Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2006, 992p.

MALTESEVA, O., MCGOWAN, 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.

MARHUENDA-EGEA, F. C., BONETE, M. J. Extreme Halophilic Enzymes in Organic Solvents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 385-389, 2002.

MCMEEKIN, T.A., NICHOLS, P.D., NICHOLS, S.D., JUHASZ, A., FRANZMANN, P.D. Biology and biotechnological potential of halotolerant bacteria from Antarctic saline lakes. **Experientia**. v. 49, p. 1042-1046, 1993.

MORIKAWA, M., HIRATA, Y., IMANAKA, T. A study on the structur-function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1488, p.211-218, 2000.

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 bacteria isolated from sea water using phenol as the sole carbon source. **Folia Microbiol.** (Praha). v. 46, p. 297-302, 2001.

OLIVEIRA, R. C. G., OLIVEIRA, M. C. K. Remoção de Contaminantes Tóxicos dos Efluentes Líquidos Oriundos da Atividade de Produção de Petróleo no Mar. **Bol. téc. PETROBRÁS**, v. 43 (2), p. 129-136, 2000.

OREN, A. Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and bacteria. **FEMS microbiology ecology**, v.39, p.1-7, 2002.

OREN, A. Ecology of extremely halophilic microorganisms. En: R.H. Vreeland and L.J. Hochstein (eds.). The biology of halophilic Bacteria. CRC Press: Boca Raton. p. 25-53, 1993

OREN, A., GUREVICH, P., HENIS, Y. Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations. In: Rosenberg (ed.). Microorganisms to Combat Pollution. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. 1993, 263-274p.

OREN, A., GUREVICH, P., HENIS, Y. Reduction of nitrosubstituted aromatic compounds by the halophilic anaerobic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Sporohalobacter marismortui*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 57, p. 3367-3370, 1991.

OREN, A., GUREVICH, P., AZACHI, M., HENIS, Y. Microbial degradation of pollutants at high salt concentration. **Biodegradation**. v. 3, p. 387-398, 1992.

OSCHSENREITER, T., PFEIFER, F., SCHLEPER, C. Diversity of Archaea in Hypersaline Environments Characterized by Molecular-Phylogenetic and Cultivation Studies. **Extremophiles**., v.6, p. 267-274, 2002.

OVREAS L, DAAE FL, TORSVIK V, RODRIGUEZ-VALERA F. Characterization of microbial diversity in hypersaline environments by melting profiles and reassociation kinetics in combination with terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). **Microb Ecol.** v.46(3), p.291-301, 2003.

PAPKE RT, DOUADY CJ, DOOLITTLE WF, RODRIGUEZ-VALERA F. Diversity of bacteriorhodopsins in different hypersaline waters from a single Spanish saltern. **Environ Microbiol.** v. 5, (11), p. 1039-45, 2003.

PELCZAR, M. J. J., CHAN, E. C. S. KRIEG, N. R. Microbiologia: Conceitos e Aplicações, v. I, São Paulo: ed. Makron Books, 1996, 524p.

PEYTON, B.M., MORMILE, M.R., ALVA, V., OIE, C., ROBERTO, F., APEL, W.A., OREN, A. (2004). Biotransformation of toxic organic and inorganic contaminants y halophilic bacteria. In: Ventosa, A. (ed.) Halophilic Microorganisms. Springer-Verlag: Heidelberg. Pp.315-331.

RATAJCZAK, A., GEISDÖRFER, W., HILLEN, W. Alkane Hydroxylase from *Acinetobacter* sp. Strain ADP1 Is Encoded by *alkM* and Belongs to a New Family of Bacterial Integral-Membrane Hydrocarbon Hydroxylases. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64(4), p. 1175-1179, 1998.

RENGEL, S. M. Caracterización molecular de la lipase LipM producida por *Marinobacter lipolyticus*. Tese de doutorado apresentada à Universidad de Sevilla para obtenção do título de doutor. Sevilla-ES, 2006.

RHYKERD, R.L., WEAVER, R. W., MACLNNES, K. J. Influence of salinity on bioremediation of oil in soil. **Environmental Pollution**, v. 90(1), p.127-130, 1995.

RIBEIRO, C. M. S. Ozonização de Efluentes da Indústria de Petróleo. 1995.

RODRÍGUEZ, R. M., VREELAND, R. H., OREN, A., KESSEL, M., BETANCOURT, C., GARRIGA, L. J. *Hlogeometricum borinquense* gen. Nov., a novel halophilic archaeon from Puerto Rico. **International Journal of Systematic Bacteriology**. V. 48, p. 1305-1312, 1998.

RODRÍGUEZ-VALERA, F. (1988) In: Halophilic Bacteria. Rodríguez – Valera (Ed.) CRC Press, Inc. Florida, 1: 4-30.

RODRÍGUEZ-VALERA, F., VENTOSA, A., JUEZ, G., IMHOFF, J. F. Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multipond saltern. **Microbial Ecology**, v. 11, p. 107-115, 1985.

ROPER DI, FAWCETT T, COOPER RA. The Escherichia coli C homoprotocatechuate degradative operon: hpc gene order, direction of transcription and control of expression. **Mol. Gen. Genet.**, v. 237, p.241-50, 1993.

SAUER, T. C., Volatile Liquid Hydrocarbon Characterization of Underwater Vents and Formation Waters from Offshore Production Operations. **Environmental Science & Technology**, v. 15, n. 8, p. 917-923, 1991.

SAYLER GS, HOOPER SW, LAYTON AC, KING JM. Catabolic plasmids of environmental and ecological significance. **Microb. Ecol.** v. 19, p.1–20, 1990.

SOPPA, J. From Replication to cultivation: Hot News from Haloarchaea. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p. 737-744, 2005.

STAPLETON, R. D., SAVAGE, D. C., SAYLER, G. S., STACEY, G. Biodegradation of aromatic hydrocarbons in an extremely acidic environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64(11), p. 4180-4184, 1998.

TIMMIS, K.N., PIEPER, D.H. Bacteria designed for bioremediation. **TIBTECH**, v.17, p. 201-204., 1999.

VAN DER MEER JR, DE VOS WM, HARAYAMA S, ZEHNDER AJB. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. **Microbiol. Rev.**, v. 56, p. 677–694, 1992.

VENTOSA, A, NIETO, J. J. Biotechnological application and potentialities of halophilic microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p 85-94, 1995

VENTOSA, A. Unusual microorganisms from unusual habitats: hypersaline environments. In: N. A. LOGAN, H.M. LAPPIN-SCOTT AND P.C.F. OYSTON (eds.) (2006) Prokaryotic Diversity: Mechanisms and Significance. Cambridge University Press: Cambridge. 223-253p.

VENTOSA, A., J. J. NIETO, A. OREN. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 62, p. 504–544, 1998.

WALKER, J. D., BROCK, T. D. Factors affecting enumeration and isolation of actinomycetes From Chesapeake Bay and Southeastern Atlantic Ocean sediments. **Marine Biology**, v. 30, p. 193-201, 1975.

WARD, D., BROCK, T. D. Hydrocarbon Biodegradation in Hypersaline Environments. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 35(2), p. 353-359, 1978.

WOESE, C. R., KANDLER, O., WHEELIS, M. L. Toward a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. p. 87, 4576-4579, 1990.

WOOLARD CR., IRVINE RL. Biological treatment of hypersaline wastewater by a biofilm of halophilic bacteria. **Water Environ. Res.**, v. 66, p. 230-5, 1994.

WOOLARD, C. R., IRVINE, R. L. Treatment of hypersaline Wastewater in the Sequencing Batch Reactor, **Water Research**, v. 29 (4), p. 1159-1168, 1995.

WYNDHAM RC, CASHORE AE, NAKATSU CH, PEEL MC. Catabolic transposons. **Biodegradation**, v. 5, p. 323–342, 1994.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo estudar a capacidade de degradação de compostos mono e poliaromáticos por microrganismos halofílicos da coleção de cultura do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, FEA, UNICAMP (LSFM) e também por isolados em ambientes halofílicos no presente projeto e a aplicação destes microrganismos na biorremediação de água de produção de petróleo.

3.2 Objetivos específicos

- a. Isolar de ambientes e resíduos salinos microrganismos halofílicos capazes de degradar compostos aromáticos;
- b. Avaliar a capacidade de degradação de ácidos aromáticos, fenol e compostos aromáticos policíclicos por linhagens de haloarquéias da coleção de cultura do LSFM e por microrganismos isolados neste projeto;
- c. Avaliar a produção de biossurfactantes por microrganismos selecionados;
- d. Estudar a diminuição da carga orgânica da água produzida, proveniente da extração de petróleo, por linhagens selecionadas durante o projeto;
- e. Identificar os microrganismos da coleção de cultura e também os novos isolados através de amplificação do gene que expressa o RNAr 16S;
- f. Estudar os genes de degradação de compostos aromáticos presentes nos microrganismos isolados e nas arquéias halofílicas da coleção de cultura do LSFM.

4 Degradação de compostos aromáticos por haloarquéias

4.1 Introdução

Os compostos aromáticos são abundantes na biosfera e são originados naturalmente ou por atividades antropogênicas, sendo que alguns deles são poluentes. Os ácidos p-hidroxibenzóico, ferúlico, vanílico, cinâmico e siríngico estão naturalmente presentes como compostos que formam a lignina das plantas. Ácidos aromáticos podem também entrar no meio ambiente devido ao uso como matéria-prima para a produção de agroquímicos, farmacêuticos, vernizes entre outros materiais. Ademais, eles podem indiretamente entrar no meio ambiente como um intermediário da biodegradação de polímeros naturais (ligninas e taninos), a partir de aminoácidos aromáticos precursores e intermediários durante a biodegradação de poluentes como pesticidas e HAPs. Por conta de sua característica aniônica no pH do solo e sedimentos, eles podem se mover rapidamente através do solo e por isso, representam grande risco de contaminação às águas subterrâneas (BORGNE et al., 2008).

O mecanismo de degradação destes compostos por bactérias e fungos está muito bem caracterizado, porém pouco se sabe sobre a capacidade de degradação destes compostos por representantes do Domínio *Archaea* (CUADROS-ORELLANA, 2003).

Muitos efluentes industriais como os da indústria petrolífera, possuem em sua composição grandes quantidades de sais, sendo assim de suma importância o estudo da degradação de compostos aromáticos por microrganismos halofílicos, já que a utilização de microrganismos mesofílicos (microrganismos que vivem em ambientes sem a presença de altas concentrações de sais), nestes casos não tem apresentado bons resultados.

A utilização de haloarquéias neste caso é extremamente importante já que estes microrganismos vivem naturalmente em condições ambientais extremas de salinidade (WOOLARD; IRVINE, 1995). Recentemente, Cuadros-Orellana (2003), isolou 44 linhagens de haloarquéias capazes de crescer em ácido p-hidroxibenzoico (0,4 mM) como única fonte de carbono e energia.

Aqui foi avaliada a capacidade de linhagens de haloarquéias da coleção de cultura do LSFM degradarem compostos aromáticos, a identificação destas linhagens e o isolamento e identificação de haloarquéias de salinas brasileiras.

4.2 Material e metodologia

4.2.1 Linhagens utilizadas

Foram utilizadas as seguintes linhagens de haloarquéias isoladas em projeto anterior de doutorado no LSFM (CUADROS-ORELLANA, 2003): três linhagens do Salar de Uyuni, Bolívia (BO3, BO6 e BO7); uma linhagem isolada em Cabo Rojo, Porto Rico (PR13); dois isolados do Mar Morto (Israel e Jordânia) (MM17 e MM27); três isolados da Arábia Saudita (AA31, AA35 e AA41) e dois isolados das Salinas de Cahuil, Chile (CL47 e CL51).

Além destas, as haloarquéias tipo, *Haloferax volcanii* (DSMZ 3757), *Halococcus morrhuae* (DSMZ 1307), *Halobacterium salinarium* (DSMZ 668) e *Haloarcula marismortui* (DSMZ 3752), fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro – RJ, Brasil), foram utilizadas em alguns estudos. A linhagem *Haloferax* sp. D1227, foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Mike Larkin (The Queen's University of Belfast-UK).

4.2.2 Condições de cultivo e preservação

4.2.2.1 Meio Mavarech e Werczberger (MM)

O meio de cultivo utilizado foi o descrito por Mavarech e Werczberger (1985), o qual foi denominado meio mínimo de Mavarech (ou meio MM). A composição final do meio foi em g.L⁻¹: NaCl (200), KCl (3,75), NH₄Cl (0,267), K₂HPO₄ (0,174), MgSO₄ (37), CaCl₂ (0,5), além de uma solução de microelementos (0,1% v/v), (mg.L⁻¹): MnCl₂ (3,6), ZnSO₄ (4,4), FeSO₄ (33,4), CuSO₄ (0,5) (DYALL-SMITH, 2000). O pH foi ajustado em 7,2 e o meio autoclavado (15 min, 121 °C, 1,5 atm).

Para um meio completo (denominado meio MC) foi usada a mesma composição do meio MM, acrescentando-se extrato de levedura (0,3%, p/v) e triptona (0,3% p/v), antes da autoclavagem. Para o meio sólido, 1,5% (p/v) de ágar bacteriológico (Difco) foi adicionado antes da autoclavagem.

4.2.2.2 Solução de vitaminas

Quando necessário, uma solução de vitaminas (WOLIN et al., 1963) foi adicionada ao meio estéril. Essa solução é composta por (mg.L⁻¹): biotina (2), ácido fólico (2), piridoxina (10), riboflavina (5), tiamina (5), ácido nicotínico (5), ácido pantotênico (5), cobalamina (0,1), ácido para-aminobenzóico (5) e ácido tióctico (5). As vitaminas foram solubilizadas em água e a solução foi esterilizada por filtração e mantida a 4 °C, em abrigo de luz. A temperatura de cultivo foi de 38 ou 40 °C para todas as linhagens.

4.2.3 Enriquecimento para isolamento de linhagens de haloarquéias de salinas brasileiras

Os meios para enriquecimento das culturas foram preparados de duas maneiras:

- a. Meio MM contendo Antraceno na concentração de 0,2 mM como única fonte de carbono, com extrato de levedura (0,05% p/v) ou com piruvato de sódio (0,05% p/v), como fontes alternativas de carbono.
- b. Meio MM contendo ácido p-hidroxibenzóico na concentração de 0,5 mM como única fonte de carbono, com extrato de levedura (0,05% p/v) ou com piruvato de sódio (0,05% p/v), como fonte alternativa de carbono.

Nos dois casos, o cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio. Cloranfenicol ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi utilizado para inibir o crescimento de bactérias.

Amostras de água e sedimento de locais hipersalinos (salinas de Arraial do Cabo-RJ e Nossa Senhora do Socorro-SE) foram utilizadas como fontes de inóculo para as culturas de enriquecimento. O volume do inóculo foi de 2 : 50 (v/v ou p/v) e o cultivo foi mantido sob agitação por 21 dias ou até a visualização de crescimento intenso. Duas transferências sucessivas foram realizadas, e alíquotas (50 μL) da cultura enriquecida foram aplicadas através da técnica de espalhamento sobre meio sólido com composição idêntica ao meio enriquecido, porém acrescido com 1,5% de ágar. Após o crescimento em meio sólido, colônias isoladas foram retiradas e transferidas por esgotamento, para placas com meio enriquecido de composição idêntica (CUADROS-ORELLANA, 2003).

4.2.4 Microscopia

A análise da morfologia e motilidade dos isolados foi realizada por microscopia óptica simples, utilizando coloração de Gram. As culturas a serem observadas foram dissolvidas em uma gota de solução hipersalina (NaCl 20%, p/v) e aplicadas sobre uma lâmina de microscopia, através da técnica de esfregaço. Após secar ao ar, a lâmina foi fixada em uma solução de ácido acético 2%

(v/v) por 5 min, segundo Dussault (1955). Esse procedimento foi realizado a fim de preservar as células contra a lise durante as etapas de coloração e também para remover o excesso de sal do esfregaço. Após essa preservação os passos da coloração de Gram foram seguidos.

4.2.5 Crescimento das linhagens em compostos monoaromáticos com adição de extrato de levedura

A resposta de crescimento das linhagens em presença de diferentes compostos monoaromáticos (4,5 mM – 1,5 mM de cada), – ácido benzóico, ácido p-hidroxibenzóico e ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzóico), suplementados com 0,05% extrato de levedura, foram determinadas visualmente.

4.2.5.1 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado com células crescidas em 50 mL de meio MC e vitaminas, mantidos a 38,5 °C, sob agitação de 150 rpm, por 168 horas.

Um volume de 40 mL das culturas foi centrifugado por 10 minutos, a 5 °C e 3000 g. A metade da massa celular total foi transferida para 50 mL de meio líquido MM suplementado com 0,1% da solução de vitaminas, 0,05% de extrato de levedura e 1,5 mM dos ácidos aromáticos, incubados a 38,5 °C, sob agitação de 150 rpm, por 168 horas. Foi preparado um controle sem inóculo de células (controle abiótico), mantidos nas mesmas condições dos cultivos.

A **Tabela 4.1** indica a forma de avaliação visual para determinação do crescimento das linhagens. Além disso, os frascos foram fotografados no início e final do experimento.

Tabela 4.1: Avaliação visual do crescimento das linhagens

Crescimento	Símbolo
Ótimo*	+++
Regular**	++
Pouco***	+
Nenhum****	-

*aparecimento de coloração salmão à vermelha no tempo de 48 a 72 horas após inóculo;

**aparecimento de coloração salmão à vermelha no tempo de 72 a 96 horas após inóculo;

*** pequena mudança na coloração após 96 horas;

**** Nenhum crescimento, sem mudança da coloração com relação ao controle abiótico.

Para posterior análise de degradação todo conteúdo dos frascos foram centrifugados após 168 horas a 3.000 g a 5 °C por 10 minutos e os sobrenantes das amostras foram congelados a -20 °C.

4.2.6 Crescimento das linhagens em compostos monoaromáticos como única fonte de carbono

A resposta de crescimento pelas linhagens de haloarquêias em presença de diferentes compostos monoaromáticos (4,5 mM – 1,5 mM de cada), – ácido benzóico, ácido p-hidroxibenzóico e ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzóico)-, sem adição de extrato de levedura, foram determinadas visualmente. O preparo do inóculo foi realizado como descrito no item 4.2.5.1, porém sem a adição de 0,05% de extrato de levedura.

Para posterior análise de degradação todo conteúdo dos frascos foram centrifugados após 168 horas a 5 °C e 3000 g por 10 minutos e os sobrenadantes das amostras foram congelados a - 20 °C.

4.2.7 Degradação de compostos monoaromáticos

A análise quantitativa dos compostos aromáticos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foi realizada em cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo LC-6A, com detector UV-Vis. Foi utilizada uma coluna de fase reversa Varian C18 (5 μ m x 150 mm x 4,6 mm).

Os ácidos aromáticos são hidrossolúveis nas concentrações utilizadas e os sobrenadantes foram analisados por CLAE diretamente após a centrifugação da cultura (Emerson et al., 1994). As seguintes condições de análise foram seguidas: sistema isocrático, fase móvel metanol : água : ácido acético (50 : 49 : 1, v/v), vazão de 0,5 mL/min, volume de injeção 20 μ L, temperatura de coluna mantida a 35 °C, e detector de absorvância ajustado para 254 nm.

Cada amostra foi injetada duas vezes e a média das áreas obtidas nos cromatogramas foi utilizada para o cálculo da concentração de ácido restante. Assim, foi calculada posteriormente a porcentagem de degradação.

O cálculo da degradação dos ácidos aromáticos foi baseado na diferença entre as áreas dos picos, gerados pela análise de CLAE, dos cultivos comparados com controles sem inóculo contendo os ácidos como fonte de carbono, sendo calculada assim a porcentagem de degradação. A **Tabela 4.2** mostra o tempo de retenção dos padrões dos ácidos p-hidroxibenzóico, benzóico e salicílico.

Tabela 4.2: Tempo de retenção dos ácidos aromáticos analisados por CLAE

Ácido Aromático	Tempo de retenção (minutos)
Ácido p-hidroxibenzóico	4,14
Ácido Benzóico	6,73
Ácido Salicílico	7,20

4.2.8 Crescimento das linhagens de haloarquéias em hidrocarbonetos aromáticos policíclicos com adição de extrato de levedura

A resposta de crescimento pelas linhagens de haloarquéias em presença de diferentes HAPs (1,5 mM – 0,3 mM de cada), – naftaleno, antraceno, fenantreno, pireno, 1,2 benzoantraceno, com adição de extrato de levedura, foram determinadas visualmente.

4.2.8.1 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado com células crescidas em 50 mL de meio MC (com 0,3% de extrato de levedura) e 0,1% de vitaminas, mantidos a 38,5 °C, sob agitação de 150 rpm, por 168 horas.

A partir daí 40 mL das culturas foram centrifugadas por 10 minutos, a 3000 g e 5 °C. A metade da massa celular total foi transferida para 50 mL de meio líquido MC suplementados com 0,1% da solução de vitaminas, 0,3 mM de cada HAP e 0,05% de extrato de levedura incubados a 38,5 °C, sob agitação de 150 rpm, por 168 horas. Foi preparado um controle sem inóculo de células (controle abiótico), mantidos nas mesmas condições dos cultivos. A mesma forma de observação da **Tabela 4.1** foi utilizada.

4.2.9 Crescimento das linhagens de haloarquéias em hidrocarbonetos aromáticos policíclicos como única fonte de carbono

A resposta de crescimento pelas linhagens de haloarquéias à presença de diferentes HAPs (1,5 mM – 0,3 mM naftaleno, antraceno, fenantreno, pireno e 1,2 benzoantraceno), sem adição de extrato de levedura, foram determinadas visualmente. O preparo do inóculo foi realizado como descrito no item 4.2.8.1, porém sem a adição de 0,05% de extrato de levedura.

4.2.10 Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

Os HAPs foram inicialmente extraídos para posterior análise no cromatógrafo. A extração dos hidrocarbonetos do meio de cultura foi feita, por três extrações seguidas, em funil de decantação contendo 20 mL de diclorometano cada. As amostras foram então levadas ao rota-evaporador, até a total evaporação do diclorometano, e posteriormente ressuspensas em acetonitrila (SHUTTLEWORTH; CERNIGLIA, 1996 adaptado).

A análise quantitativa dos compostos poliaromáticos foram realizadas através de CLAE, utilizando-se uma coluna com fase reversa, ZORBAX C₁₈, um sistema isocrático de solventes com fase móvel constituído de acetonitrila : água, na proporção 70 : 30 (v/v), vazão de 0,6 mL/min e detecção a 254 nm. O volume injetado foi de 20 µL e os compostos foram identificados através do tempo de retenção. Foi então realizada uma comparação com substâncias padrões. A degradação foi calculada pela injeção de amostras controle que sofreram as mesmas condições de agitação, tempo, temperatura e extração que as amostras analisadas, porém não continham o inóculo de microrganismos. Calculou-se então a diferença entre as áreas dos picos da amostra e do controle, sendo calculada assim a porcentagem de degradação. As amostras foram injetadas duas vezes e o resultado das médias foi considerado (NEVES, 2002 adaptado).

O cálculo da degradação dos HAPs foi baseado na comparação entre as áreas dos picos, gerados pela análise de CLAE, dos cultivos comparados com controles sem inóculo contendo os HAPs como fonte de carbono. A **Tabela 4.3** mostra o tempo de retenção dos padrões dos HAPs, naftaleno, fenantreno, antraceno, pireno e 1,2-benzoantraceno.

Tabela 4.3: Tempo de retenção dos padrões de HAPs

HAP	Tempo de Retenção (minutos)
Naftaleno	6,5
Fenantreno	9,95
Antraceno	11,06
Pireno	14,61
1,2-Benzoantraceno	19,05

4.2.11 Identificação das linhagens de haloarquéias

A identificação das linhagens foi realizada através da análise da sequência do gene RNA ribossomal 16S, segundo a metodologia descrita a seguir.

4.2.11.1 Extração de DNA

O DNA genômico das linhagens halofílicas foi obtido através de 3 metodologias distintas, a extração com Fenol-clorofórmio, o método de CTBA descrito por Ausubel et al., (1989) e a utilização do Kit de extração AcquaPure[®] (BioRad) conforme a descrição do fabricante, quando houve a necessidade de um DNA mais puro, como por exemplo, para digestão de DNA por endonucleases de restrição.

4.2.11.1.1 Método de Fenol:clorofórmio

Um volume de 5 mL da cultura crescida foi centrifugada a 3000 g durante 10 minutos, o sobrenadante foi eliminado e o pellet foi ressuspenso em 1,8 mL de tampão de lise celular (40 mM EDTA, 50 mM Tris-base, 0,75 M Sacarose, pH 8,3) e 50 µL de lisozima (1mg.mL⁻¹). Essa mistura foi incubada a 37 °C por 45 minutos. Foram adicionados 50 µL de Proteinase K e 20 µL de SDS a 10%. A mistura foi incubada por 1 hora a 55 °C. Com o mesmo volume de amostra foram realizadas duas extrações consecutivas com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), a misturada foi levada ao Vortex e posteriormente centrifugada por 10 minutos a 3000 g. A fase aquosa foi recuperada em um

novo tubo e foi repetido o mesmo processo. Foram adicionados 2 mL de clorofórmio :álcool isoamílico (24:1), e a mistura foi levada ao Vortex e posteriormente centrifugada nas mesmas condições. O sobrenadante foi recuperado e foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto e 0,2 volume de acetato de amônio 4 M. O conteúdo foi misturado e colocado em freezer a -20 °C por 30 minutos ou mais. O tubo foi centrifugado a 4 °C a 2500 g durante 30 minutos. O sobrenadante foi eliminado e o DNA lavado com etanol 70%. O tubo foi centrifugado 1 minuto a 4 °C a 2500 g. Após a retirada do etanol o tubo foi deixado aberto para a evaporação total do etanol e o DNA final foi ressuspensionado em água MilliQ estéril.

4.2.11.1.2 Método CTAB

Foi centrifugada 1,0 mL de cultura em fase exponencial de crescimento em tubos tipo Eppendorf de 1,5 ou 2,0 mL por 20 minutos a 18000 g. O *pellet* foi ressuspensionado em 420 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM), e foram adicionados 30 µL de SDS 10 %, 6 µL de Proteinase K (10 mg.mL⁻¹), 6 µL de RNase (10 mg.mL⁻¹) e 37,5 µL (4 mg.mL⁻¹). A mistura foi incubada por 2 horas a 37 °C. Foram adicionados 100 µL de NaCl 5 M. A amostra foi mesclada sem utilizar o Vortex. Foram adicionados 80 µL de CTAB/NaCl (CTAB 10% em NaCl 0,7 M aquecida a 65 °C até total homogeneização). Com um volume de cloroformio/isoamílico (24:1) foi realizada a extração misturando bem os componentes. A mistura foi centrifugada 5 minutos a 18000 g. Em seguida foi recuperada a fase aquosa em outro eppendorf e repetida a extração por 1 ou 2 vezes. O DNA foi precipitado com 0,6 volume de isopropanol a 4 °C. A mistura foi mesclada suavemente e centrifugada 15 minutos a 18000 g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado com uma pipeta. Após a evaporação do álcool o *pellet* foi ressuspensionado em 52 µL de água MilliQ ou TE. A concentração de DNA foi medida através da leitura da absorbância a 260 nm (uma A₂₆₀ de 0,1 equivale a uma concentração de DNA

de 5,0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). As amostras de DNA foram ajustadas para uma concentração final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. O DNA foi visualizado em um gel de agarose a 2%.

4.2.11.2 Eletroforese de DNA em géis de agarose

O DNA genômico obtido foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 2% impregnado com brometo de etídio e foi observado sob raios ultravioleta. Esta técnica foi realizada em géis horizontais de agarose, com uma concentração variável entre 0,5 e 2% submersos em um tampão TAE (1x) (Tampão TAE 50x: 57,1 mL ácido acético glacial; 100 mL EDTA 50 mM, pH; 242 g Tris base; água destilada c.s.p. 1000 mL) e preparados com o mesmo tampão. A visualização do DNA foi feita através do uso de luz ultravioleta a 360 nm, em géis corados com brometo de etídio, (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

As massas moleculares dos fragmentos de DNA foram calculadas mediante a curva massa molecular-mobilidade, obtida segundo as distâncias de migração dos fragmentos *HindIII* do DNA estandar λcl857 Sam7 (Roche).

4.2.11.3 Amplificação do Gene que codifica o fragmento 16S do RNAr nas linhagens estudadas

A identificação das linhagens de haloarquéias foram feitas através do seqüenciamento parcial do gene RNA ribossomal 16S. Foram utilizados, para amplificação do gene, os *primers* ARCH R e ARCH F (Whitford et al., 2004). A reação em cadeia da polimerase foi feita em um volume de 50 μL contendo 5 μL de tampão com MgCl_2 10X (Eppendorf), 8 μM dNTP's (desoxirribonucleotídeos trifosfatados), 2,5 μL de cada primer (diluído 1:9 de água MilliQ), 0,5 μL de Taq Polimerase (Eppendorf), e 50-100 ng de DNA, nas seguintes condições: desnaturação 95 °C/5 min; 25 ciclos de desnaturação 94 °C/1 min, anelamento 50 °C/1 min, extensão 72 °C/2 min; extensão final 72 °C/10

min. O produto amplificado foi analisado em gel de agarose a 1% usando um marcador de peso molecular DNA Ladder de 1 Kb para confirmar o tamanho do fragmento.

4.2.11.4 Sequenciamento do produto de PCR

O produto amplificado foi seqüenciado em sequenciador automático modelo 3100 (Applied Biosystems) segundo o protocolo do fabricante, pela empresa NewBiotechnic (NBT, Sevilha-Espanha).

4.2.11.5 Comparação das seqüências de DNA com o banco de dados

As seqüências obtidas no sequenciamento foram, então, processadas no programa phred/Phrap/CONSED versão Linux (EWING et al., 1998; GODON et al., 1997) para a montagem dos *contigs*. A seqüência com aproximadamente 1000 pb foi submetida à comparação nos bancos de dados, Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e Ribosomal Data Project II 9.0 (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>).

4.2.11.6 Construção das árvores filogenéticas

As seqüências recuperadas dos bancos de dados foram alinhadas no programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1997), editadas no BIOEDIT (HALL, 1999) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 4 (KUMAR et al., 2007). A matriz de distância evolutiva foi calculada com o modelo de Kimura (KIMURA, 1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens (FELSENSTEIN, 1985).

4.2.12 Amplificação dos genes de catabólicos em haloarquéias por PCR

A determinação da presença de genes catabólicos de interesse foi realizada utilizando-se o termociclador Robot (Eppendorf), com o DNA proveniente de microrganismos isolados.

As reações foram preparadas em volumes finais de 50 µL. Os oligonucleótidos que foram utilizados estão descritos na **Tabela 4.4**.

Tabela 4.4: Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de genes responsáveis pela degradação de compostos aromáticos

Oligonucleótido	Sequência	enzima		autor
Cat 1 e Cat 3	Cat1 5'ACCATCGARGGYCCSCTSTAY-3'	Catecol	1,2	García et al., 2005.
	Cat3 5'GTTRATCTGGGTGGTSAG-3'	dioxigenase		
Pro3.4.2 e Pro3.4.4	pro3.4.2	Protocatechuato	3,4	
	5'GCSCCSCTSGAGCCSACTTC-3'	dioxigenase		
	pro3.4.4			
	5'GCCGCGSAGSACGATRTCGAA-3'			
139f/993r	139 f , TGG AAG TGG GAA GAC ATC GAG GC; 993r , TCG TGG TGG TGA ATC TCG TC;	Gentisato	1,2	Fairley et al., 2006
		dioxigenase		

Os genes que codificam para dioxigenases bacterianas como catecol-1,2-dioxigenase e protocatecuato-3,4-dioxigenase foram amplificados utilizando *primers* degenerados, de acordo com García e colaboradores (2005a).

As reações de PCR para amplificação dos genes catabólicos foram realizadas com todas as linhagens estudadas.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Enriquecimento para isolamento de linhagens de haloarquéias de salinas brasileiras

Foram isolados 6 microrganismos das salinas de Arraial do Cabo-RJ e 1 das salinas de Nossa Senhora do Socorro-SE (**Figura 4.1**).

Na **Tabela 4.5**, estão dispostas as linhagens isoladas. Apenas AR71 apresentou verdadeiro potencial de degradação dos ácidos p-hidroxibenzóico e benzóico (estudos preliminares), sendo assim a linhagem AR71 teve seu DNA extraído e foi identificada.

Tabela 4.5: Relação de linhagens isoladas de salinas brasileiras

Linhagem	Substratos	Local de coleta
T3A	4HBA + extrato	Arraial do Cabo-RJ
AR71	4HBA + extrato	Arraial do Cabo-RJ
1	4HBA + piruvato	Arraial do Cabo-RJ
2	4HBA + piruvato	Arraial do Cabo-RJ
4	4HBA + piruvato	Arraial do Cabo-RJ
5	4HBA + piruvato	Arraial do Cabo-RJ
SE1	4HBA	Nossa Senhora do Socorro-SE



Figura 4.1: Salinas de Nossa Senhora do Socoro-SE

4.3.2 Crescimento das linhagens de haloarquéias em compostos monoaromáticos com adição ou não de extrato de levedura

Quando o meio composto pela junção dos três ácidos aromáticos foi suplementado com extrato de levedura todas as linhagens estudadas apresentaram crescimento. Quatro linhagens apresentaram melhor crescimento: BO6, AA31, AA41 e CL47 (**Tabela 4.6**). As **Figuras 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5** apresentam o crescimento das linhagens em meio contendo os ácidos aromáticos.

Quando o meio não foi suplementado com extrato de levedura somente duas linhagens apresentaram crescimento regular – AA35 após 168 horas de crescimento e AA41 após 72 horas.

Tabela 4.6: Crescimento de haloarquéias em ácidos aromáticos. 1,5 mM de ácido p-hidroxibenzóico, 1,5 mM de ácido benzóico e 1,5 mM de ácido salicílico, suplementado ou não com 0,05% de extrato de levedura

Linhagens	Crescimento					
	48 horas		72 horas		168 horas	
	Sem extrato	Com extrato	Sem extrato	Com extrato	Sem extrato	Com extrato
BO3	+	++	+	++	+	++
BO6	+	+++	+	+++	+	+++
BO7	+	++	+	++	+	++
PR13	+	++	+	++	+	++
MM17	+	++	+	++	+	++
MM27	+	++	+	++	+	++
AA31	+	++	+	+++	+	+++
AA35	+	++	+	++	++	++
AA41	++	+++	++	+++	++	+++
CL47	+	++	+	++	+	+++
<i>H. volcanii</i>	+	++	+	++	+	++

+ pouco crescimento
 ++ crescimento regular
 +++ crescimento bom

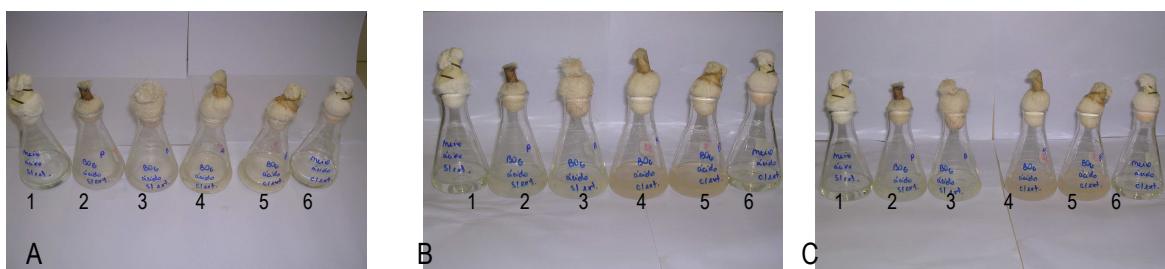


Figura 4.2: Crescimento da linhagem BO6 em ácidos aromáticos – 1) Controle sem extrato de levedura, 2 e 3) inóculo sem extrato de levedura, 4 e 5) inóculo com extrato de levedura e 6) controle com extrato de levedura. A) inóculo no tempo 0 hora; B) inóculo no tempo 48 horas e C) inóculo no tempo 168 horas

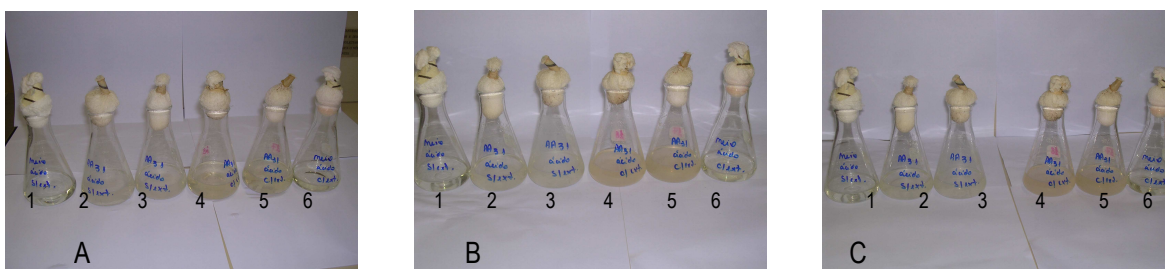


Figura 4.3: Crescimento da linhagem AA31 em ácidos aromáticos – 1) Controle sem extrato de levedura, 2 e 3) inóculo sem extrato de levedura, 4 e 5) inóculo com extrato de levedura e 6) controle com extrato de levedura. A) inóculo no tempo 0 hora; B) inóculo no tempo 48 horas e C) inóculo no tempo 168 horas

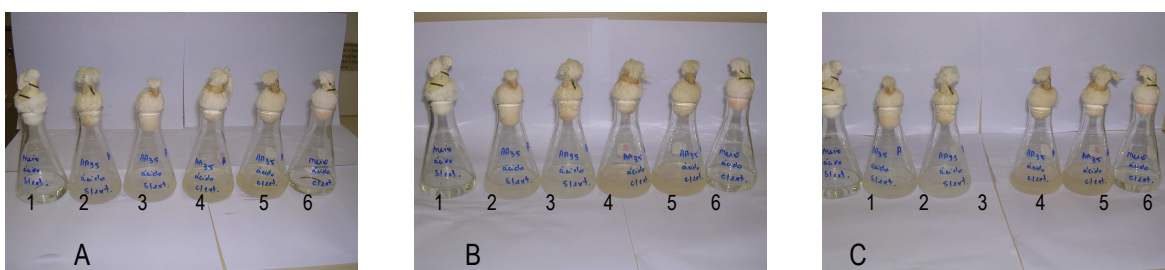


Figura 4.4: Crescimento da linhagem AA35 em ácidos aromáticos – 1) Controle sem extrato de levedura, 2 e 3) inóculo sem extrato de levedura, 4 e 5) inóculo com extrato de levedura e 6) controle com extrato de levedura. A) inóculo no tempo 0 hora; B) inóculo no tempo 48 horas e C) inóculo no tempo 168 horas

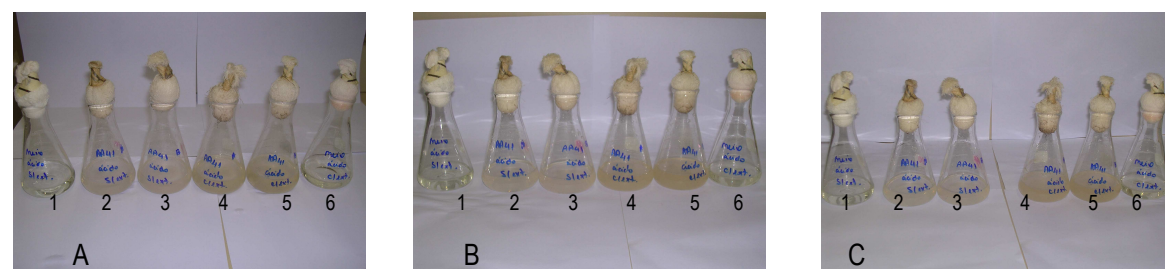


Figura 4.5: Crescimento da linhagem AA41 em ácidos aromáticos – 1) Controle sem extrato de levedura, 2 e 3) inóculo sem extrato de levedura, 4 e 5) inóculo com extrato de levedura e 6) controle com extrato de levedura. A) inóculo no tempo 0 hora; B) inóculo no tempo 48 horas e C) inóculo no tempo 168 horas

Até o momento, o metabolismo aeróbico de um número restrito de compostos aromáticos só foi demonstrado para dois isolados de haloarquérias. A linhagem *Haloferax* sp. D1227 (EMERSON et al., 1994) foi capaz de crescer em benzoato, cinamato, fenil-propionato e 3-hidroxibenzoato (FU; ORIEL, 1999), mas não em p-hidroxibenzoato ou 2-hidroxibenzoato. A linhagem *Haloarcula* sp. D1 (FAIRLEY et al., 2002) foi capaz de crescer em benzoato e p-hidroxibenzoato, mas não em 3-hidroxibenzoato ou 2-hidroxibenzoato.

4.3.2 Degradação de ácidos monoaromáticos

A degradação dos ácidos foi mais intensa quando as haloarquérias foram inoculadas em meio sem adição de extrato de levedura (**Tabela 4.6 e Figuras 4.6, 4.7 e 4.8**). Dos três ácidos estudados, o p-hidroxibenzóico teve a menor porcentagem de degradação, quando comparado aos demais. A melhor degradação foi observada quando foi cultivada a linhagem AA35 sem adição de extrato de levedura (8,98%). Este resultado corrobora com os resultados de crescimento nos ácidos aromáticos (**Tabela 4.7 e Figura 4.4**), o qual se observa que a linhagem AA35 apresentou um bom crescimento em 72 horas de cultivo. As linhagens BO3, BO6, BO7, PR13, AA41, CL47, e *H. volcanii* também degradaram o ácido p-hidroxibenzóico sem acréscimo do extrato de levedura (3,52%, 2,73%, 0,24%, 1,57%, 0,41%, 5,73% e 4,61%, respectivamente). Somente a linhagem BO6 apresentou degradação desse ácido quando cultivada em presença de 0,05% de extrato de levedura (3,35%).

Todas as linhagens apresentaram degradação do ácido benzóico quando inoculadas sem adição de extrato de levedura. Os melhores resultados foram apresentados pelas linhagens *H. volcanii* (28,32%), CL47 (23,46%) e MM27 (15,35%). As linhagens BO3, BO6, BO7, PR13, MM17, AA31, AA35, AA41, apresentaram degradação (9,44%, 4,38%, 3,75%, 7,86%, 5,00%, 10,84%, 10,12% e 13,23%, respectivamente).

Quando cultivadas na presença de extrato de levedura, poucas linhagens apresentaram degradação do ácido benzóico. A linhagem BO6 que teve um ótimo crescimento (**Tabela 4.7 e Figura 4.2**) quando cultivada neste meio degradou 10,95%. A linhagem *H. volcanii* foi a que melhor degradou (11,09%). As linhagens PR13 e AA41 apresentaram degradação de 3,48% e 3,63%, respectivamente.

O ácido salicílico foi o mais degradado pelas linhagens estudadas quando os meios não continham extrato de levedura. Todas as linhagens degradaram pelo menos 1,04% (AA31) desse composto. O melhor resultado foi obtido para a linhagem CL47 (32,25%), seguido de *H. volcanii* (31,52%). A linhagem AA35 também apresentou boa porcentagem de degradação (22,67%). BO3, BO6, PR13, MM17, MM27e AA41 tiveram respectivamente as seguintes resultados de degradação: 20,59%; 16,38%; 14,48%; 19,95%; 13,74%; 18,75 e 7,60%.

Apenas as linhagens BO6 e *H. volcanii* degradaram o ácido salicílico quando o meio foi acrescido de extrato de levedura (6,72% e 10,58%, respectivamente).

Provavelmente o fato das linhagens não terem apresentado altas taxas de degradação quando inoculadas em meio com adição de extrato de levedura, pode estar relacionado a inibição da expressão dos genes de degradação quando existe uma fonte de carbono mais prontamente assimilável como um composto complexo que é o extrato de levedura. Porém, sendo os ácidos aromáticos uma fonte mais simples de energia e de difícil utilização quando comparados ao extrato de levedura, a massa celular (crescimento celular) foi bastante reduzida.

Segundo Borgne e colaboradores (2008), poucas espécies são isoladas quando o ácido benzóico é utilizado como única fonte de carbono e energia.

Tabela 4.7: Degradação dos ácidos aromáticos p-hidroxibenzoico, benzoico e salicílico, pelas haloarquérias com ou sem adição de 0,05% de extrato de levedura

Linhagens	Degradação (%)					
	Ácido p-hidroxibenzoico		Ácido benzoico		Ácido Salicílico	
	Sem extrato	Com extrato	Sem extrato	Com extrato	Sem extrato	Com extrato
BO3	3,52	0,00	9,44	0,00	20,59	0,00
BO6	2,43	3,35	4,38	10,95	16,38	6,72
BO7	0,24	0,00	3,75	0,00	14,48	0,00
PR13	1,57	0,00	7,86	3,48	19,95	0,00
MM17	0,00	0,00	5,00	0,00	13,74	0,00
MM27	0,00	0,00	15,35	0,00	18,75	0,00
AA31	0,00	0,00	10,84	0,00	1,04	0,00
AA35	8,98	0,00	10,12	0,00	22,67	0,00
AA41	0,41	0,00	13,23	3,63	7,60	0,00
CL47	5,73	0,00	23,46	0,00	32,25	0,00
<i>H. volcanii</i>	4,61	0,00	28,32	11,09	31,52	10,58

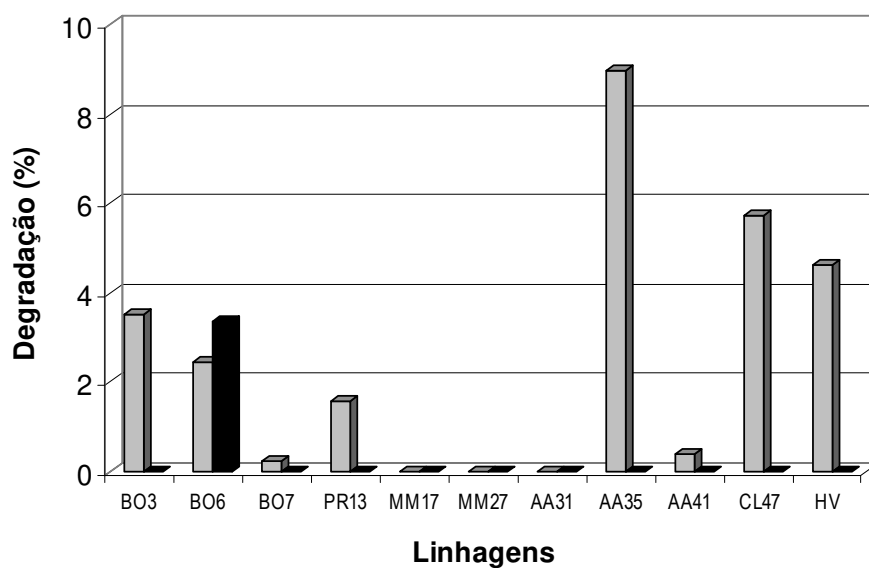


Figura 4.6: Degradação do ácido p-hidroxibenzoico em meio sem acréscimo de extrato de levedura ■ ou com acréscimo de extrato de levedura ■, pelas linhagens de haloarquérias cultivadas por 168 h a 38,5 °C

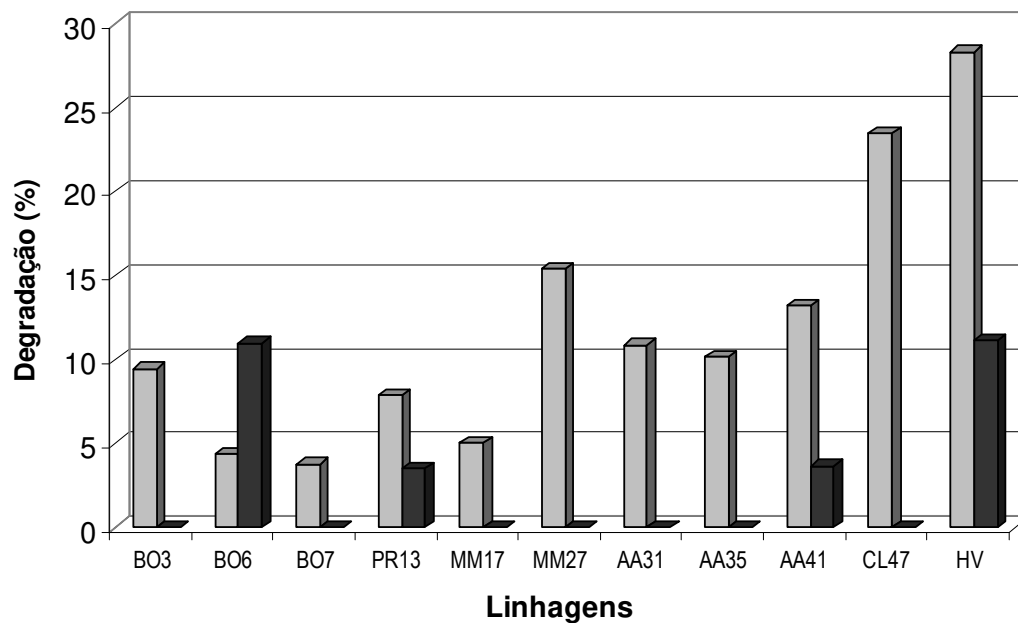


Figura 4.7: Degradação do ácido benzóico em meio sem acréscimo de extrato de levedura ■ ou com acréscimo de extrato de levedura ■, pelas linhagens de haloarquéias cultivadas por 168 h a 38,5 °C

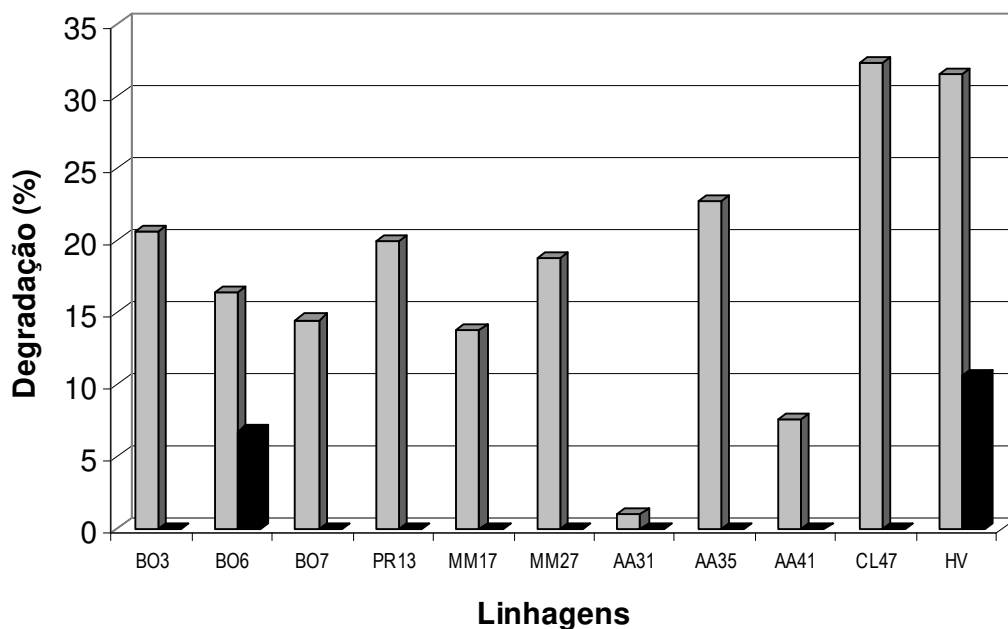


Figura 4.8: Degradação do ácido salicílico em meio sem acréscimo de extrato de levedura ■ ou com acréscimo de extrato de levedura ■, pelas linhagens de haloarquéias cultivadas por 168 h a 38,5 °C

Até o momento, poucas linhagens de haloarquéias foram estudadas quanto à degradação de ácidos aromáticos. *Haloferax* sp. D1227 foi o primeiro exemplo reportado da utilização de compostos aromáticos como benzoato, cinamato e fenilpropionato, como única fonte de carbono e energia para o crescimento (Emerson et al., 1994). Esta linhagem foi isolada a partir de solo contaminado com petróleo e com alta salinidade em um poço no Estado de Michigan (EUA). A degradação do ácido 3-fenilpropionico por essa linhagem foi estudada para examinar a estratégia de metabolizar compostos aromáticos. *Haloferax* sp. D1227 metaboliza este ácido por meio da quebra inicial da cadeia pela via benzoilCoA, uma via similar a β -oxidação lipídica, seguida pela degradação aromática usando a via da gentisato (Fu; Oriel, 1999).

Em estudos publicados em 2002 a linhagem de haloarquéia *Haloarcula* sp. D1 apresentou crescimento aeróbico em ácido p-hidroxibenzóico como única fonte de carbono e energia através de uma rota metabólica incomum. Enquanto a maioria das bactérias metaboliza ácido p-hidroxibenzóico através de hidroxilação formando ácido protocatecóico, que serve como molde para a clivagem do anel, esta arqueia metaboliza o ácido p-hidroxibenzóico através do ácido gentísico. Gentisato foi detectado nas culturas crescidas como ácido p-hidroxibenzóico, e atividade de gentisato 1,2-dioxigenase foi detectada ao mesmo tempo em que se acumulou gentisato (Fairley et al., 2002). Entretanto, organismos fisiologicamente similares, como *Haloferax mediterrani* e *Haloarcula hispanica*, não apresentaram crescimento em substratos aromáticos (Emerson et al., 1994).

4.3.4 Crescimento das linhagens de haloarquéias em compostos aromáticos policíclicos com adição ou não de extrato de levedura

Quando o meio contendo HAPs foi suplementado com extrato de levedura, todas as linhagens apresentaram crescimento após 72 horas. Apenas a linhagem BO7 apresentou

crescimento após 48 horas do inóculo. Cinco linhagens apresentaram crescimento ótimo após 168 horas – BO7, PR13, MM17, MM27 e *H. volcanii* (Tabela 4.8). As Figuras 4.9, 4.10, 4.11, 4.12 e 4.13 apresentam o crescimento das linhagens em meio contendo HAP.

Quando o meio contendo HAPs não foi suplementado com extrato de levedura apenas a linhagem BO7 apresentou crescimento regular mesmo após 72 horas, e as outras linhagens apresentaram baixo crescimento.

Raghavan e Furtado (2000) determinaram a resposta de crescimento do isolado *Halobacterium* sp. R1 em presença de 10 diferentes hidrocarbonetos aromáticos, e constataram que houve redução, mas não inibição do crescimento.

Tabela 4.8: Crescimento das linhagens em meio contendo HAPs (0,3 mM de naftaleno, 0,3 mM de fenantreno, 0,3 mM de antraceno, 0,3 mM de pireno e 0,3 mM de 1,2 benzoantraceno, suplementado com 0,05% de extrato de levedura)

Linhagens	Crescimento					
	48 horas		72 horas		168 horas	
	Sem extrato	Com extrato	Sem extrato	Com extrato	Sem extrato	Com extrato
BO3	-	-	+	+	+	++
BO6	-	-	+	+	+	++
BO7	+	+	++	++	++	+++
PR13	-	-	+	++	+	+++
MM17	-	-	+	++	+	+++
MM27	-	-	+	++	+	+++
AA31	-	-	+	+	+	++
AA35	-	-	+	+	+	++
AA41	-	-	+	+	+	++
CL47	-	-	+	+	+	++
<i>H. volcanii</i>	-	-	+	++	+	+++

- sem crescimento
+ pouco crescimento
++ crescimento regular
+++ crescimento bom

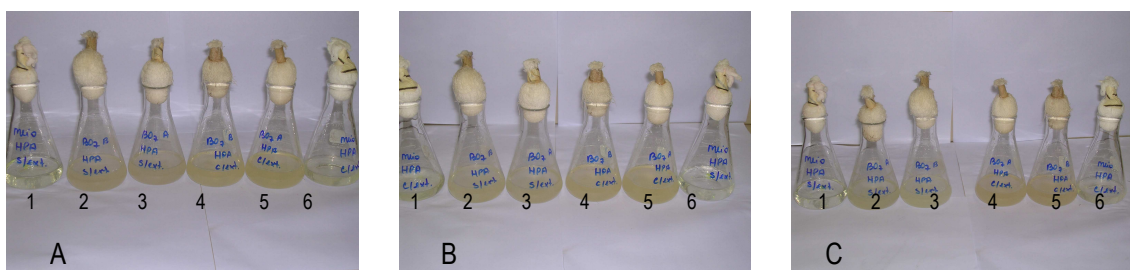


Figura 4.9: Crescimento da linhagem BO7 em HAPs – 1) Controle sem extrato de levedura, 2 e 3) inóculo sem extrato de levedura, 4 e 5) inóculo com extrato de levedura e 6) controle com extrato de levedura. A) inóculo no tempo 0 hora; B) inóculo no tempo 48 horas e C) inóculo no tempo 168 horas.

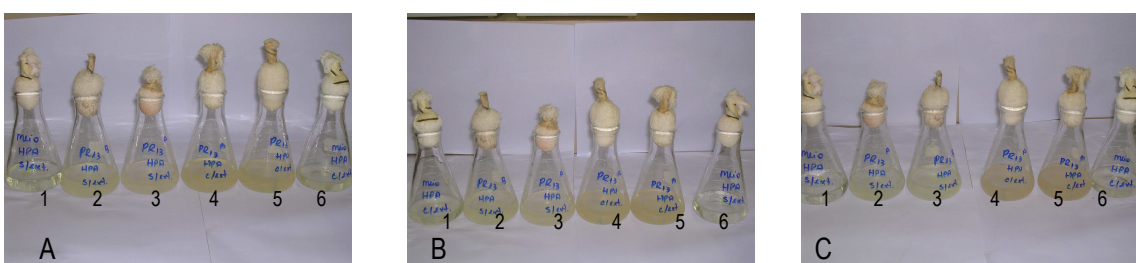


Figura 4.10: Crescimento da linhagem PR13 em HAPs – 1) Controle sem extrato de levedura, 2 e 3) inóculo sem extrato de levedura, 4 e 5) inóculo com extrato de levedura e 6) controle com extrato de levedura. A) inóculo no tempo 0 hora; B) inóculo no tempo 48 horas e C) inóculo no tempo 168 horas.

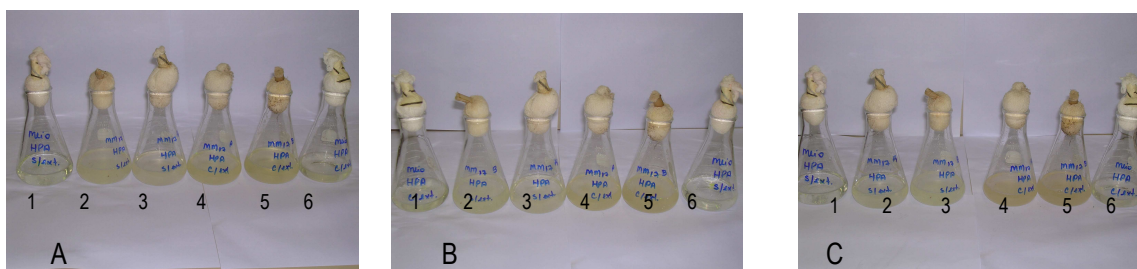


Figura 4.11: Crescimento da linhagem MM17 em HAPs – 1) Controle sem extrato de levedura, 2 e 3) inóculo sem extrato de levedura, 4 e 5) inóculo com extrato de levedura e 6) controle com extrato de levedura. A) inóculo no tempo 0 hora; B) inóculo no tempo 48 horas e C) inóculo no tempo 168 horas.

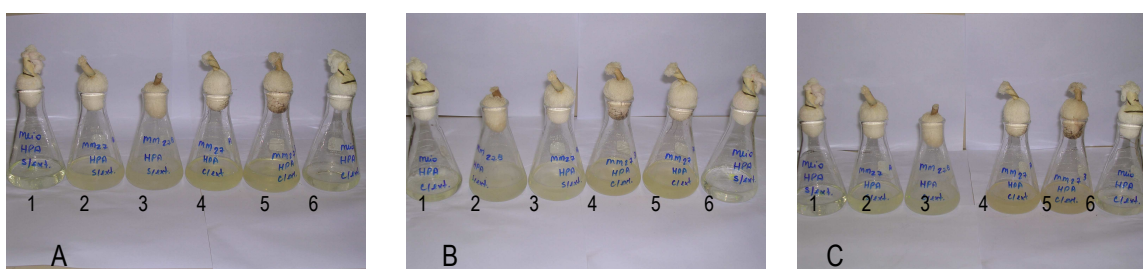


Figura 4.12: Crescimento da linhagem MM27 em HAPs – 1) Controle sem extrato de levedura, 2 e 3) inóculo sem extrato de levedura, 4 e 5) inóculo com extrato de levedura e 6) controle com extrato de levedura. A) inóculo no tempo 0 hora; B) inóculo no tempo 48 horas e C) inóculo no tempo 168 horas.

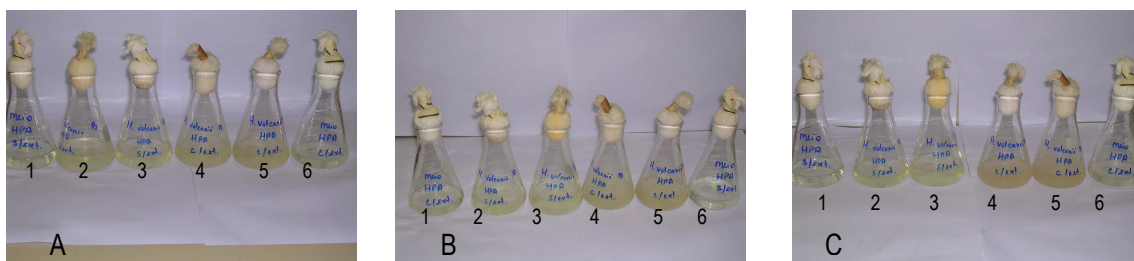


Figura 4.13: Crescimento da linhagem *H. volcanii* em HAPs – 1) Controle sem extrato de levedura, 2 e 3) inóculo sem extrato de levedura, 4 e 5) inóculo com extrato de levedura e 6) controle com extrato de levedura. A) inóculo no tempo 0 hora; B) inóculo no tempo 48 horas e C) inóculo no tempo 168 horas

4.3.5 Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

A degradação dos HAPs foi mais intensa quando os meios foram acrescidos de 0,05% de extrato de levedura (Tabela 4.9 e Figuras 4.14, 4.15, 4.16, 4.17 e 4.18) .

Tabela 4.9: Porcentagem de degradação de HAPs das linhagens em meios contendo extrato de levedura

Linhagem	Média da porcentagem de degradação de HAPs									
	Naftaleno		Antraceno		Fenantreno		Pireno		1,2benzoantraceno	
	Sem extrato	Com extrato	Sem extrato	Com extrato	Sem extrato	Com extrato	Sem extrato	Com extrato	Sem extrato	Com extrato
BO3	21,80	0,00	0,00	44,10	0,00	27,80	0,00	29,90	0,00	40,50
BO6	7,60	0,00	0,00	0,00	0,00	42,90	0,00	0,00	0,00	0,00
BO7	50,00	55,20	67,60	72,70	48,00	62,90	50,10	72,50	60,30	71,80
PR13	0,00	29,80	47,60	74,60	0,00	60,70	0,00	71,40	0,00	66,10
MM17	0,00	51,60	61,70	69,00	0,00	59,20	0,00	65,60	0,00	56,00
MM27	0,00	0,00	0,00	58,30	0,00	40,20	0,00	0,00	0,00	0,00
AA31	0,00	0,00	0,00	74,00	0,00	38,00	0,00	67,00	0,00	68,50
AA35	30,10	32,20	75,90	76,90	0,00	65,10	63,70	73,30	70,30	75,40
AA41	0,00	44,70	0,00	61,00	0,00	88,40	0,00	0,00	0,00	60,90
CL47	48,20	51,60	0,00	72,60	0,00	60,80	0,00	80,00	0,00	77,80
<i>H. v</i>	41,10	65,40	0,00	45,00	0,00	40,00	0,00	68,3	0,00	74,00

Neste caso o naftaleno foi degradado por sete linhagens (BO7, PR13, MM17, AA35, AA41, CL47 e *H. volcanii*), tendo a última apresentado a maior porcentagem de degradação (65,4%). Já quando o extrato de levedura não foi acrescido ao meio, seis linhagens degradaram o naftaleno (BO7, PR13, MM17, AA35, AA41, CL47 e *H. volcanii*), porém esta foi menos intensa que nos meios com extrato de levedura. A linhagem BO7 foi responsável pela maior degradação (50%).

Em meio contendo extrato de levedura o antraceno só não foi degradado pela linhagem BO6 e a maior degradação foi apresentada pela linhagem AA35 (76,9 %). Quatro linhagens apresentaram degradação do antraceno em meios sem extrato de levedura (BO7, PR13, MM17, AA35) sendo que novamente AA35 apresentou os melhores resultados (75,9%), ou seja, praticamente o mesmo de quando acrescida outra fonte de carbono.

O fenantreno foi degradado por todas as linhagens crescidas em meio contendo extrato de levedura, sendo a linhagem AA41 responsável pela maior degradação (88,4%). Já em meio sem extrato de levedura apenas a linhagem BO7 apresentou 48% de degradação.

Em meio acrescido do extrato de levedura apenas as linhagens BO6, MM27 e AA41 não degradaram o pireno, tendo CL47 degradado 80% deste HAP. Em meios em que o pireno foi a única fonte de carbono a degradação foi realizada apenas por BO7 (50%) e AA35 (63,7%).

O 1,2-benzoantraceno, em meio com adição de extrato de levedura, não foi degradado pelas linhagens BO6 e MM27. A maior degradação obtida em meio contendo extrato de levedura foi apresentada pela linhagem CL47 (77,8%). Em meio sem extrato de levedura foi verificado somente que as linhagens BO7 (60,3%) e AA35 (70,3%) apresentaram degradação.

As linhagens que mais se destacaram na degradação de todos os HAPs em meio com extrato de levedura foram BO7, MM17 e CL47. Já sem extrato de levedura foram BO7 e AA35.

Muitos autores reportam a habilidade de bactérias que oxidam HAPs. As bactérias *Arthrobacter* sp., *Beijerinckia* sp., *Flavobacterium* sp., *Mycobacterium* sp., *Pseudomonas putida*, *P. cepacia*, *P. paucimobilis*, *Rhodococcus* sp. Foram estudadas quanto a capacidade de degradarem antraceno (EVANS et al., 1965; FOGHT; WESTLAKE, 1988).

Mahaffey e colaboradores (1988) estudaram a capacidade de *Alcaligenes denitrificans*, *Beijerinckia* sp. E *P. putida* de oxidar 1,2-Benzoantraceno. A degradação de fenantreno também já foi estudada em diversas espécies como *P. putida*, *P. paucimobilis*, *Pseudomonas* sp. (STRINGFELLOW; AITKEN, 1995).

Grund e colaboradores (1992) estudaram a degradação do naftaleno via salicilato e gentisato em *Rhodococcus* sp. Esse mesmo microrganismo também foi estudado quanto à capacidade de degradar pireno (WATER et al., 1991).

Estudos de degradação de benzo(a)pireno com eubactérias, realizados por Juhasz e Naidu (2000), demonstraram que pode haver degradação do composto quando no meio de cultura é adicionado outra fonte de carbono que não o HAP em questão. Ye e colaboradores (1996) observaram que a concentração de benzo(a)pireno reduziu em apenas 5% por *Sphingomonas paucimobilis* após 168 horas. Entretanto com o acréscimo de 100 mg.L⁻¹ de extrato de levedura no meio houve uma remoção de 40% do composto no mesmo período de incubação.

Apesar de vários autores estudarem a capacidade de degradação de HAPs em bactérias não há dados reportados em literatura sobre a degradação destes compostos em haloarquérias.

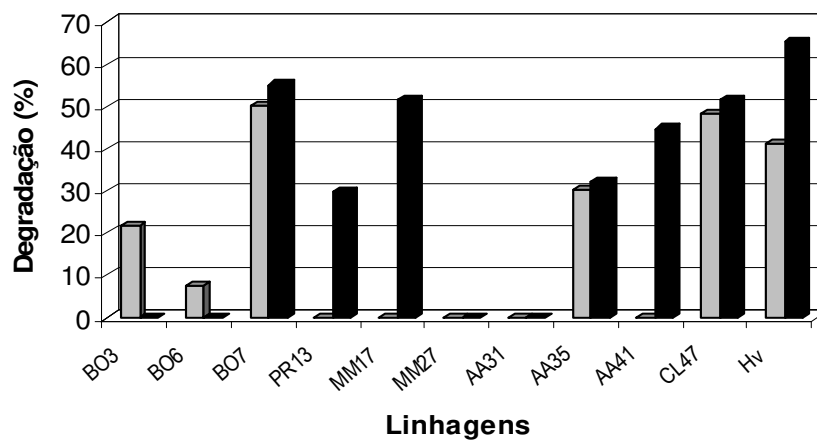


Figura 4.14: Degradação do naftaleno sem acréscimo de extrato de levedura ■ ou com acréscimo de extrato de levedura ■, pelas linhagens de haloarquérias cultivadas por 168 h a 38,5 °C

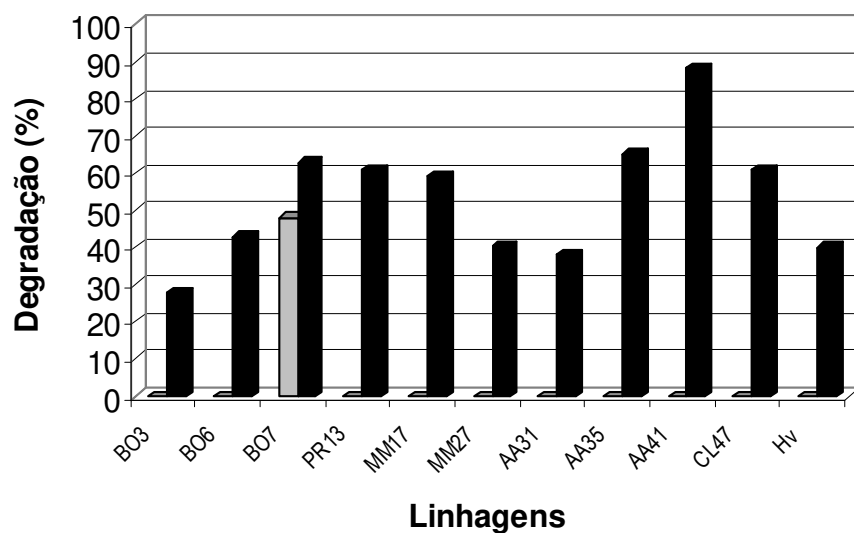


Figura 4.15: Degradação do fenantreno sem acréscimo de extrato de levedura ■ ou com acréscimo de extrato de levedura ■, pelas linhagens de haloarquérias cultivadas por 168 h a 38,5 °C

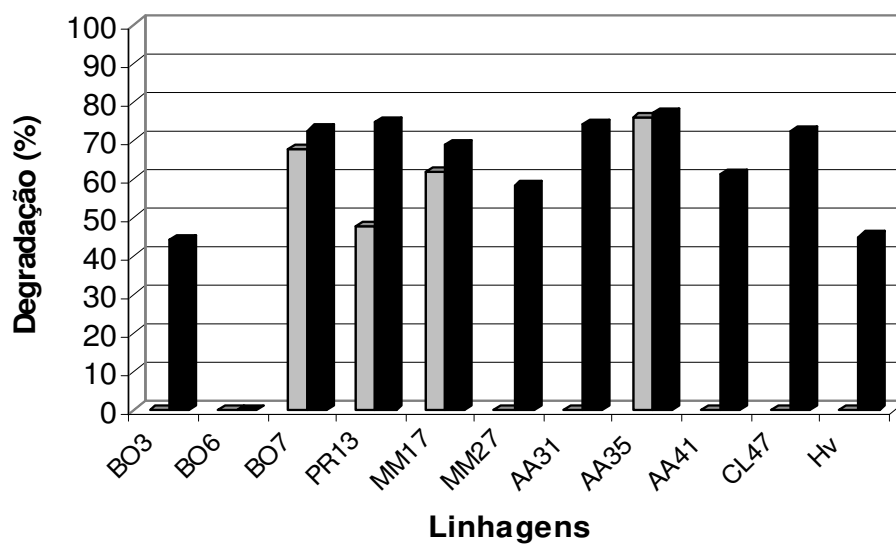


Figura 4.16: Degradação do antraceno sem acréscimo de extrato de levedura ■ ou com acréscimo de extrato de levedura ■, pelas linhagens de haloarquéias cultivadas por 168 h a 38,5 °C

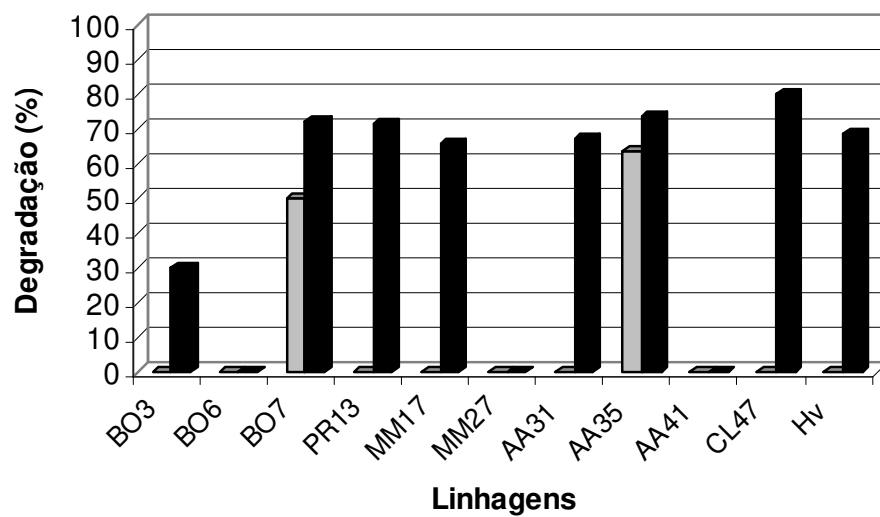


Figura 4.17: Degradação do pireno sem acréscimo de extrato de levedura ■ ou com acréscimo de extrato de levedura ■, pelas linhagens de haloarquéias cultivadas por 168 h a 38,5 °C

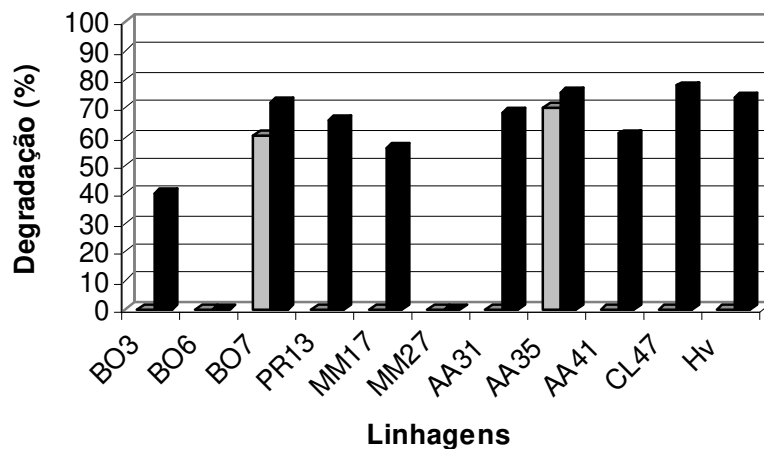


Figura 4.18: Degradação do 1,2-benzoantraceno sem acréscimo de extrato de levedura ■ ou com acréscimo de extrato de levedura ■, pelas linhagens de haloarquéias cultivadas por 168 h a 38,5 °C

4.3.6 Identificação através da amplificação do fragmento 16S do RNAr das linhagens de haloarquéias

A identificação das linhagens de haloarquéias foi feita por análise de seqüências do gene RNA ribossomal 16S. A **Figura 4.19** mostra a árvore filogenética construída.

A seqüência parcial do gene RNA ribossomal 16S da linhagem CL47 isolada das Salinas de Cahuil (Chile), em meio MM contendo 25% de sais após enriquecimento em ácido p-hidroxibenzóico (0,4 mM) como única fonte de carbono (CUADROS-ORELLANA, 2003) apresentou entre 98% de similaridade com seqüências de linhagens do gênero *Haloferax*, incluindo linhagens tipo. A reconstrução da árvore filogenética recuperou a linhagem CL47 num grupamento coeso com elevado valor de bootstrap (88%) com a linhagem tipo *Haloferax sulfurifortis* confirmando sua identificação.

A linhagem tipo *Haloferax sulfurifortis* foi isolada a partir de fontes ricas em sulfeto e enxofre no sudoeste de Oklahoma-EUA (ELSHAHED et al., 2004). Membro da família Halobacteriaceae são

microrganismos dominantes em ecossistemas hipersalinos, incluindo salinas, Mar Morto e lagos hipersalinos.

A sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das linhagens BO3, BO6 e B07 (isoladas do Salar de Uyuni-Bolívia), PR13 (isolada de salinas de Cabo Rojo-Porto Rico), MM17 e MM27 (isoladas do Mar Morto-Israel e Jordânia), AA31, AA35 e AA41 (isoladas do Green Lake-Arábia Saudita) e CL51 (isolada a partir das Salinas de Cahuil-Chile) isoladas em meio MM contendo 25% de sais e ácido p-hidroxibenzóico (0,4 mM) como única fonte de carbono (CUADROS ORELLANA, 2003) apresentaram entre 96% e 98% de similaridade com linhagens do gênero *Haloferax*, incluindo as linhagens tipo *H. alexandrinus*, *H. volcanii*, *H. denitrificans*, *H. lucentensis*, *H. prahovense* e *H. gibbonsii*. A reconstrução da árvore filogenética revelou um grupo formado pelas linhagens estudadas alocado no gênero *Haloferax*, mas filogeneticamente distante das espécies descritas e, portanto, sendo as linhagens identificadas como *Haloferax* sp.

O gênero *Haloferax* foi descrito pela primeira vez por Torreblanca e colaboradores (1986). Atualmente existem 8 espécies descritas *Haloferax volcanii* (MULLAKHANBHAI e LARSEN, 1975) *Haloferax mediterranei* (RODRIGUEZ-VALERA et al. 1983), *Haloferax denitrificans* (TOMLINSON et al. 1986), *Haloferax gibbonsii* (JUEZ et al. 1986), *Haloferax gomorrae* (OREN et al. 1995), *Haloferax lucentense* (GUTIERREZ et al. 2004), *Haloferax sulfurifontis* (ELSHAHED et al. 2004) e *Haloferax prahovense* (ENACHE et al. 2007). Este gênero é caracterizado pelo intenso pleomorfismo e pela baixa requisição de sal comparado com outros gêneros da família halobacteriaceae (ELSHAHED et al. 2004).

A partir dos dados analisados pode-se verificar que todos os isolados pertencem ao gênero *Haloferax*, a espécie *Halobacterium volcanii* é na verdade o mesmo que *Haloferax volcanii*. Este resultado já era esperado para os isolados analisados, já que em análises anteriores de lipídios

polares de membrana através de cromatografia de camada delgada realizados com os mesmos isolados apresentaram estes resultados (CUADROS-ORELLANA, 2003).

O fato de haver esta homogeneidade de gênero mesmo quando o isolamento foi realizado em diferentes locais (Chile, Bolívia, Arábia Saudita, entre outros) pode estar relacionado ao meio de cultivo utilizado para o isolamento descrito por Mevarech e Werczberger (1985), selecionando preferencialmente espécies do gênero *Haloferax* devido à sua composição salina.

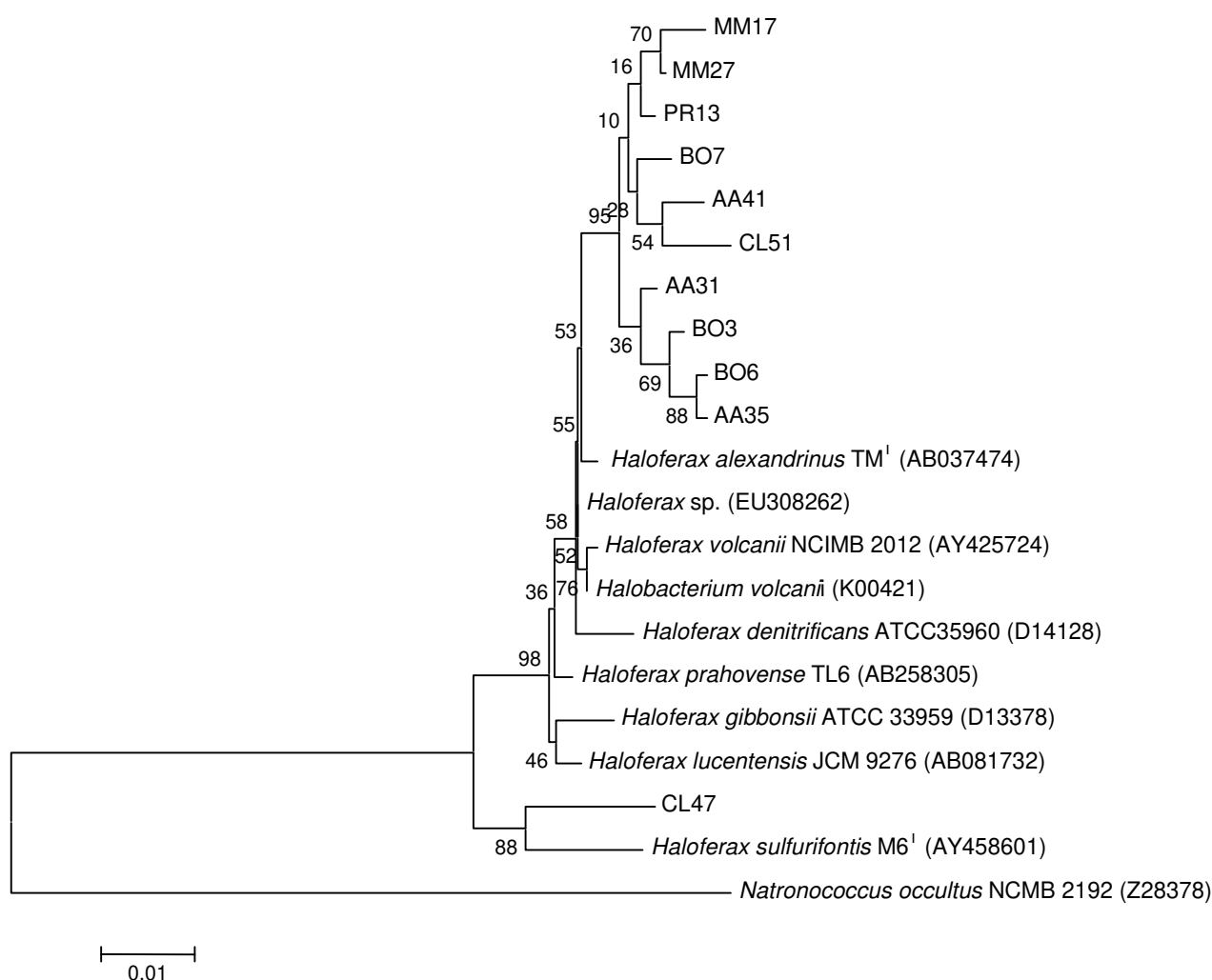


Figura 4.19: Análise filogenética de parte da sequência do gene de RNAr 16S das linhagens de holoarquéias da coleção do LSM e microrganismos relacionados do gênero *Haloferax*. As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Join*, com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens. Os números de acesso do Genbank estão listados após os nomes. *Natronococcus occultus* NCMB 2192 foi usada como *outgroup*

Além dessas linhagens, uma haloarquéia isolada nos trabalhos realizados no Brasil de uma salina em Arraial do Cabo-RJ (AR71), teve seu DNA extraído e foi realizada uma reação de PCR utilizando-se os *primers* para amplificação do gene que codifica o rRNA 16S (**Figura 4.20**).

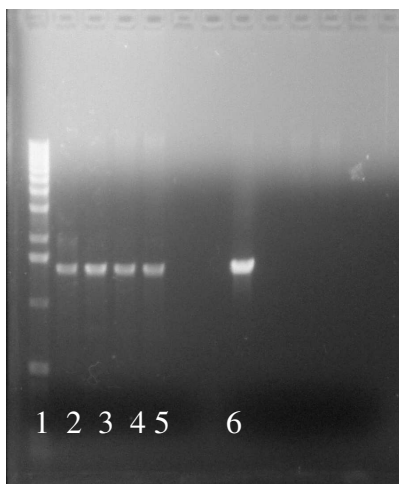


Figura 4.20: Gel de eletroforese contendo a reação de PCR para o 16S da haloarquéia AR71; 1) Marcador ladder de 1kb; 2 a 5) reação de PCR contendo diferentes concentrações de DNA (0,5 a 2,0 μ L); 6) controle positivo para reação de PCR para o 16S da haloarquéia *Halobacterium salinarium*

A seqüência parcial do gene RNA ribossomal 16S da linhagem AR71 isolada das Salinas de Arraial do Cabo-RJ em meio MM contendo 25% de sais após enriquecimento em ácido p-hidroxibenzóico (0,4 mM) como única fonte de carbono apresentou entre 98% de similaridade com a seqüência da linhagem *Halosarcina pallida*. A reconstrução da árvore filogenética recuperou a linhagem CL47 num grupamento com valor de bootstrap de 64% com a linhagem tipo *H. pallida* confirmando sua identificação. A **Figura 4.21** mostra a árvore filogenética construída.

A linhagem tipo *H. pallida* foi isolada a partir de fontes ricas em sulfeto e enxofre no sudoeste de Oklahoma-EUA (SAVAGE et al., 2008).

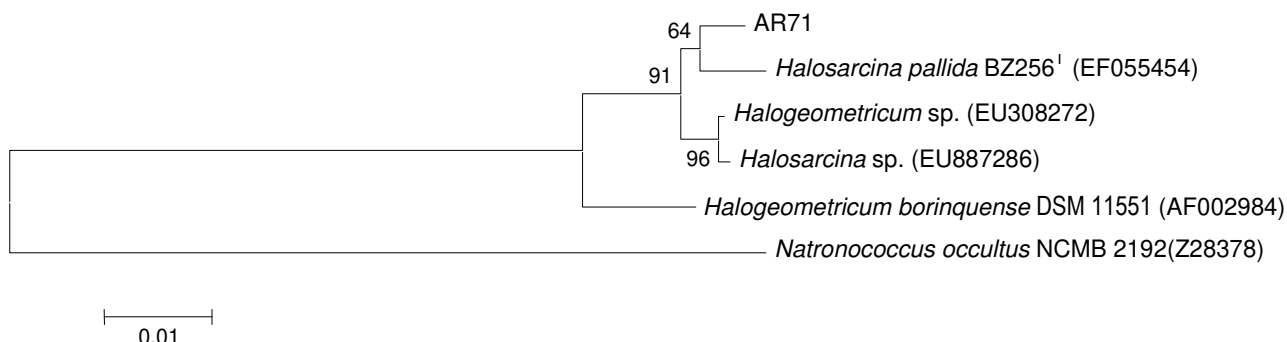


Figura 4.21: Análise filogenética de parte da sequência do gene de RNAr 16S da linhagem AR71 e microrganismos relacionados. As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Join*, com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens. Os números de acesso do Genbank estão listados após os nomes. *Natronococcus occultus* NCMB 2192 foi usada como *outgroup*

4.3.7 Amplificação dos genes de dioxigenases das haloarquéias por PCR

Reações de PCR para amplificação dos genes de dioxigenases foram estudadas para as linhagens de haloarquéias. Os *primers* para a enzima catecol 1,2 dioxigenase e protocatecuato 3,4 dioxigenase foram os mesmos utilizados para a linhagem *H. organivorans*. Neste caso, os genes não foram amplificados. Dois fatores podem estar relacionados a este resultado: o primeiro pode ser que o gene para estas duas enzimas não esteja presente no genoma da haloarquéias estudadas. O segundo fator pode estar relacionado aos *primers* terem sido construídos baseados em alinhamentos de aminoácidos e nucleotídeos de linhagens bacterianas dos gêneros *Pseudomonas*, *Halomonas* e *Burkholderia*, dessa forma, mesmo que estas dioxigenases estejam presentes em haloarquéias, seus genes podem ter domínios conservados diferente dos genes de bactérias.

As duas enzimas não foram encontradas nas haloarquéias estudadas neste projeto, o que pode sugerir que a degradação de compostos aromáticos por esse microrganismo seja realizada por outras rotas enzimáticas.

No caso da enzima gentisato 1,2-dioxigenase além do controle positivo utilizado (*Haloferax* sp. D1227), apenas a linhagem *Halococcus morhuaea* teve esse gene amplificado por PCR (**Figura 4.22**).

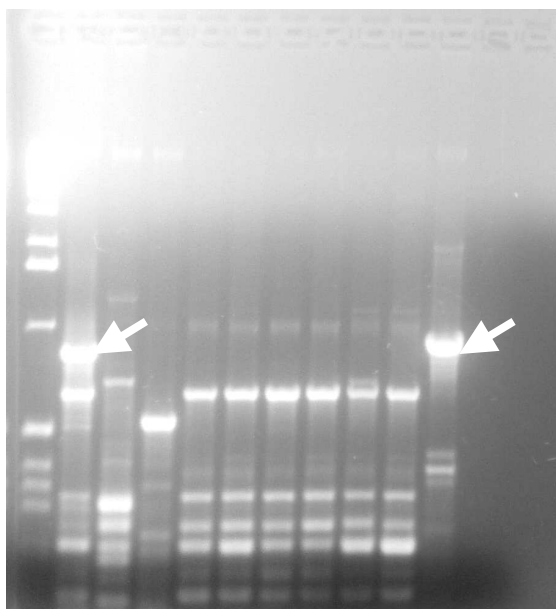


Figura 4.22: Gel de agarose com os produtos de PCR utilizando os *primers* para gentisato 1,2 dioxigenase (banda de 834 pb) 1 . Ladder (Invitrogen); 2. *Haloferax* sp. D1227 (controle positivo); 3. AR71; 4. BO7; 5. PR13; 6. MM17; 7. MM27; 8. AA31; 9. AA41; 10. *Halococcus morhuae*

Dados recentes obtidos por Fairley e colaboradores (2006) demonstraram a expressão do gene da gentisato 1,2-dioxigenase (*gdoA*) além de outros genes que codificam a putative coenzima A (CoA)-sintetase subunidade (*acdB*) e a CoA-tioesterase (*tieA*) quando *Haloferax* sp. D1227 e *Haloarcula* sp. D1 foram cultivadas em ácidos aromáticos. Na primeira linhagem o gene foi expresso

durante o crescimento em benzoato, 3-hidroxibenzoato, cinamato e fenilpropionato, e ambos *acdB* e *tieA* foram expressos durante o crescimento em benzoato, cinamato e fenilpropionato, mas não quando cultivados em 4-hidroxibenzoato (p-hidroxibenzóico). Entretanto, em *Haloarcula* sp. D1 *gdoA* foi expressado durante o crescimento em 4-hidroxibenzoato, mas não em benzoato, e os outros genes não foram expressos durante o crescimento em nenhum dos outros substratos aromáticos testados.

Outro fator a ser ressaltado é que podem ainda existir outros genes ligados à degradação destes compostos no domínio *Archaea*, pois os estudos nesta área são bastante recentes com as arqueias. Podendo, portanto ser ainda descobertas novas vias de degradação de compostos aromáticos.

4.4 Conclusões

- ✓ Quatro linhagens de haloarquéias apresentaram crescimento ótimo em ácidos aromáticos contendo extrato de levedura (BO6, AA31, AA41 e CL47), já em meios contendo somente ácidos aromáticos, as linhagens AA35 e AA41 apresentaram crescimento classificado como bom;
- ✓ A degradação dos ácidos aromáticos foi maior quando o meio não foi complementado com extrato de levedura;
- ✓ O ácido *p*-hidroxibenzóico foi o composto de menor degradação quando comparado aos demais ácidos, e a linhagem AA35 apresentou os melhores resultados em meio sem acréscimo de extrato de levedura (8,98%);
- ✓ O ácido benzóico foi degradado por todas as linhagens estudadas como única fonte de carbono, e *H. volcanii*, apresentou os melhores resultados quando inoculada sem acréscimo de extrato de levedura (28,32%);
- ✓ O ácido salicílico também foi degradado por todas as linhagens estudadas como única fonte de carbono e o melhor resultado foi observado na linhagem CL47 (32,25%);
- ✓ Quando inoculadas em HAPs acrescido de extrato de levedura as linhagens BO7, PR13, MM17, MM27 e *H. volcanii*, apresentaram crescimento ótimo. Em meio sem extrato de levedura somente a linhagem BO7 apresentou bom crescimento;
- ✓ As linhagens apresentaram maior degradação de HAPs quando inoculadas em meios acrescidos com extrato de levedura;
- ✓ O naftaleno foi melhor degradado pela linhagem *H. volcanii* (65,4%), já em meios sem adição de fonte alternativa de carbono a linhagem BO7 degradou 50%.

- ✓ A linhagem AA35 a melhor degradação do antraceno nas duas condições avaliadas, apresentando os resultados 76,9% e 75,9%, respectivamente;
- ✓ O fenantreno foi melhor degradado em meio com extrato de levedura pela linhagem AA41 (88,4%), já sem extrato a linhagem BO7 degradou 48% deste HAP;
- ✓ A linhagem CL47 foi responsável pela maior degradação do pireno em meio contendo extrato de levedura (80%), a linhagem AA35% degradou 63,7% deste composto em meio sem extrato de levedura;
- ✓ O 1,2-Benzoantraceno foi melhor degradado pelas linhagens CL47 (77,8%) e AA35 (70,3%), com e sem extrato de levedura, respectivamente;
- ✓ Sete novas linhagens foram isoladas de salinas brasileiras, seis de Arraial do Cabo-RJ e uma de Nossa Senhora do Socorro-SE em meios contendo ácido *p*-hidroxibenzóico como principal fonte de carbono;
- ✓ A identificação através do sequenciamento do gene que codifica o RNAr 16S das linhagens de haloarquéias da coleção de culturas do LSFM, resultou num único gênero, *Haloferax*, sendo que a linhagem CL47 apresentou 98% de similaridade com a linhagem tipo *Haloferax sulfurifortis*;
- ✓ A linhagem isolada de Arraial do Cabo-RJ, AR71 apresentou 98% de similaridade com a linhagem tipo *Halosarcina pallida*;
- ✓ Apenas o isolado tipo *Halococcus morhuaea* possui o gene que codifica a enzima gentisato 1,2-dioxigenase, dentre as haloarquéias estudadas.

4.5 Referências Bibliográficas

ADKINS, J. P., MADIGAN, M. T., MANDELCO, L., WOESE, C. L., TANNER, R. S. *Arhodomonas aquaeolei* gen. Nov., sp. Nov., an Aerobic Halophilic Bacterium Isolated from a Subterranean Brine. **Int J. of Systematic Bacteriology**, v. 43 (3), p. 514-520, 1993.

ASKER, D., OHTA, Y. *Haloferax alexandrinus* sp. nov., na extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon from a solar saltern in Alexandria (Egypt). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 52, p. 729-738, 2002.

AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E. MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley and Sons, New York, 1989 15.1.3p.

BORGNE, S. L., PANIAGUA, D., VAZQUEZ-DUHALT, R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. **Journal of Moleculecular Microbiology and Biotechnonology** v.15, p.74-92, 2008.

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.

CUADROS-ORELLANA, S., POHLSCHRÖDER, M., DURRANT, L.R. Isolation and characterization of halophilic archaea able to grow in aromatic compounds. *International Bioderiation and Biodegradation* v. 57, p. 151-154, 2006.

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

DYALL-SMITH, M. Cell Methods. The Halohandbook: Protocols for Halobacterial genetics. Version 3.0. (2000) HaloHandbook/HaloHB.web/Halohandbook4.5.pdf Arquivo capturado em outubro de 2002 no endereço www.microbiol.unimelb.edu.au/micro/staff/mds/.

EMERSON, D., CHAUHAN, S., ORIEL, P., BREZNAK, J.A. Haloferax sp. D1227, a halophiic archaeon capable of growth on aromatic compounds. **Archives of Microbiology**, v.161, p.445-452, 1994.

ELSHAHED, M. S. SAVAGE, K. N., OREN, A. GUTIERREZ, M.C., VENTOSA, A. , KRUMHOLZ, R. L. *Haloferax sulfurifontis* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a sulfide- and sulfur-rich spring. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, p. 2275–2279, 2004.

ENACHE, M., ITOH, T., KAMEKURA, M., TEODOSIU, G., DUMITRU, L., *Haloferax prahovense* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a Romanian salt lake. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**. v. 57 (2), p. 393-397, 2007.

EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M., GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. **Accuracy assessment**. **Genome Res**, v. 8, p.175–185, 1988.

EVANS, W.C., FUCHS, G. Anaerobic Degradation of Aromatic Compounds. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 42, p. 289-317, 1988.

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 intramolecular migration shift (NIH shift). **Applied and Environmental microbiology**, v. 68(12): p.6246-6255, 2002.

FAIRLEY, D., WANG, G., RENSING, C., PEPPER, I., LARKIN, M. Expression of gentisate 1,2-dioxygenase (*gdoA*) genes involved in aromatic degradation in two haloarchaeal genera. **Appl. Microbiol. and Biotechnol.** v.73 (3), p. 691-695, 2006.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution** v.39, p.783-791, 1985.

FOGHT, J. M., WESTLAKE, D.W.S. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Aromatic Heterocycles by a *Pseudomonas* Species. **Canadian Journal of Microbiology**, v.34, p.1135-1141, 1988.

FU, W., ORIEL, P. Gentisate 1,2-dioxygenase from *Haloferax* sp. D1227. **Extremophiles**, v. 2, p. 439-446, 1998.

GARCÍA, M. T., VENTOSA, A., MELLADO, E. Catabolic versatility of aromatic compound-degrading halophilic bacteria. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v.54 (1), p. 97-109, 2005a.

GODON, J.J., ZUMSTEIN, E., DABERT, P., HABOUZIT, F., MOLETTA, R. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. **Appl Environ Microbiol**, v.63, p.2802–2813, 1997.

GRUND, E., DENEKE, B., EICHENLAUB, R. Naphthalene Degradation via Salicylate and Gentisate by *Rhodococcus* sp. Strain B4. **Applied Environmental Microbiology**, v.58 (6), p.1874-1877, 1992.

GUTIERREZ, M. C., KAMEKURA, M., HOLMES, M. L., DYALL-SMITH, M. L., Ventosa, A. Taxonomic characterization of *Haloferax* sp. ('*H. alicantei*') strain Aa 2.2: description of *Haloferax lucentensis* sp. nov. **Extremophiles** v.6, p.479-483, 2002.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl Acids Symp Ser.** V.41, p.95-98, 1999.

JUEZ, G., RODRIGUEZ-VALERA, F., VENTOSA, A., KUSHNER, D. J. *Haloarcula hispanica* sp. nov. and *Haloferax gibbonsii* spec. nov., two new species of extremely halophilic archaebacteria. **Syst Appl Microbiol** v. 8, p. 75-79, 1986.

JUHASZ, A. L., NAIDU, R. Bioremediation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: a Review of the Microbial Degradation of Benzo[a]pyrene. **International Biodeterioration**. v. 45, p. 57-88, 2000.

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.

KUMAR S., TAMURA K., AND NEI, M. MEGA 3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment **Briefings in Bioinformatics**. v.5, p.150-163, 2004.

LAWYER, F. C., SOTFFEL, S., SAIKI, R. K., MAYBO, K.D, DRUMMOND, R., GELFAND, D. H. Isolation, chracterization, and expression in *E. coli* of the DNA polymerase gene from the extreme thermophile, *Thermus aquaticus*. **J. Biol. Chem.** v. 264, p. 6427-6437, 1989.

MAHAFFEY, W. R., GIBSON, D.T, CENIGLIA, C. E. Bacterial Oxidation of Chemical Carcinogens: Formation of Polycyclic Aromatic Acids from Benz[a]anthracen. **Applied an Environmental Microbiology**, v.54, n.10, p. 2415-24523, 1988.

MEVARECH, M., WERCZBERGER, R. Genetic Transfer in *Halobacterium volcanii*. **Journal of Bacteriology**, v. 162, (1), p. 461-462, 1985.

MULLAKHANBHAI, M. F., LARSEN, H. *Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement. **Arch Microbiol** 104, 207-214, 1975.

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

NEVES, E. B. Degradação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos por Bactérias. Tese apresentada à Universidade de Campinas, para obtenção do título de Doutor, 2002.

RHAGAVAN, T. M., FURTADO, I. Tolerance of an Estuarine Holophilic Archaeobacterium to Crude Oil and Constituent Hydrocarbons. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.65, p.725-731, 2000.

RODRIGUEZ-VALERA, F., JUEZ, G., KUSHNER, D. J. *Halobacterium mediterranei* spec. nov., a new carbohydrate-utilizing extreme halophile. **Syst Appl Microbiol** v.4, p.369–381, 1983.

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.

SAITOU, N. , NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** v.4, p.406-425, 1987.

SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor, Laboratory Press.

SHUTTLEWORTH, K.L., CERNIGLIA, C.E. Practical methods for the isolation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degrading microorganisms and biodegradation intermediates. In: HURST, J. et al. **Manual of Environmental Microbiology**. Washington, DC: Ed. ASM, 1996. 894p.

STRINGFELLOW, W.T., CHEN, S.H., AITKEN, M. K. Induction of PAH Degradation in a Phenanthrene Degrading Pseudomonads. In: HICHEE, R.E., BORCKMAN, F. J., VOGEL, C. M. ed. **Microbial Process for Bioremediation**. Columbus: Battelle Press, 1995. p.83-89.

THOMPSON J.D., HIGGINS D.J., GIBSON T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* v.22, p.4673–4680, 1994.

TOMLINSON, G. A., JAHNKE, L. L., HOCHSTEIN, L. I. *Halobacterium denitrificans* sp. nov., an extremely halophilic denitrifying bacterium. **Int J Syst Bacteriol** v.36, p.66–70, 1986.

WATER, U., BEYER, M., KLEIN, J., REHM, H.J. Degradation of Pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. **Applied Micrology and Biotechnology**, v. 34, p. 528-535, 1991.

WHITFORD, M. F., TEATHER, R. M., FORSTER, R. J. Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. **BMC Microbiology**, v. 1 (5), 2001.

WOLIN, E. A., WOLN, M. J., WOLFE, R. S. Formation of Methane by Bacterial Extracts. **J. Biol. Chem.**, v. 238 (8), p. 2882-2986, 1963.

WOOLARD, C. R., IRVINE, R. L. Treatment of hypersaline Wastewater in the Sequencing Batch Reactor, **Water Research**, v. 29 (4), p. 1159-1168, 1995.

Ye, D., Siddiqi, M.A., Maccubbin, A.E., Kumar, S., Sikka, H.C. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. **Environmental Science & Technology**, v.30, p.136–142, 1996.

5 Degradação de fenol por bactérias halofílicas

5.1 Introdução

Os compostos fenólicos apresentam grande toxicidade e são dificilmente degradados, ocasionando graves problemas para a biota local e para a saúde humana. Quando presentes em águas residuárias dificultam o processo de tratamento biológico, provocando dúvidas devido à possível contaminação das águas que abastecem a população (SILVA, et al., 2007).

Os fenóis estão presentes, nas mais diferentes concentrações, em diversos tipos de águas residuárias, industriais, farmacêuticas e têxteis, de resinas e de papel, em efluentes de fundições de metais e refinarias de petróleo, bem como em águas residuárias de oficinas mecânicas e postos de gasolina, onde ocorre despejo de poluentes tóxicos no meio ambiente, sendo por isso, os maiores poluentes dos efluentes industriais (BORGNE et al., 2008).

Diversos trabalhos têm estudado a degradação destes compostos por microrganismos halofílicos, já que compostos aromáticos freqüentemente contaminam ambientes hipersalinos, como lagos, solos, lagoas próximas a estuários e rios e ambientes marinhos. Além disso, estudos moleculares buscando enzimas responsáveis pela degradação destes compostos também têm sido realizados.

Neste trabalho foi estudada a capacidade de degradação do fenol por linhagens de bactérias halofílicas, além da identificação molecular destas e a busca por genes de degradação de compostos aromáticos.

5.2 Material e metodologia

5.2.1 Linhagens utilizadas

Uma bactéria halofílica moderada *Halomonas organivorans*, gentilmente cedida pelo “Laboratorio de Halófilos” (Faculdade de Farmácia – Universidade de Sevilha – Espanha), foi utilizada em estudos de degradação e moleculares. As demais foram isoladas conforme descrito adiante.

5.2.2 Condições de cultivo e preservação

5.2.2.1 Meio SW

Para a bactéria *H. organivorans* o meio utilizado foi o SW (sea water) constituído por uma solução de sais a 10% complementado com 0,5% de extrato de levedura. A solução de sais mantém as proporções relativas à água do mar, com uma ligeira diminuição nas concentrações de CaCl_2 e NaHCO_3 para evitar a precipitação dos mesmos, os quais foram adicionados após a autoclavagem (cada um foi esterilizado separadamente). Para um meio SW 30% foram utilizadas as seguintes quantidades de sais (g.L^{-1}): NaCl (234,0), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (39,0) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (61,0), KCl (6,0), NaBr (0,7), NaHCO_3 (0,2), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,0). Este meio foi então utilizado como base para meios de concentração de sais mais baixos, no caso de *H. organivorans* será utilizado o meio SW a 10% (Nieto et al., 1989).

5.2.2.2 Meio HGM

O meio *Halophile Growth Medium* (HGM) descrito por Fairley e colaboradores (2002) foi composto por: $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($19,5 \text{ g.L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($29,0 \text{ g.L}^{-1}$), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,1 \text{ g.L}^{-1}$), KCl ($6,0 \text{ g.L}^{-1}$), NaBr ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($10,0 \text{ g.L}^{-1}$), NaCl ($174,0 \text{ g.L}^{-1}$ ou 3 M).

5.2.3 Isolamento de microrganismos de outros ambientes salinos

Foram realizadas coletas em uma salina na cidade de Huelva (Espanha) e em ambientes salinos contaminados por efluentes contendo petróleo. As amostras foram inoculadas no meio HGM descrito no item 5.2.2.2.

Foi acrescida também a solução de micronutrientes e de vitaminas (descritos nos itens 4.2.2.1 e 4.2.2.2, respectivamente) . Como fonte de carbono foi utilizado a princípio 2 mM de fenol, podendo chegar a 3 mM. Foram feitos dois controles, o primeiro contendo o inóculo, porém sem fonte de carbono, e o outro contendo fenol sem inóculo.

Após três transferências sucessivas, 50 µL do cultivo foram transferidos por espalhamento em uma placa contendo o mesmo meio acrescido de 2% de ágar. Colônias foram estriadas em meio sólido com a mesma composição e após o crescimento foi verificada a pureza dos cultivos por coloração de Gram. Foi realizada uma extração de DNA (segundo metodologia descrita no item 4.2.11.1) para que posteriormente, fosse realizada PCR para a amplificação do gene RNAr 16S e subsequente identificação das linhagens isoladas.

5.2.4 Isolamento de microrganismos halofílicos presentes em água de produção de petróleo

A mesma metodologia descrita no item 5.2.3 foi utilizada para isolar microrganismos halofílicos presentes na água de produção de petróleo, utilizando fenol como única fonte de carbono. As amostras de água utilizadas neste isolamento foram cedidas pela Petrobrás em outubro de 2005 e foram armazenadas a 10 °C no LSFM (UNICAMP).

5.2.5 Identificação das linhagens de bactérias halofílicas isoladas

A identificação das linhagens de bactérias foi feita através da análise de sequência do RNA ribossomal 16S conforme descrito no item 4.2.11.3 diferindo apenas os *primers* utilizados e as condições de reação de PCR. Os *primers* utilizados foram: 16F27 e 16R1488 (Lane, 1991), universais para o Domínio Bacteria. A reação em cadeia da polimerase foi feita em um volume de 50 µL contendo 5 µL de tampão 10X com MgCl₂ (Eppendorf), 8 µL dNTP's (desoxirribonucleotídeos trifosfatados), 2,0 µL de cada primer (diluídos 1:9 de água MilliQ), 0,5 µL de Taq Polimerase (Eppendorf), e 50-100 ng de DNA, nas seguintes condições: desnaturação 94 °C/5 min; 30 ciclos de desnaturação 94 °C/1 min, anelamento 55 °C/1 min, extensão 72 °C/3 min; extensão final 72 °C/3 min. O produto amplificado foi analisado em gel de agarose a 1% usando um marcador de peso molecular DNA Ladder de 1 Kb para confirmar o tamanho do fragmento.

O produto amplificado foi seqüenciado em sequenciador automático modelo 3100 (Applied Biosystems) segundo o protocolo do fabricante.

O sequenciamento do produto de PCR, a comparação das sequências de DNA com o banco de dados e a construção da árvore filogenética seguiram os itens 4.2.11.4, 4.2.11.5 e 4.2.11.6, respectivamente.

5.2.6 Crescimento de bactérias halofílicas em fenol

As três linhagens de bactérias halofílicas (uma isolada em Huelva-ES, a segunda isolada a partir de amostras de água de produção de petróleo e *H. organivorans*), foram pré-inoculadas em um meio HGM 10% acrescido de 0,3% de extrato de levedura, as células foram centrifugadas a 3.000 g, por 15 minutos a 5 °C. Essas células foram ressuspensas no mesmo meio e inoculadas para uma DO₆₀₀ inicial de 0,05 em um novo meio HGM 10%, contendo 3 mM de fenol como única fonte de

carbono. Os frascos *Erlenmeyers* foram incubados a 150 rpm e 37 °C. Aliquotas foram retiradas diariamente a partir do tempo zero para medida de DO₆₀₀ e medida de degradação por CLAE.

5.2.7 Degradação de fenol por bactérias halofílicas

As amostras coletadas a partir do crescimento das três linhagens estudadas foram centrifugadas a 3.000 g, por 15 minutos a 5 °C. O sobrenadante foi diretamente utilizado para análise de degradação do fenol. Foi utilizado um sistema isocrático de fase-reversa em CLAE (cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo LC-6A, com detector UV-Vis). Uma coluna C18 (150x4,6 mm) foi utilizada. Como fase móvel foi utilizado metanol : água : ácido acético (500 :500 : 2, v/v/v), vazão 0,6 mL/min, volume de injeção 20 µL e detector de absorbância ajustado a 280 nm (CHO et al., 1998).

5.2.8 Produção de biossurfactantes por bactérias halofílicas

5.2.8.1 Emulsificação

Os cultivos das três linhagens de bactérias halofílicas, contendo 3 mM de fenol, em fase estacionária de crescimento, foram centrifugadas. Para a realização de atividade de biossurfactante, foram adicionados a tubos de ensaio 2,0 mL de tolueno em 3,5 mL do caldo, leu-se a absorbância em espectrofotômetro a 610 nm. A seguir o material foi colocado sob vigorosa agitação, durante 1 minuto, deixando-se em repouso por uma hora; após esse tempo uma nova leitura foi efetuada. O cálculo da produção de biossurfactante corresponde à diferença entre o valor obtido após a agitação dos tubos e antes da agitação. Após 24 horas decorridas da agitação dos tubos, foi verificada a medida do halo formado, através de régua milimetrada, observando-se também a variação de compactação de bolhas. Todos os valores tiveram descontado seu respectivo controle (FEIJÓ; DURRANT, 2001).

5.2.3.1 Tensão superficial

Foi realizada através da determinação da tensão superficial do biossurfactante. A análise foi feita em tensiômetro Krüss pelo método de Du Nouy utilizando-se 10 mL de cada sobrenadante à 20 °C, previamente centrifugado para eliminação de células a 3.000 g, 5 °C por 15 minutos.

5.2.4 Identificação das linhagens de bactérias halofílicas

Este item foi realizado seguindo a mesma metodologia que a utilizada para identificação de haloarqueias (itens 4.2.12 a 4.2.18), diferindo apenas com relação aos *primers* utilizados. Para a amplificação do gene RNAr 16S de bactérias foram utilizados os *primers* universais 16F27 e 16R1488.

5.2.5 Amplificação de genes catabólicos em bactérias halofílicas

A determinação da presença de genes catabólicos de interesse foi realizada utilizando-se a mesma metodologia descrita no item 4.2.12.

5.2.5.1 Clonagem de fragmentos de PCR

Algumas bandas interessantes amplificadas foram extraídas do gel de agarose utilizando o kit Perfectprep Gel Cleanup[®] (Eppendorf), purificada e clonada utilizando o kit de clonagem pGEM-T[®] (Promega), segundo orientações dos fabricantes. Os clones foram seqüenciados como descrito no 4.17 e 4.18.

Os fragmentos clonados serão futuramente utilizados pelos pesquisadores do “Laboratório de Halófilos” Sevilha-ES, como sondas para hibridização DNA-DNA utilizando como marcador a dioxigenina após o término da construção da biblioteca genômica de *H. organivorans*.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Isolamento de microrganismos de outros ambientes salinos

A partir das coletas realizadas em Huelva-Espanha, foi isolada uma linhagem a partir de amostras coletadas em uma marisma próxima a uma zona industrial da cidade. Este isolado foi denominado HU.

Outra linhagem foi isolada a partir de amostras de água de produção cedida pela Petrobrás. Este isolado foi denominado AP.

A **Figura 5.1** mostra os cultivos realizados com amostras de Huelva após três repiques sucessivos dos meios contendo 2 mM de fenol

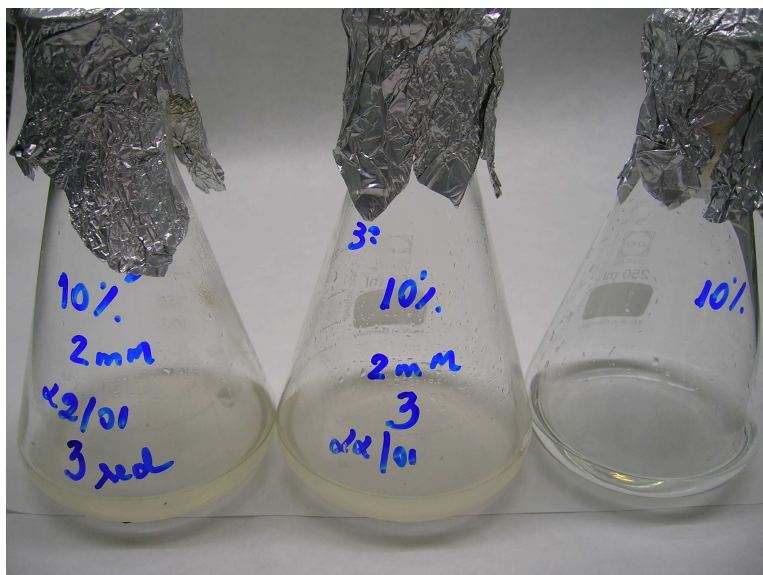


Figura 5.1: Crescimento de microrganismos halofílicos isolados de amostras de Huelva-Espanha

5.3.2 Identificação das bactérias halofílicas isoladas

A identificação das linhagens de bactérias foi feita por análise de seqüências do gene RNA ribossomal 16S. Na **Figura 5.2** são observados os géis com as bandas amplificadas.

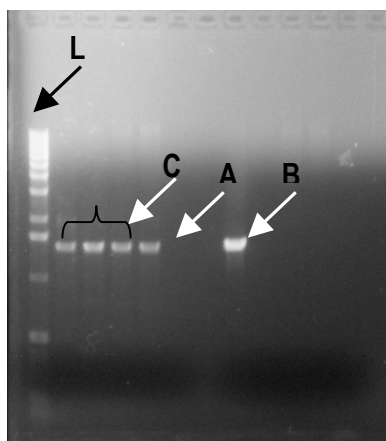


Figura 5.2: Amplificação do gene RNAr 16 S das linhagens de bactérias halofílicas; A) Bactéria isolada em Huelva-ES; B) Bactéria isolada de água de produção; C) *H. organivorans* (controles positivos); L) DNA Ladder 1 Kb

A sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da linhagem isolada de água de produção, em meio HGM contendo 15% de sais após enriquecimento em fenol (2,0 mM) como única fonte de carbono apresentou 95% de similaridade com seqüências da linhagem tipo *Arhodomonas aquaeolei*. A construção da árvore filogenética recuperou esta linhagem num grupamento coeso com elevado valor de *bootstrap* (93%) com a linhagem tipo *A. aquaeolei* confirmando sua identificação. A **Figura 5.3** mostra a árvore filogenética construída.

A linhagem tipo *Arhodomonas aquaeolei* (única espécie do gênero) foi também isolada a partir de água de produção de petróleo proveniente de poços no sudeste de Vassar Vertz Sand Unit in Payne County, Okla (ADKINS et al., 1993).

A sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da linhagem isolada nas marismas de Huelva (Espanha), em meio HGM contendo 15% de sais após enriquecimento em fenol (2,0 mM) como única fonte de carbono apresentou 96% de similaridade com seqüências da linhagem tipo *Modicisalibacter tunisiensis*. A reconstrução da árvore filogenética recuperou esta linhagem num

grupamento coeso com elevado valor de *bootstrap* (100%) com a linhagem tipo *M. tunisiensis* confirmando sua identificação.

A linhagem tipo *Modicisalibacter tunisiensis* (única espécie do gênero) foi isolada a partir de amostras de injeção de água em jazidas de petróleo localizadas na área Sidi Litayem próximo de Sfax-Tunísia (GAM et al., 2007).

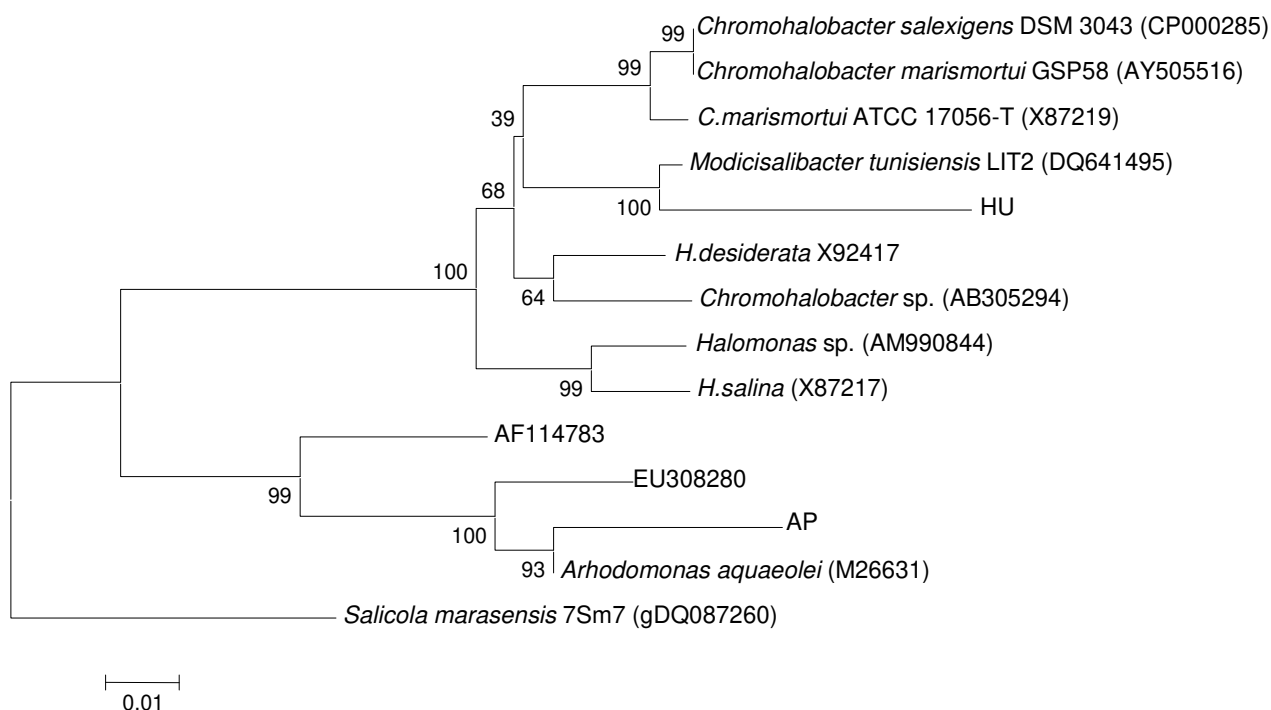


Figura 5.3: Análise filogenética de parte da sequência do gene de RNAr 16S das linhagens de bactérias haloólicas HU e AP e microrganismos relacionados. As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Join*, com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens. Os números de acesso do Genbank estão listados após os nomes. *Salicola marasensis* 7Sm7 foi usada como *outgroup*

5.3.3 Crescimento de bactérias haloólicas em fenol

O crescimento de três espécies de bactérias haloólicas em fenol, como única fonte de carbono e energia, foi avaliado. A DO₆₀₀ foi monitorada durante 192 horas. A linhagem HU

apresentou o crescimento mais rápido atingindo a DO₆₀₀ 0,293 em 43 horas. O melhor crescimento foi apresentado pela linhagem AP(DO₆₀₀ 0,316 em 144 horas). Os resultados são mostrados na **Tabela 5.1**. A **Figura 5.4** mostra a os controles sem fenol e os meio contendo fenol e a diferença visual de turbidez dos meios.

Tabela 5.1: Crescimento das bactérias halofílicas em fenol como única fonte de carbono e energia

Linhagens	D.O em diferentes tempos de cultivo (horas)									
	0	18	26	43	65	72	96	120	144	192
HU	0,026	0,191	0,244	0,293	0,227	0,234	0,211	0,166	0,160	0,158
AP	0,036	0,044	0,067	0,123	0,175	0,193	0,261	0,304	0,316	0,300
<i>H. organivorans</i>	0,038	0,108	0,123	0,164	0,201	0,203	0,206	0,210	0,226	0,210

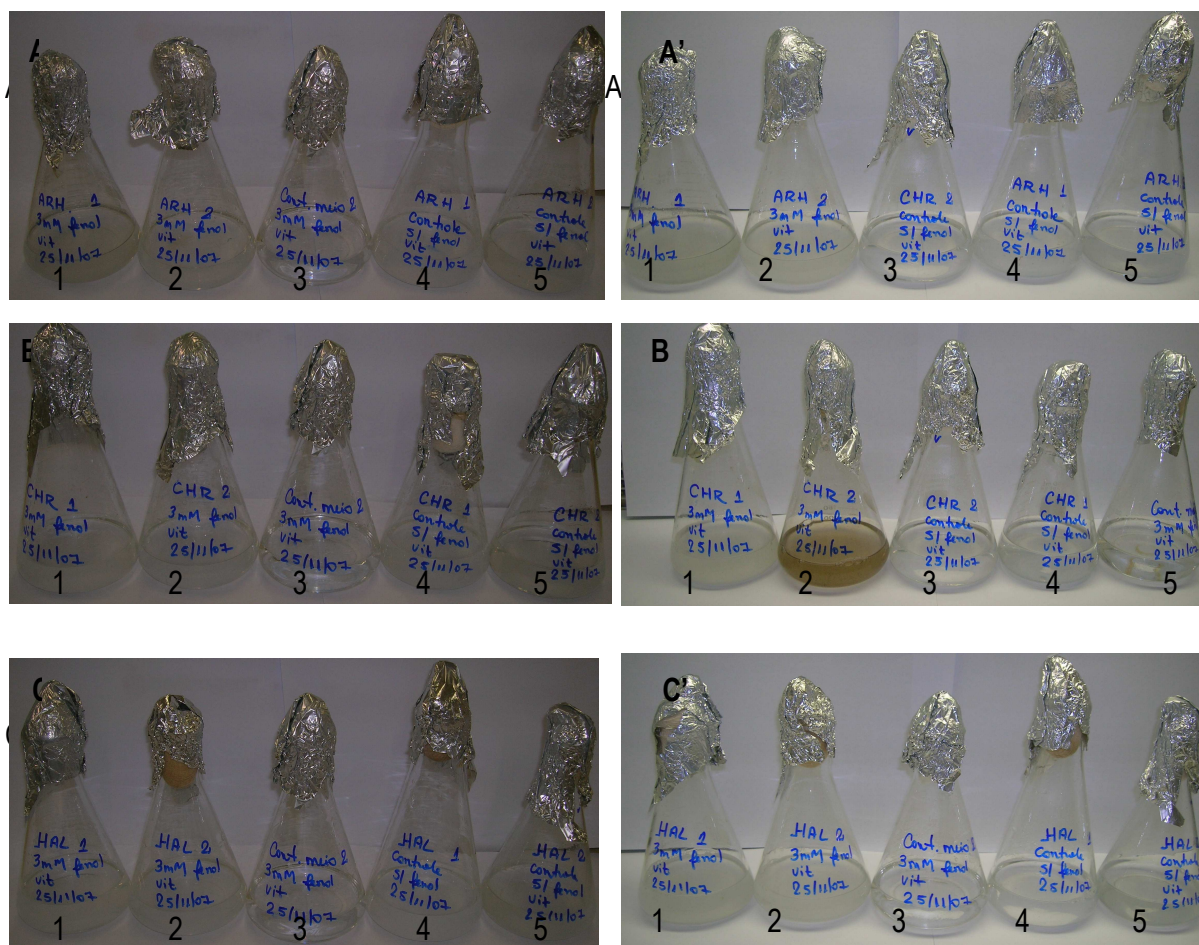


Figura 5.4: Crescimento das bactérias halofílicas em fenol;(1) e (2) linhagem inoculada em meio HGM 10%, 3 mM de fenol e solução de vitaminas; (3) controle contendo meio HGM 10%, 3 mM de fenol e solução de vitaminas; (4) e (5) linhagem inoculada em meio HGM 10%, contendo solução de vitaminas e sem fenol. (A) AP T 0 hora; (A') AP T 144 horas. (B) HU T 0 hora; (B') HU T 144 horas; (C) *H. organivorans* T 0 hora; (C') *H. organivorans* T 144 horas.

5.3.4 Degradação de fenol por bactérias halofílicas

A degradação do fenol foi observada nas três linhagens (**Tabela 5.2**). A linhagem HU foi a que apresentou o melhor resultado de degradação em 26 horas 89,1% de fenol. Após 120 horas houve desaparecimento total do fenol como pode ser observado na **Figura 5.5**. A linhagem AP degradou 87,6% do fenol em 192 horas e *H. organivorans* degradou 74,6% em 192 horas.

Tabela 5.2: Porcentagem de degradação do fenol pelas bactérias halofílicas

Linhagens	Degradação do fenol em diferentes tempos de cultivo (horas)									
	0	18	26	43	65 h	72	96	120	144	192
HU	0,0	58,1	89,1	97,3	99,5	99,9	99,9	100,0	100,0	100,0
AP	0,0	27,8	27,8	43,2	64,7	65,0	67,4	76,9	84,3	87,6
<i>H. organivorans</i>	0,0	21,1	38,9	59,6	44,9	57,4	62,1	68,1	68,5	74,6

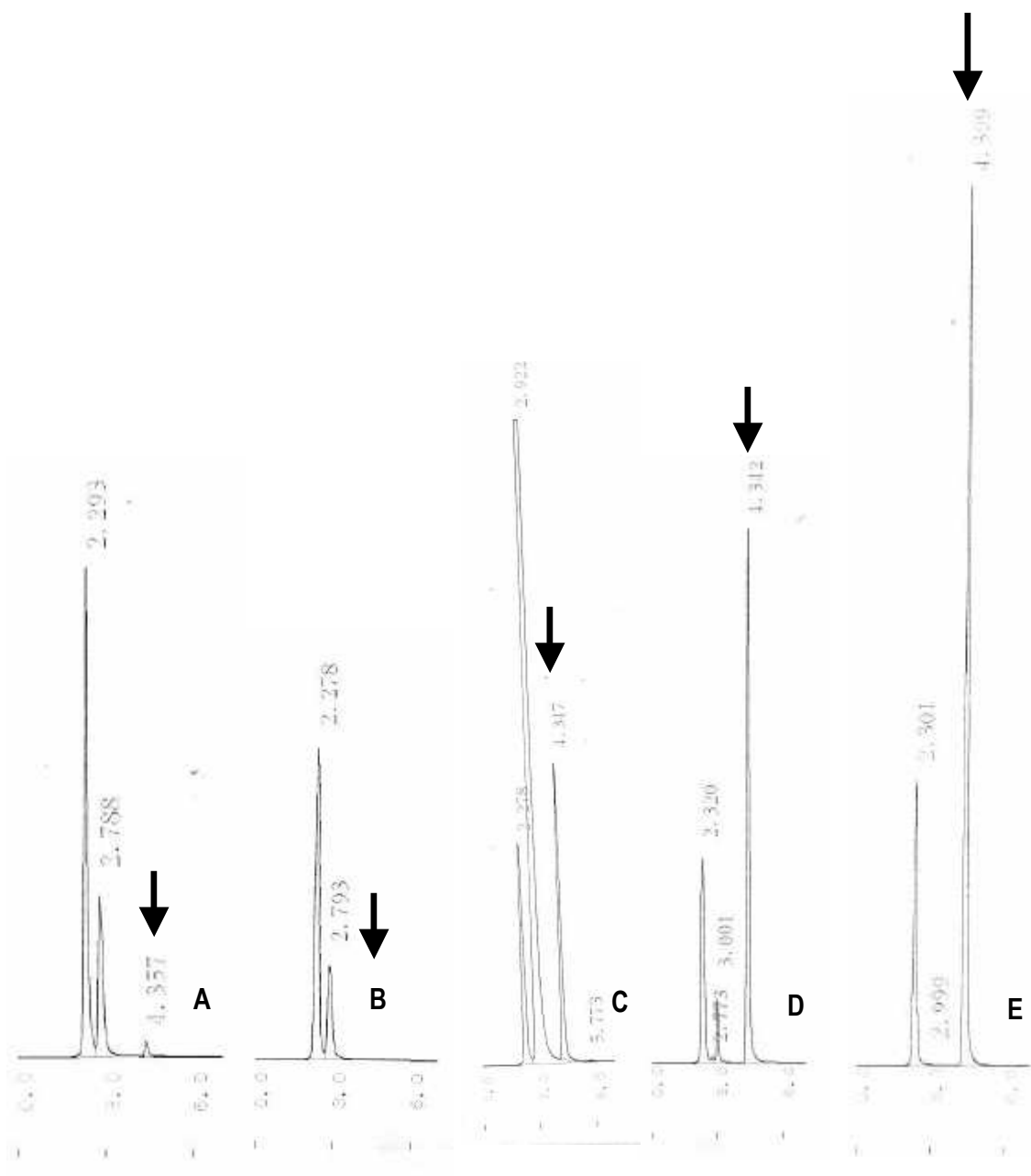


Figura 5.5: Cromatogramas demonstrando a degradação do fenol. A) HU após 26 h de incubação; B) HU após 72 h de incubação; C) AP após 72 h de incubação; D) *H. organivorans* após 72 h de incubação; E) Controle contendo fenol sem inóculo de microrganismos após 72 h de incubação.

Nas Figuras 5.6, 5.7 e 5.8 podem ser observadas as degradações do fenol em função do crescimento bacteriano.

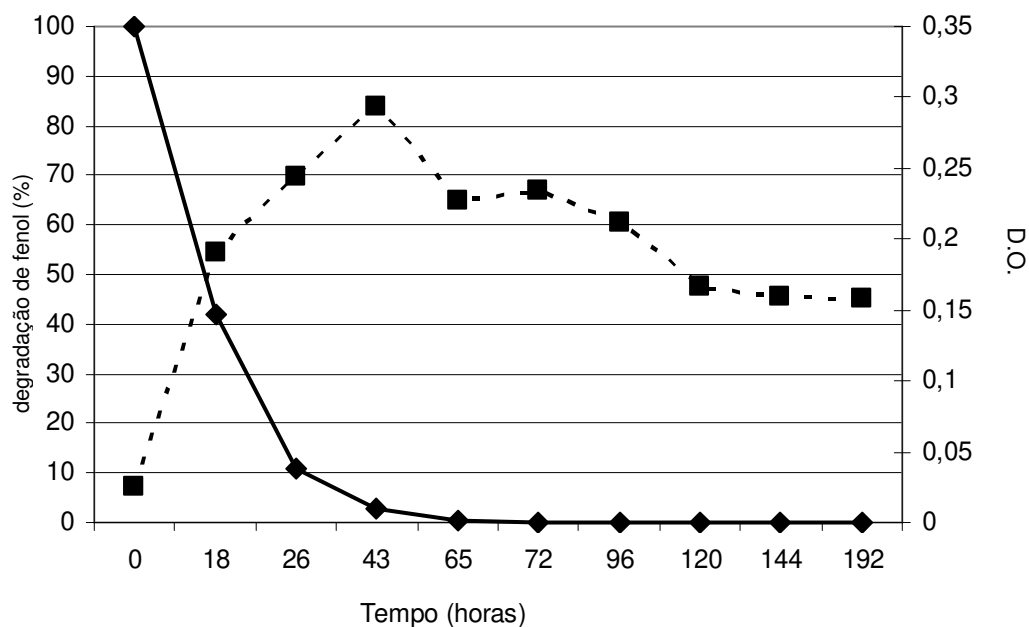


Figura 5.6: Crescimento da linhagem HU e degradação do fenol (—■— degradação, ---■--- crescimento)

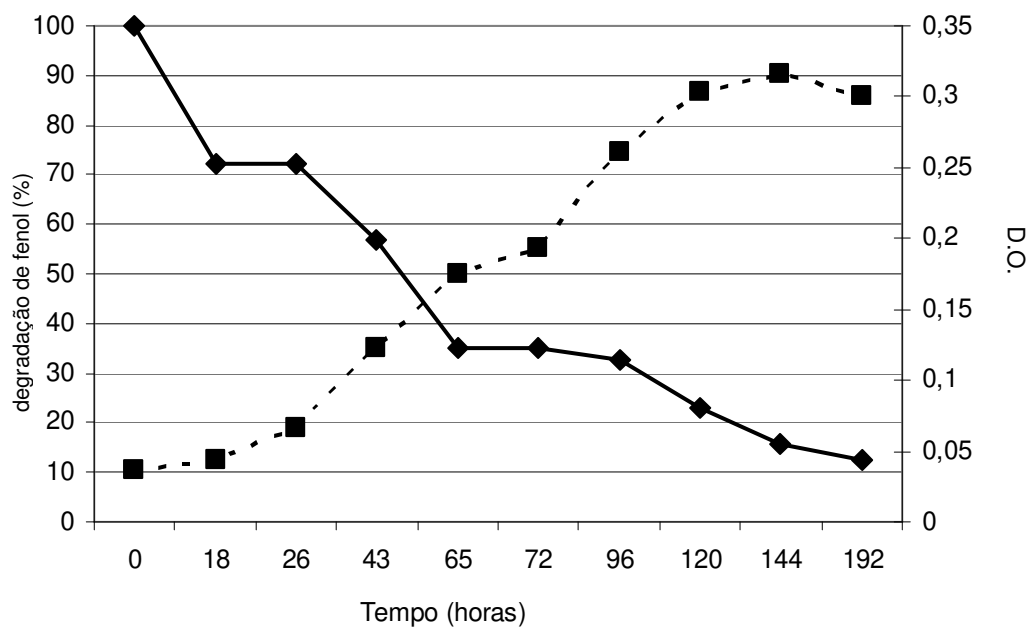


Figura 5.7: Crescimento da linhagem HU e degradação do fenol (—■— degradação, ---■--- crescimento)

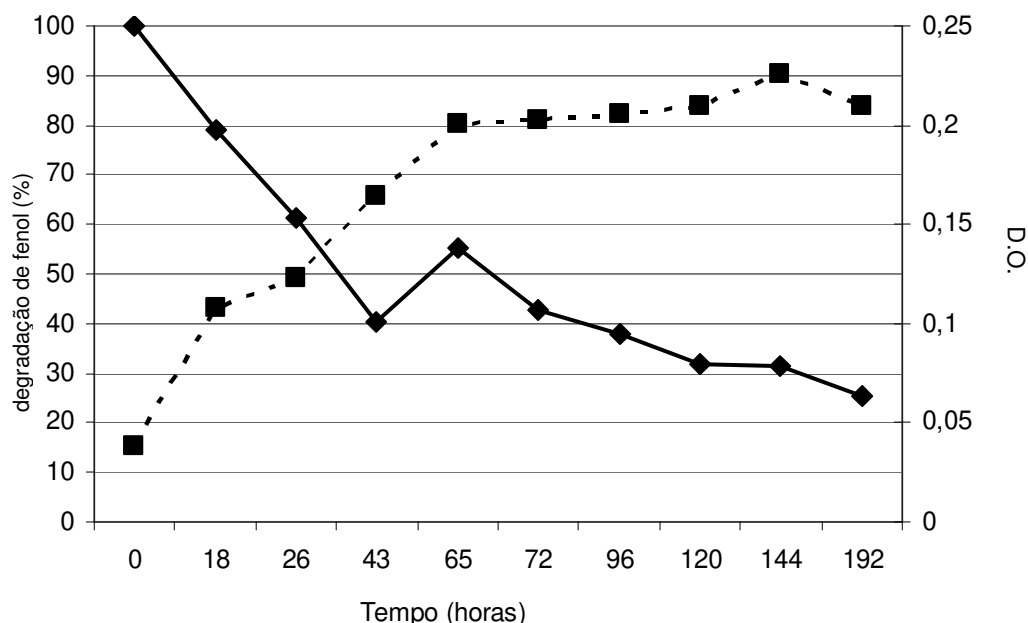


Figura 5.8: Crescimento da linhagem *H. organivorans* e degradação do fenol (—■— degradação, ----■---- crescimento).

Segundo Hinteregger e Streichsbier (1997), a degradação de compostos tóxicos e recalcitrantes por microrganismos halotolerantes ou halofílicos é de grande importância, já que, existem muitos efluentes tóxicos com alta salinidade o que dificulta a degradação por mesofílicos. Além disso, métodos de tratamento desses resíduos realizados após a diluição do efluente e utilização de mesofílicos não é vantajosa em seus resultados na degradação, tanto sob o ponto de vista econômico como ambiental.

Em ambientes não halofílicos a degradação de compostos tóxicos aromáticos é bem conhecida, já em ambientes salinos poucos estudos foram realizados. Uma bactéria não identificada isolada do “Great Salt Lake” degradou hexadecano em concentrações de sal maiores que 20% (WARD; BROCK, 1978).

Em 2005, García e colaboradores estudaram 322 isolados de quatro diferentes ambientes salinos da Espanha – Estuário de Huelva, Isla Bacuta, Isla Cristina e San Fernando. Estes isolados

foram estudados quanto à capacidade de crescer em diferentes compostos aromáticos como: ácido benzóico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido cinâmico, ácido salicílico, ácido fenilacético, ácido fenilpropionico, fenol, ácido *p*-coumárico, ácido ferrúlico, ácido aminosalicílico. Destes isolados, 32 foram capazes de crescer em fenol como única fonte de carbono, dentre eles a espécie descrita pelo mesmo grupo em 2004 denominada *Halomonas organivorans* a qual foi gentilmente cedida e utilizada neste trabalho (GARCÍA et al., 2004).

Alva e Peyton (2003) reportaram que fenol e catecol foram degradados pela bactéria haloalcalinofílica *Halomonas campisalis*. Esta bactéria foi capaz de crescer em presença de fenol como única fonte de carbono e energia em um pH variando entre 8 e 11 e 0 a 150 g.L⁻¹ NaCl. Neste estudo o fenol foi mineralizado a CO₂.

5.3.5 Produção de biossurfactantes por bactérias halofílicas

A atividade biossurfactante foi determinada após os cultivos das bactérias halofílicas em meio HGM 10% contendo 3 mM de fenol. Observa-se na **Tabela 5.3** que apesar da redução da tensão superficial ter sido baixa, os microrganismos em presença de fenol como única fonte de carbono apresentaram maior redução da tensão superficial comparando-se com os controles sem adição de fenol.

Tabela 5.3: Medida de tensão superficial, emulsificação e formação de halo em cultivos de bactérias halofílicas contendo ou não 3 mM de fenol como única fonte de carbono

Linhagem	Tensão Superficial (mN m ⁻¹)	Emulsificação (DO ₆₁₀ nm)	Halo (mm)
AP Fenol	69,79	0,07	1,00
AP Controle	72,00	0,06	1,00
HU Fenol	61,25	0,21	1,00
HU Controle	68,75	0,09	1,00
<i>H. organivorans</i> Fenol	62,75	0,14	1,00
<i>H. organivorans</i> Controle	71,95	0,05	1,00
Controle Fenol	70,90	0,04	1,00

Verifica-se que a linhagem HU reduziu sua tensão de 68,75 mN/m (controle sem fenol) para 61,25 mN/m. O perfil apresentado pela linhagem *H. organivorans* foi bastante semelhante, reduzindo sua tensão de 71,95 mN/m (controle sem fenol) para 62,75 mN/m. A linhagem AP reduziu sua tensão de 72,00 mN/m para 69,79 mN/m. Após a emulsificação utilizando tolueno o perfil apresentado na redução da tensão superficial foi repetido, neste caso as diferenças obtidas são observadas na linhagem HU, a qual apresenta uma DO de 0,21 em fenol e 0,09 no controle (**Tabela 5.3**). A linhagem *H. organivorans* quando crescida em fenol apresentou uma DO de 0,14, enquanto que seu controle apresentou 0,05. Uma pequena diferença entre o crescimento em fenol e no controle foi obtida quando a linhagem AP foi analisada, 0,07 e 0,06, respectivamente. Quando a formação do halo foi medida após 24 horas da agitação da emulsão, não houve diferenças, sendo que todas as determinações resultaram em 1,00 mm.

Apesar de os resultados apresentados não terem sido satisfatórios, ou seja, não apresentando alta atividade surfactante e emulsificante, conforme verificado por Banat e colaboradores (2000), a fonte de carbono utilizada para medir a atividade surfactante pode não ter propiciado a síntese destes compostos.

Até o momento, poucos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar a produção de biossurfactantes por microrganismos halofílicos. Porém segundo Cameotra e Makkar (1998), biopolímeros como os biossurfactantes secretados por halofílicos possuem alta estabilidade e podem ter aplicação na indústria de petróleo. Um estudo realizado com a linhagem *Bacillus licheniformis* (isolado BAS 50), foi capaz de produzir surfactantes lipopeptídeos quando cultivada em substratos com salinidades maiores do que 13% de NaCl (Yakimov et al., 1995).

Trebbau e McInerney (1996) estudaram a produção de bioemulsificantes por *Methanobacterium thermoautotrophicum* os quais permaneceram ativos entre pH 5-10 e em uma salinidade de mais de 200 g.L⁻¹.

5.3.6 Amplificação de genes catabólicos

Os genes das enzimas catecol 1,2 dioxigenase e de protocatechuato 3,4 dioxigenase foram amplificados pelos *primers* degenerados descritos por García e colaboradores (2005). Neste caso, os dois genes foram amplificados nas três linhagens estudadas como mostra a **Figura 5.9**.

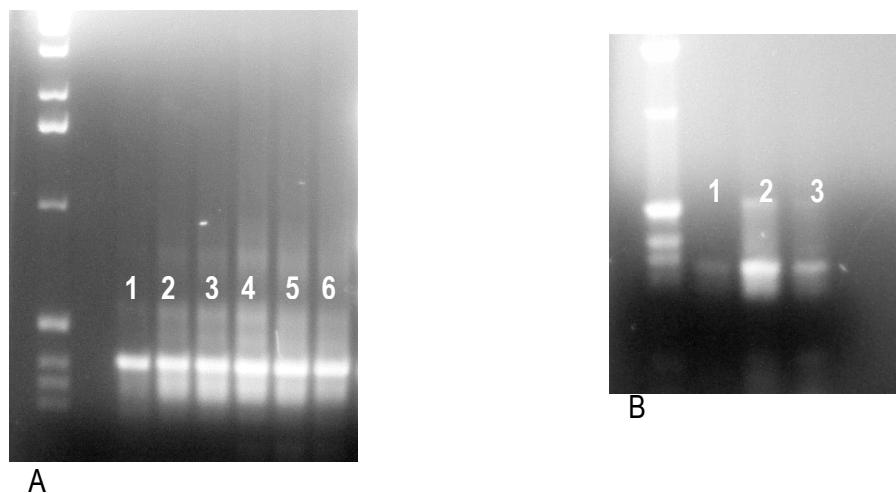


Figura 5.9: Amplificação dos genes das dioxigenases A) Catecol 1,2 dioxigenase (Banda de 414 pb) (1 e 2 *H. organivorans*, 3 e 4 AP; 5 e 6 HU); B) Protocatechuato 3,4 dioxigenase (Banda de 330 pb) (1 *H. organivorans*, 2 AP; 3 HU)

5.3.7 Clonagem de fragmentos de PCR de *Halomonas organivorans*

Após a amplificação dos genes as bandas de *H. organivorans* dos dois géis foram recortadas utilizando-se o kit Perfectprep Gel Cleanup[®] (Eppendorf), dessa forma, o DNA foi utilizado para clonagem dos fragmentos utilizando-se o kit de clonagem pGEM-T[®] (Promega). Os dois kits foram utilizados de acordo com as instruções dos fabricantes (**Figura 5.10**).

Os clones tiveram seu DNA plasmidial extraído com o kit de extração plasmidial “wizard plus sv minipreps DNA purification system” (Promega). As amostras foram então digeridas pela enzima de restrição EcoRI, e assim, foi constatado que os fragmentos clonados poderiam pertencer ao gene das duas enzimas estudadas.

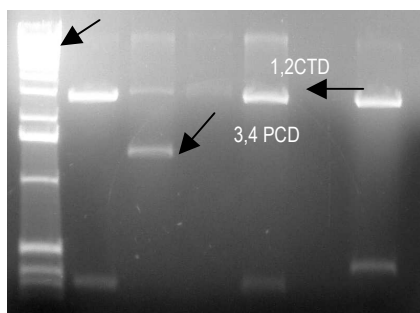


Figura 5.10: Gel de eletroforese dos clones dos genes de catecol 1,2 dioxigenase (1,2 CTD) e protocatecuato 3,4 dioxigenase (3,4 PCD)

As amostras foram enviadas para sequenciamento e a partir dos nucleotídeos seqüenciados foi realizado um BLAST com a seqüência e constatado que estas pertenciam às enzimas catecol 1,2 dioxigenase e protocatecuato 3,4 dioxigenase (**Tabelas 5.4 e 5.5**).

Tabela 5.4: Resultado do BLAST realizado a partir da seqüência clonada do gene de catecol 1,2 dioxigenase

Número de Acesso	Descrição	E value	Max ident
AB286709	Uncultured bacterium C12O gene for catechol 1,2-dioxygenase, partial cds, clone: 131-N	2e ⁻³⁶	78%
AJ617555	<i>Pseudomonas stutzeri</i> partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase, strain DSM 50238	4e ⁻²⁷	76%
AJ617523	<i>Pseudomonas stutzeri</i> partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase, isolate AN11	2e ⁻²⁶	77%
AJ880094	<i>Pseudomonas chloritidismutans</i> partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase	2e ⁻²⁶	77%
AJ617524	<i>Pseudomonas stutzeri</i> partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase, isolate LSMN2	7e ⁻²⁵	77%
CP000489	<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222 chromosome 1, complete genome	4e ⁻²²	72%

Tabela 5.5: Resultado do BLAST realizado a partir da sequência clonada do gene de Protocatecuato 3,4 dioxigenase

Número de Acesso	Descrição	E value	Max ident
CP000137	<i>Rhizobium etli</i> CFN 42 plasmid p42e, complete sequence	2e ⁻²⁹	80%
DQ318099	Uncultured bacterium clone EP36 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	8e ⁻²⁹	75%
DQ318060	Uncultured bacterium clone EP46 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	3e ⁻²⁸	77%
DQ318103	Uncultured bacterium clone EP38 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	1e ⁻²⁷	75%
DQ318098	Uncultured bacterium clone AF5 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	4e ⁻²⁷	75%
DQ318096	Uncultured bacterium clone EP15 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	4e ⁻²⁷	75%

5.4 Conclusões

- ✓ As linhagens de bactérias halofílicas AP, HU e *H. organivorans* cresceram em fenol como única fonte de carbono em 5 dias. A melhor degradação do fenol foi realizada pela linhagem HU (100%);
- ✓ A linhagem HU foi a que mais produziu biossurfactantes;
- ✓ A linhagem HU isolada de um ambiente salino contaminado com petróleo em Huelva-Espanha, tendo crescido em 3 mM de fenol como única fonte de carbono, foi identificada através do sequenciamento do gene RNAr 16S como *Modicisalibacter tunisiensis*;
- ✓ A água de produção foi utilizada como fonte de inóculo, da qual foi isolada a linhagem AP em meio contendo como única fonte de carbono 3 mM de fenol e foi identificada através do sequenciamento do gene RNAr 16S como *Arhodomonas aquaeolei*;
- ✓ Além de *H. organivorans*, as linhagens HU e AP também possuem o gene que codifica as enzimas catecol 1,2-dioxigenase e protocatecuato 3,4-dioxigenase;
- ✓ Os genes de catecol 1,2 dioxigenase e protocatecuato 3,4 dioxigenase de *H. organivorans*, foram clonados.

5.5 Referências Bibliográficas

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 (19), p. 4397 -4402, 2003.

BANAT, I. M., MAKKAR, R. S., CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. V. 53, p. 495-508, 2000.

BORGNE, S. L., PANIAGUA, D., VAZQUEZ-DUHALT, R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnonology v.15, p.74-92, 2008.

CAMEOTRA, S. S., MAKKAR, R. S. Síntesis of biosurfactants in extreme conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 50, p. 520-529, 1998.

CHO, Y.G., YOON, J.H., PARK, Y.H., LEE, S.T. Simultaneous degradation of p-nitrophenol and phenol by a newly isolated *Nocardioides* sp. J Gen. Appl. Microbiol. v.44, p.303-309, 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 intramolecular migration shift (NIH shift). Applied and Environmental microbiology, v. 68(12): p.6246-6255, 2002.

FEIJÓ, S. AP., DURRANT, L. R. Produção de Biossurfactantes por Cepas Bacterianas. In: MELO, I. S., SILVA, C. M. M. S., SCRAMIM, S., SPESSOTO, A. Biodegradação, EMBRAPA-CNPMA, Jaguariúna, 2001, 223-225 p.

GAM, B. A. Z., ABDELKAFI, S., CASALOT, L., THOLOZAN, J. L., OUESLATI, R., LABAT, M. *Modicisolibacter tunisiensis* gen. nov., sp. nov., anaerobic, moderately halophilic bacterium isolated from an oilfield-water injection sample, and emended description of the family Halomonadaceae Franzmann et al. 1989 emend Dobson and Franzmann 1996 emend. Ntougias et al. 2007. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. v.57, p.2307-2313, 2007.

GARCÍA, M. T., VENTOSA, A., MELLADO, E. Catabolic versatility of aromatic compound-degrading halophilic bacteria. FEMS Microbiol. Ecol., v.54 (1), p. 97-109, 2005a.

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

HINTEREGGER, C., STREICHSBIER, F. *Halomonas* sp., a moderately Halophilic strain, for biotreatment of saline phenolic waste-water. Biotechnology Letters. v.19(11), p. 1099-1102, 1997.

Lane, D.J. (1991) 16S/23S sequencing. In Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics ed. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M.pp. 115–175. Chichester : John Wiley & Sons.

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.55(9), p.2385-2390, 1989.

SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor, Laboratory Press.

SILVA, I.E.C., LUDWIG, K.V.F., NEUMANN, D., SCHNEIDER, A. C, ONOFRE, S.B Fungos filamentosos degradadores de compostos fenólicos isolados de águas residuárias de postos de combustíveis. Revista de Biologia e Saúde da UNISEP Biology & Health Journal. v.1, p. 101-108, 2007.

TREBBAU DE ACEVADO, G., McINERNEY, M. J. Emulsifying activity in thermophilic and extremely thermophilic microorganisms. J. Ind. Microbiol., v. 16, p. 1-7, 1996.

WARD, D., BROCK, T. D. Hydrocarbon Biodegradation in Hypersaline Environments. Applied and Environmental Microbiology. v. 35(2), p. 353-359, 1978.

YAKIMOV, M. M., TIMMIS, K. N., WRAY, V., FREDRICKSON, H. L. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS 50. Appl. Environ. Microbiol. v. 61, p. 1706-1713, 1995.

6 Biorremediação da água de produção de petróleo por microrganismos halofílicos

6.1 Introdução

Hidrocarbonetos de petróleo são a origem da poluição da 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. Este é o motivo pelo qual se encontram muitos estudos a respeito da biodegradação de hidrocarbonetos por microrganismos marinhos. Entretanto, informações sobre a degradação destes compostos em ambientes hipersalinos são muito escassas. Estudos de biorremediação se fazem necessários já que salinas são contaminadas por petróleo, além destes estarem contidos nos efluentes industriais salinos (BORGNE et al., 2008).

A produção de petróleo e gás normalmente é acompanhada de significativa produção de água. Esta água é produzida tanto em operações *onshore* quanto *offshore* e é considerada o rejeito de maior volume em todo o processo de exploração e produção do petróleo. Água de produção consiste basicamente de água de formação, naturalmente presente no reservatório, águas previamente injetadas no reservatório, e/ou, no caso de produção de gás, águas de condensação. Sua composição pode variar amplamente, dependendo da origem, mas os componentes básicos são o óleo cru, metais pesados, salinidade elevada, produtos injetados e de corrosão e compostos radioativos. Estes conferem altas concentrações de DQO, de DBO, de sólidos suspensos, entre outros, representando uma séria ameaça ao meio ambiente.

Aqui foi avaliada a capacidade dos microrganismos estudados em tratar a água de produção de petróleo.

6.2 Material e metodologia

6.2.1 Biorremediação da água produzida em extração de petróleo por haloarquéias

As amostras de água de produção em extração de petróleo foram adquiridas na Petrobrás de São Sebastião-SP e utilizadas para avaliar a redução da DQO. As medidas foram realizadas após o inóculo das linhagens de haloarquéias. Além do tratamento biológico, outro tratamento químico utilizados atualmente por indústrias petrolíferas foram testados para a redução dos compostos orgânicos desse efluente.

Uma fração de 40 mL de cultura das linhagens de haloarquéias crescidas em meio MM e 0,3% de extrato de levedura por 168 horas, foram centrifugadas a 3000 g, a 5 °C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 4 mL de água de produção de petróleo (esterilizada em autoclave por 15 minutos a 121 °C) e inoculadas em 100 mL de água de produção de petróleo estéril (autoclavada por 15 minutos a 121 °C e 1 atm), ou bruta, por 168 horas, a 38,0 °C, a 150 rpm. Foi utilizado como controle um meio estéril e um bruto os quais foram colocados nas mesmas condições dos meios inoculados. Foi feito também um meio (estéril e bruto) sem células no qual foram adicionados 2,0 mL de peróxido de hidrogênio 20%, que foi incubado pelo mesmo período e nas mesmas condições.

6.2.2 Análise da demanda química de oxigênio

A degradação foi avaliada pela determinação da redução de demanda química de oxigênio (DQO). Foram utilizadas amostras das culturas e do efluente bruto, sendo estes centrifugadas (3000 g por 15 minutos a 5 °C) e congeladas a -20 °C após o crescimento dos isolados. Para cada amostra de 2,0 mL de efluente acondicionado em tubo de rosca, 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, que ficaram sob fluxo por 2 horas a 150 °C. Após resfriamento, foi realizada a leitura em espectrofotômetro Hach, modelo DR-2000 (código 440).

Como o principal interferente da DQO são os cloretos presentes na amostra e água de produção possui cerca de 100 g de NaCl por litro de água, foi realizada uma reação com nitrato de prata para diminuir a quantidade de cloretos na amostra. Por cálculo estequiométrico, encontrou-se que seria necessário a adição de 2,6 g de nitrato de prata a cada 6 mL de amostra. A amostra foi agitada por 1 minuto e então centrifugada por 1 minuto a 2.000 g. O sobrenadante foi retirado para análise.

6.2.3 Biorremediação da água produzida em extração de petróleo por bactérias halofílicas e consórcios microbianos

As três linhagens de bactérias halofílicas – *H. organivorans*, HU e AP -, foram utilizadas como inóculo para a biorremediação da água de produção. Neste caso, os inóculos foram realizados para uma DO₆₀₀ de aproximadamente 0,050, a partir de células crescidas, centrifugadas e ressuspensas em meio salino (10%). Os frascos *Erlenmeyers* foram incubados a 37 °C, por 6 dias a 150 rpm.

Além das linhagens inoculadas individualmente foi elaborado um consórcio microbiano, composto das três bactérias. O restante do experimento seguiu a mesma metodologia do item 6.2.2.

6.2.4 Produção de Biossurfactantes em Água Produzida na Extração de Petróleo

A produção de biossurfactantes em água produzida foi realizada segundo o item 5.2.7.

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Biorremediação da água produzida em extração de petróleo por haloarquérias

A partir dos resultados obtidos através da DQO do efluente bruto (DQO inicial) e dos tratados com as diferentes linhagens de haloarquérias, agitação e adição peróxido de hidrogênio, foi calculada a porcentagem de redução da DQO (**Tabela 6.1**). Todas as linhagens e tratamentos (somente agitação ou adição de peróxido de hidrogênio e agitação) reduziram a DQO pelo menos 12,9% quando os meios não foram esterilizados em autoclave, sendo a redução máxima obtida com a linhagem AA31 (87,4%). É interessante ressaltar que um dos tratamentos utilizados atualmente pela indústria do petróleo para redução da carga orgânica do efluente é a adição de peróxido de hidrogênio. Neste caso a redução foi inferior a outros tratamentos utilizados neste estudo (25,7%).

Tabela 6.1: Redução da DQO pelas linhagens de haloarquérias em meio bruto ou esterilizado

Linhagem	Redução da DQO (%) em meio não estéril	Redução da DQO (%) em meio estéril
BO3	38,3	50,7
BO6	71,1	67,2
BO7	34,1	57,5
PR13	65,9	66,4
MM17	12,9	38,6
MM27	68,2	53,8
AA31	87,4	73,8
AA35	66,1	48,8
AA41	59,3	47,5
CL47	73,2	50,1
<i>H. volcanii</i>	34,4	25,2
H ₂ O ₂	25,7	23,1
Agitado	20,2	18,00

Quando o efluente foi esterilizado todas as linhagens também reduziram a DQO pelo menos em 18% e novamente a linhagem AA31 foi a responsável pela maior redução da DQO (73,8%)

(Tabela 6.1). Além disso, o tratamento somente com peróxido não foi tão efetivo quanto o tratamento com as diferentes linhagens de haloarquéias. De maneira geral a redução da DQO foi maior quando as linhagens foram inoculadas em meios não estéreis, podendo isso ser devido a atuação dos microrganismos já presentes no efluente antes do inóculo. Um gráfico comparando a redução da DQO está representado na **Figura 6.1**.

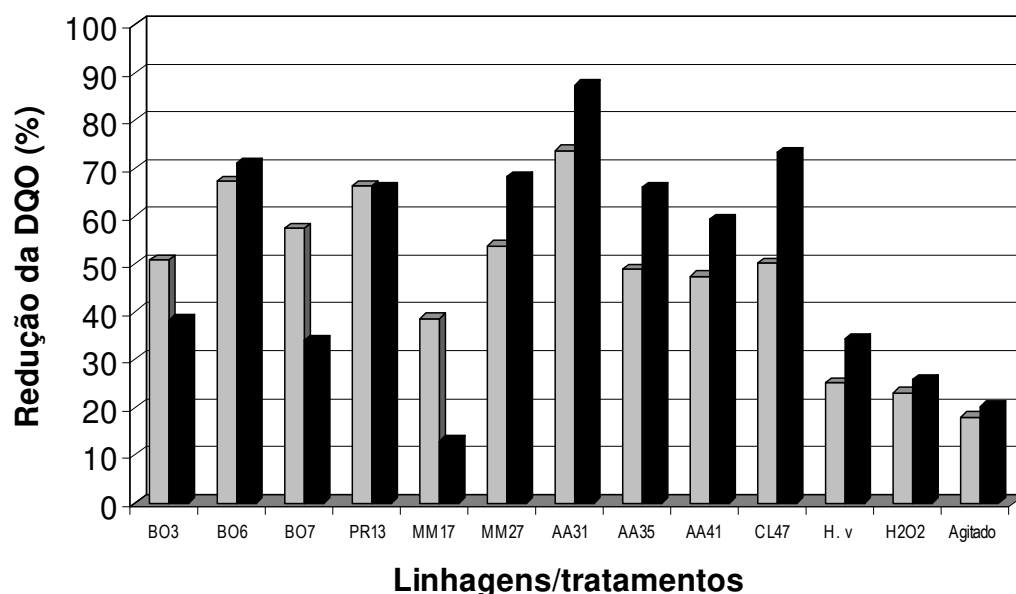


Figura 6.1: Eficiência da redução da DQO em efluente ■esterilizado ou ■ bruto por linhagens de haloarquéias e outros tratamentos

Woolard e Irvine (1995) estudaram a capacidade de haloarquéias e halobactérias para degradar efluentes sintetizados em laboratório com salinidade e componentes semelhantes aos da água de produção como fenol. Após a tentativa de isolar microrganismos em salinidades altas verificaram que somente halobactérias e haloarquéias foram capazes de crescer em meios com salinidade semelhante ao da água de produção e, além disso, de degradarem o fenol.

6.3.2 Biorremediação da água produzida em extração de petróleo por bactérias halofílicas e consórcios microbianos

A partir dos resultados obtidos através da DQO do efluente bruto (DQO inicial) e dos tratados com as diferentes linhagens de bactérias halofílicas, consórcios microbianos, agitação e adição de peróxido de hidrogênio, foi calculada a porcentagem de redução da DQO (**Tabela 6.2**). Todos os tratamentos reduziram a DQO em no mínimo 40,52%, quando o efluente não foi esterilizado. Neste caso o melhor resultado foi apresentado pela linhagem *H. organivorans* (89,51%), seguido pelas linhagens *A. aquaeolei* e *M. tunisiensis* (80,81% e 80,37%, respectivamente).

Tabela 6.2: Redução da DQO pelas linhagens de bactérias halofílicas, consórcios e outros tratamentos em meio bruto ou esterilizado

Tratamento	Redução DQO (%) Bruto	Redução DQO (%) Estéril
Trat. Petrob	15,68	-
<i>A. aquaeolei</i>	80,81	47,95
<i>M. tunisiensis</i>	80,37	53,53
<i>H. organivorans</i>	89,51	66,54
Consórcio	79,18	52,49
Agitado	64,08	10,78
Peróxido	40,52	22,23

Quando o efluente foi esterilizado o resultado menos relevante foi o alcançado através da agitação (10,78%), o que seria esperado já que, a partir do momento que este foi esterilizado não existem microrganismos para degradar os compostos orgânicos. Esta pequena porcentagem de degradação pode ser devido a fotodegradação. O melhor resultado foi observado também pela linhagem *H. organivorans* (66,54%), seguido pela linhagem *M. tunisiensis* e o consórcio (53,53% e 52,49%) (**Tabela 6.2**).

De modo geral, quando o efluente não foi esterilizado a redução da DQO foi superior, isto se deve provavelmente à atuação da microbiota natural deste tipo de resíduo, ou então, a

microrganismos já adaptados que tenham contaminado o efluente na sua formação, transporte ou armazenamento (**Figura 6.2**).

Estes resultados foram comparados com a DQO do efluente bruto (1345 mg.L⁻¹). A título de comparação o efluente tratado pela Petrobrás foi fornecido para algumas análises e a redução da DQO neste caso foi de apenas 15,68%. Segundo o Engenheiro da Petrobrás Maurício Grimaldi através de comunicação informal, o tratamento que é realizado pela Petrobrás é apenas químico, não existindo nenhuma fase biológica.

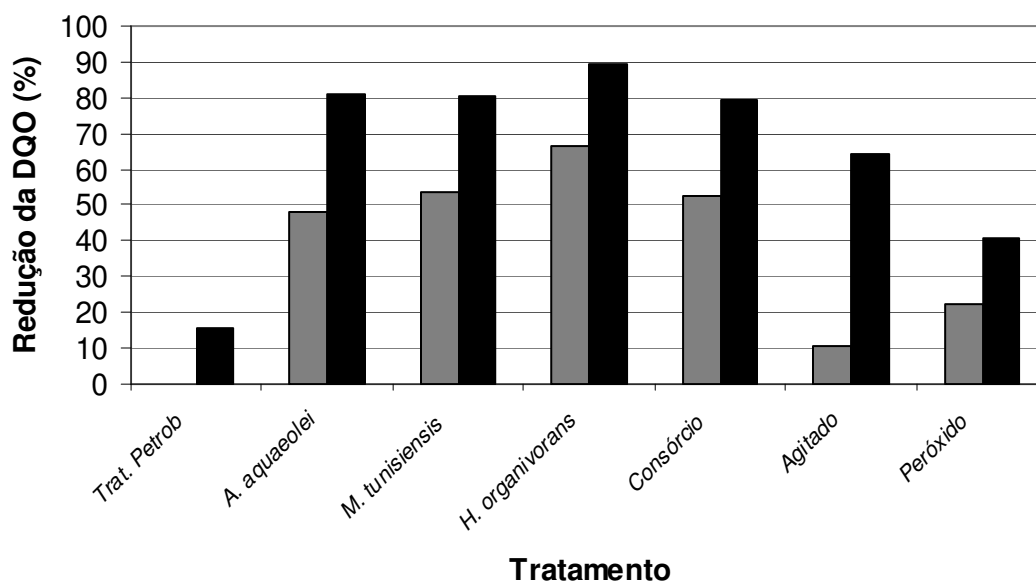


Figura 6.2: Eficiência da redução da DQO em efluente ■ bruto ou ■ esterilizado por linhagens de bactérias halofílicas, consórcios microbianos e outros tratamentos

Segundo Grimaldi (2007), o tratamento da água de produção realizado pela Petrobrás, segue os seguintes passos: (1) água passa por um flotador com a adição de polieletrólito para retirada de óleos e graxas; (2) segue para um tanque com adição de peróxido de hidrogênio para

eliminação de sulfetos; (3) segue para outro tanque que reduz o pH com ácido sulfúrico, adição de sulfato ferroso como catalisador e recebe peróxido para redução dos fenóis e após esse tratamento (4) é neutralizado e segue para o emissário.

Muitos estudos foram realizados utilizando consórcios microbianos, pois geralmente esses produzem melhores resultados de degradação do que culturas isoladas (BORGNE et al., 2008). Um consórcio bacteriano isolado no Mar do Norte e capaz de metabolizar hidrocarbonetos de petróleo a uma faixa de salinidade de 0 a 22% de NaCl incluía principalmente *Marinobacter* ssp., *Erwinia ananas* e *Bacillus* spp. (DÍAZ et al., 2002; 2004).

6.3.3 Produção de Biossurfactantes em Água Produzida na Extração de Petróleo

A redução da tensão superficial das bactérias halofílicas e os consórcios microbianos não apresentaram bons resultados neste tipo de efluente, já que assim como o meio utilizando fenol, este também não possui alta quantidade de óleos.

A **Tabela 6.3** mostra que a maior redução da tensão ocorreu no efluente bruto, o qual recebeu apenas agitação, ou seja, a microbiota original do efluente estava atuando (53,55 mN/m). As três bactérias halofílicas quando crescidas em efluente esterilizado apresentaram resultados semelhantes ao redor de 55 mN/m. Os resultados de emulsificação foram baixos neste tipo de fonte utilizada e a formação de halo não foi significativa (**Tabela 6.3**). Porém os resultados apresentados neste tipo de meio de cultivo (efluente) foram melhores que em meio contendo apenas fenol. Neste caso, o consórcio apresentou o melhor perfil de produção de biossurfactantes.

Tabela 6.3: Tensão superficial, emulsificação e formação de halo das bactérias halofílicas crescidas em água de produção individualmente ou em consórcios microbianos

Tratamento	Tensão Superficial (mN m ⁻¹)	Emulsificação (DO ₆₁₀ nm)	Halo (mm)
Bruto	59,00	0,110	1,00
Tratado Petrobrás	57,70	0,090	1,00
AP esterilizado	55,55	0,130	1,00
AP Bruto	59,20	0,072	1,00
HU esterilizado	55,30	0,015	1,00
HU bruto	59,50	0,050	1,5
<i>H. organivorans</i> esterilizado	55,90	0,025	1,00
<i>H. organivorans</i> Bruto	57,95	0,098	1,00
Consórcio esterilizado	55,05	0,145	1,00
Consórcio bruto	57,05	0,150	1,00
Aagitado esterilizado	56,85	0,080	1,00
Aagitado bruto	53,55	0,055	1,00

Apesar dos resultados apresentados não serem satisfatórios, ou seja, não apresentando alta atividade surfactante e emulsificante, segundo Banat e colaboradores (2000), a fonte de carbono utilizada para medir a atividade surfactante pode não propiciar a síntese destes compostos.

6.4 Conclusões

- ✓ A linhagem AA31 foi responsável pela maior redução da DQO da água de produção, tanto no meio bruto (87,4%), como no meio esterilizado (73,8%).
- ✓ A DQO da água de produção de petróleo foi melhor reduzida pela linhagem *H. organivorans* tanto em efluente bruto, quanto em efluente esterilizado;
- ✓ O melhor perfil de produção de biossurfactantes em água de produção de petróleo foi o consórcio 1.

6.5 Referências bibliográficas

BANAT, I. M., MAKKAR, R. S., CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** V. 53, p. 495-508, 2000.

BORGNE, S. L., PANIAGUA, D., VAZQUEZ-DUHALT, R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnonology** v.15, p.74-92, 2008.

DÍAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. **Int. Microb.**, v. 7, p.173-80, 2004.

DÍAZ MP, BOYD KG, GRIGSON SJW, BURGESS JG: Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers. **Biotechnol. Bioeng.**, v.79, p.145–153, 2002.

GRIMALDI, M. Tratamento da água de produção de petróleo realizada pela Petrobrás. 15/04/2008. São Sebastião-SP. Entrevista concedida a Maricy Raquel Lindenbah Bonfá.

WOOLARD, C. R., IRVINE, R. L. Treatment of hypersaline Wastewater in the Sequencing Batch Reactor, **Water Research**, v. 29 (4), p. 1159-1168, 1995.

7 Conclusões gerais

- ✓ As haloarquérias estudadas, pertencentes ao gênero *Haloferax*, demonstraram potencial de crescimento e degradação de compostos monoaromáticos e poliaromáticos;
- ✓ As bactérias halofílicas possuem grande potencial de crescimento e degradação de fenol como única fonte de carbono e energia, principalmente a linhagem HU isolada em Huelva-Espanha e identificada como *Modicisalibacter tunisiensis*;
- ✓ As três espécies de bactérias halofílicas possuem os genes responsáveis pelas enzimas de degradação catecol 1,2-dioxigenase e protocatecuato 2,3-dioxigenase;
- ✓ Tanto as linhagens de haloarquérias quanto as linhagens de bactérias halofílicas evidenciaram a capacidade de biorremediação da água de produção petróleo.