



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

Atividades Enzimáticas e de Biodegradação de Microrganismos
do Petróleo da Bacia de Campos (Pampo Sul)

Suzan Pantaroto de Vasconcellos

ORIENTADORA

PROFA. DRA. ANITA JOCELYNE MARSAIOLI

CO-ORIENTADORA

DRA. VALÉRIA MAIA DE OLIVEIRA

Campinas – São Paulo

Outubro/2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

V441a	<p style="text-align: center;">Vasconcellos, Suzan Pantaroto de. Atividades enzimáticas e de biodegradação de microrganismos do petróleo da Bacia de Campos (Pampo Sul) / Suzan Pantaroto de Vasconcellos. -- Campinas, SP: [s.n], 2006.</p> <p style="text-align: center;">Orientadora: Anita Jocelyne Marsaioli.</p> <p style="text-align: center;">Co-orientadora: Valéria M. de Oliveira.</p> <p style="text-align: center;">Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p style="text-align: center;">1. Petróleo. 2. Biocatálise. 3. Biotransformação. 4. Exopolímeros. I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Oliveira, Valéria M. de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.</p>
-------	---

Título em inglês: Enzymatic and biodegrader activities of petroleum microorganisms from Campos Basin (Pampo Sul)

Palavras-chaves em inglês: Petroleum, Biocatalysis, Biotransformation, Exopolymers

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli (orientadora), Dra. Valéria M. de Oliveira (co-orientadora), Dr. Luiz Antonio Freitas Trindade, Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche, Profa. Dra. Luzia Koike, Profa. Dra. Ljubica Tasic Suplentes: Prof. Dr. Paulo José Samenho Moran, Dr. Eugênio Vaz dos Santos Neto, Prof. Dr. Lauro Euclides Soares Barata.

Data de defesa: 25/10/2006

*Dedico este trabalho à Deus, ao meu
amado esposo, André, aos meus
queridos pais, Marluce e Ecydir e ao
meu querido irmão Maurício, com
muito amor!*

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Profa. Dra. Anita J. Marsaioli, por todos os ensinamentos, por ter apostado e confiado em mim, por toda sua dedicação, paciência e por me fazer enxergar toda a Química da Vida! Muito obrigada por tudo!!!

À minha querida co-orientadora e amiga de longa data (10 anos!!!), Dra Valéria Maia de Oliveira (Val), por sua orientação tanto profissional, quanto pessoal, amizade sincera, por ser um verdadeiro exemplo de ser humano e pesquisadora a ser seguido, muito obrigada!

Ao Dr. Eugenio Vaz dos Santos Neto, pela supervisão, apoio incondicional, profissionalismo e ótimas sugestões no desenvolvimento do trabalho.

Aos professores do Instituto de Química da Unicamp, em especial aos professores Anita J. Marsaioli, Sebastião Fonseca, Luzia Koike, Francisco Reis, Aderbal e Eva Magalhães, Fernando Coelho, Paulo M. Imamura, Paulo J. S. Moran, Ljubica Tasic (Buba), Raquel M. Braga, Lauro E. Barata, Roberto Rittner Neto pelas sugestões em exames de qualificação geral e de área, por disciplinas ministradas, contribuições diretas ou indiretas à realização do trabalho, pelos ensinamentos e amizade.

Aos meus queridos amigos do grupo: Lucimar (Lucinha, amigona de longa data), Isis (Iji), Diego (Filhinho), Jimena (Ji), Letícia (Lê), Luciana (Lu), Sérgio (Xerginho), Simone (Si), Lu Chen, Luiz Fernando (Cabeca), Georgiana (Gê), Carla (Carlinha), Marcela (Má), Adriana Pianaro (Dri), Armando, Milena, Júlia, Eduardo Mattoso, Fernando (Fer), Mariza (Marizinha), Beatriz (Bia), Adriana Flach (Adri) e Luiz Antonio, pela ótima convivência durante todos estes anos. Um agradecimento especial à minha dinda Iji e ao filhote Diego por me fazerem sorrir mesmo nos momentos mais difíceis!! Amigos para sempre!

Aos amigos de outros grupos de pesquisa do IQ-Unicamp: Mary, Liliane (Lilica), Cíntia, Humberto, Alex, Sidney, Inês, Leila, Maíra, Duda, Bruno, Patrícia, Lívia, Zaine, Ilton, Renan, Sérgio e todos as pessoas que as vezes posso não ter descrito seu nome aqui, mas que também permanecerão em minhas boas lembranças.

À D. Maria, nossa querida técnica do laboratório de Química, por toda a sua dedicação, amizade, conselhos e por ser uma pessoa maravilhosa.

Às técnicas do Labiosin, Juliana, Andréia e Ariane, por toda a ajuda durante a realização do trabalho e pela ótima convivência e amizade.

Ao pessoal da CPG do IQ: Bel, Rodrigo, Elias, André e ao Prof. Dr. Munir, por toda a paciência, eficiência e amizade adquirida durante o período de doutorado.

Às meninas do laboratório de RMN, Sônia, Soninha e Paula, pela eficiência e amizade.

Ao pessoal da biblioteca do IQ, diretoria, expediente, compras, almoxarifado, enfim todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Sr. Fontana, Cláudio e Marcos (vidraria); ao Pimpim (gases); ao Iveraldo (desenho); ao Samuel e ao Valdir (Informática).

Aos meus amigos e amigas de hoje e sempre: Rodrigo (Bit); Darlan; Milena (minha dindinha); Ângela; Jaira (Jhei), Ana Paula, Susequil e Fabiana.

À Lara, Fabiana, Milena e todo o pessoal do CPQBA, pela amizade, apoio e confiança.

À Karen Simioni, pela parceria, paciência, competência e pela grande amizade!!

Aos amigos do laboratório de Biogeoquímica da Universidade de Hamburgo: Andréa, Alex, Anne Arja, Ariane Birte, Dirk, Eva, Jan, Martin, Phil, Ralph, Sabine, Sascha, Stefan e Stephan por toda a ajuda no trabalho e por todos os momentos maravilhosos que passamos juntos!

Ao Prof. Dr. Walter Michaelis (Universidade de Hamburgo), pela supervisão durante a realização das análises dos exopolímeros, pela oportunidade de estagiar em seu laboratório, pela grande parceria, ótima convivência e ensinamentos inestimáveis.

Ao Dr. Gilson P. Manfio, sempre me guiando, sem o qual eu nunca teria encontrado a Profa. Anita e realizado meu tão sonhado doutorado em Biogeoquímica!

Ao convênio DAAD – CAPES, pela bolsa e apoio financeiro concedido durante minha estadia na Alemanha.

À CAPES, pela bolsa concedida durante todo o período de doutorado.

À Petrobras e Finep pelo apoio financeiro na compra de equipamentos e insumos sem os quais não seria possível a realização do trabalho.

Aos meus queridos e amados pais, Marluce e Ecydir, pelo amor, confiança, fé, carinho e por serem meu porto seguro e fonte de inspiração em tudo por toda a minha vida. Ao meu irmão maravilhoso Mauricio, que amo muito.

À minha grande família que me acolheu com tanto carinho, Aldinha, Sr. Fernando, Aninha, Fernando, Pedrinho, Bel, Michel, Dudu, Cris e Marcelo (Elo), por toda a força, carinho e confiança.

E finalmente a você Dé, meu amor eterno, meu esposo, a quem devo toda esta tese, por todo seu amor, paciência, conselhos, apoio em todas as decisões, companheirismo, carinho, agradeço muito por você existir e por estar ao meu lado sempre, amo você.

CURRICULUM VITAE

SUZAN PANTAROTO DE VASCONCELLOSsupantaroto@yahoo.com.br**1. FORMAÇÃO E TÍTULOS ACADÊMICOS****- 2002-2006: Doutorado em Ciências,**

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP

Áreas de Concentração: Biodegradação de biomarcadores do petróleo e reações biocatalíticas

Título da Tese: **Atividades Enzimáticas e de Biodegradação de Microrganismos do Petróleo da Bacia de Campos (Pampo Sul)**

Orientador: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli (Instituto de Química - Unicamp)

Co-orientador: Dra. Valéria Maia de Oliveira (CPQBA - Divisão de Recursos Microbiológicos - Unicamp)

- 1999-2001: Mestrado em Agronomia,

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, SP.

Áreas de Concentração: Microbiologia do solo e experimentos de biodegradação

Título da Dissertação: **Isolamento, Seleção e Identificação de Microrganismos Aeróbios *in situ*, com habilidade à biodegradação de linamarina.**

Orientador: Profa. Dra. Marney Pascoli Cereda (CERAT, Unesp)

Co-orientador: Dr. Gilson P. Manfio (Natura)

- 1995-1997: Graduação, Bacharel em Farmácia,

Universidade São Francisco - USF, Bragança Paulista, SP.

2. PUBLICAÇÕES MAIS RELEVANTES

SETTE, L.D.; SIMIONI, K.C.M.; VASCONCELOS, S. P. ; DUSSÁN, L.J. ; MARSAIOLI, A.J.; SANTOS NETO, E.V ; OLIVEIRA, V. M. . Analysis of composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin (aceito para publicação). *Antonie van Leeuwenhoek*, 2006, no prelo.

VASCONCELLOS, S.P. ; CRUZ, G. F. ; DUSSAN, L. J. ; OLIVEIRA, V. M. ; S. NETO, E. V. ; MARSAIOLI, A. J. Investigations about biodegraders activities of anaerobic and aerobic bacteria from Campos Basin, Brazil . (em elaboração).

VASCONCELLOS, S.P.; WIELAND, A.; KLOCK, J.; BLUMENBERG, M.; MARSAIOLI, A.J.M.; OLIVEIRA, V.M.; SANTOS NETO, E.; MICHAELIS, W. The role of bacterial exopolymeric substances (EPS) in the biodegradation of crude oil compounds. (em elaboração).

CRUZ, G.F.; **VASCONCELLOS, S.P.**; OLIVEIRA, L.G.; MANTOVANI, S.M.; MARSAIOLI, A.M. Fluorescence-based assays for detect Baeyer-Villiger monooxygenases in brazilian microorganisms. 16th International Conference on Organic Synthesis. Merida – Yucatan, 2006.

MANTOVANI, S.M.; **VASCONCELLOS, S.P.**; OLIVEIRA, L.G.; CRUZ, G.F.; MARSAIOLI, A.J. High throughput screening for detection of hydrolytic enzymes in brazilian microorganisms. 16th International Conference on Organic Synthesis. Merida – Yucatan, 2006.

RODRIGUES, D. C. ; **VASCONCELLOS, S.P.** ; ALVES, P. B. ; NASCIMENTO, L. R. ; ABREU FILHO, B. A. ; OLIVEIRA, V. M. ; MANFIO, G. P. ; S. NETO, E. V. ; MARSAIOLI, A. J. Relationship between cyclohexyl-alkanoic acids and the acidothermophilic bacterium *Alicyclobacillus* spp.: Evidence from Brazilian Oils. *Organic Geochemistry*, v. 36 (2), p. 1443-1453, 2005.

PANTAROTO, S.; OLIVEIRA, V.M.; SIMIONI, K.C.; S. NETO, E. V.; MARSAIOLI, A.J. Selecting aerobic bacteria form petroleum formation water of special biodegradation characteristics. 22nd International Meeting on Organic Geochemistry. Sevilla, 2006.

PANTAROTO, S.; SENATORE, D.B.; OLIVEIRA, V.M., S. NETO, E.V.; MARSAIOLI, A.J. Phytane Aerobic Biotransformation by Microbial Consortium and Isolated Bacteria of Petroleum Formation Water from Campos Basin, Brazil. 9º Congreso Latinoamericano de Geoquímica Orgánica. Mérida – Yucatan, 2004.

PANTAROTO, S.; MARSAIOLI, A.J.; MANFIO, G.P.; SIMIONI, K.C.; CABRINI, L.G.; OLIVEIRA, V.M. Estudo da Biotransformação Anaeróbia de Biomarcadores de Petróleo da Bacia de Campos, RJ. XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia. Florianópolis, 2003.

OLIVEIRA, M.A ;**PANTAROTO, S. ;** CEREDA, M. P. . Efeito da sanitização e de agente antioxidante em raízes de mandioca minimamente processadas. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 6 (2), p. 339-344, 2003.

PANTAROTO, S.; CEREDA, M. P. . Adaptação microbiana e capacidade de redução do conteúdo cianogênico de manipueira, utilizando-a como fonte de energia. *Energia na Agricultura*, v. 18 (1), p. 13-21, 2003.

3. CAPÍTULOS DE LIVROS

CAGNON, J. R, **PANTAROTO, S. ;** CEREDA, M. P. . Glicosídeos cianogênicos da mandioca: biossíntese, distribuição, destoxificação e métodos de dosagem.. In: Marney Pascoli Cereda. (Org.). Agricultura: Tuberosas Amiláceas Latino-Americanas. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2002, v. 2, p. 83-99.

PANTAROTO, S.; CEREDA, M. P. . Linamarina e sua Decomposição por Microrganismos. In: Marney Pascoli Cereda. (Org.). Manejo, Uso e Tratamento de Subprodutos da Industrialização de Mandioca. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2001, v. 4, p. 38-47.

4. BOLSAS DE FOMENTO RECEBIDAS

Doutorado: Área: Química, Bolsista CAPES; Vigência: 01/08/2002 à 30/07/2006; Nível Doutorado. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP.

Mestrado: Área: Agronomia, Bolsista FAPESP; Vigência: 01/08/1999 à 30/07/2001; Nível Mestrado. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP

Iniciação Tecnológica Industrial: Área: Biologia Geral, Bolsista CNPQ; Vigência: 01/08/1996 à 30/07/1997; Nível 1 A. Fundação André Tosello de Pesquisas e Tecnologia, Campinas, SP.

5. OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES

Participação em Projetos:

Projetos CTPETRO I e II: Caracterização de Processos Biogeoquímicos em Acumulações de Petróleo. Convênio Petrobras / Finep

Experiências Internacionais:

- Projeto CAPES – DAAD: estágio de 3 meses (abril à julho, 2006) realizado na Universidade de Hamburg, Alemanha, sob orientação do Prof. Dr. Walter Michaelis. Projeto: “The role of bacterial exopolymeric substances (EPS) in the biodegradation of crude oil compounds”.
- Participação e apresentação de trabalho no Congresso IMOG (International Meeting of Organic Geochemistry) Sevilla, Espanha, 2005.

Apresentações Oraís em Eventos Científicos:

"Ensaios de Triagem de Alto Desempenho para a Detecção de Esterases e Lipases em Bactérias do Petróleo da Bacia de Campos, RJ"

III Workshop de Biocatálise e II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones, São Paulo, Brasil, 2006.

"Estudo da Biotransformação Anaeróbia de Biomarcadores de Petróleo da Bacia de Campos, RJ"

XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santa Catarina, Brasil, 2003.

Programas de Estágio Docente:

** Programa de Estágio Docente Supervisionado (GII)*

Local: Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP.

Supervisor: Profª. Dra. Luzia Koike

Disciplina: Sínteses Orgânicas e Inorgânicas (QG-650) – Experimental

Períodos: julho/2003 à novembro/2003 e agosto/2004 à dezembro/2005.

** Programa de Formação Continuada de Professores do Ensino Fundamental e Médio Teia do Saber*

Atividade: Docente

Período: abril a dezembro de 2005.

Resumo

ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E DE BIODEGRADAÇÃO DE MICRORGANISMOS DO PETRÓLEO DA BACIA DE CAMPOS (PAMPO SUL)

Palavras-chave: *petróleo; biocatálise; biotransformações; exopolímeros.*

Amostras de águas de formação de petróleo e óleos foram coletadas na Formação Pampo, situada na Bacia de Campos, através das quais, aplicando-se diferentes condições de cultivo, foram recuperadas 92 linhagens de bactérias aeróbias. Dentre os isolados, obtidos, 29 foram identificados por técnicas moleculares baseadas em DNAr 16S, observando-se a predominância de bactérias do gênero *Bacillus*. De forma a constatar sobre a produção microbiana de metabólitos secundários com atividade inibitória ao desenvolvimento de outras espécies no reservatório de petróleo investigado, realizou-se análises de antibiogramas e Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC), constatando *Bacillus* possuíam tal atividade. Sob condições anaeróbias foram obtidos consórcios microbianos, os quais foram caracterizados por técnicas independentes-de-cultivo, identificando-se bactérias do gênero *Petrotoga* como constituintes majoritários das comunidades presentes nos poços de petróleo amostrados. Duas espécies distintas de arqueias metanogênicas, *Methanohalophilus* sp. e *Methanomethylovorans* sp., também foram identificadas. Foram realizadas análises para a detecção da atividade biodegradadora da microbiota anaeróbia sobre biomarcadores do petróleo, onde foi observada forte tendência da comunidade microbiana investigada à biotransformação de compostos oxigenados (ácido octadecanóico; α e β -amirina). A biodegradação de biomarcadores do petróleo sob condições aeróbias revelou que a maioria das 29 bactérias avaliadas demonstrou tendência à biotransformação de ácidos carboxílicos de cadeia longa (ácido nonadecanóico). A linhagem de *Micrococcus* sp., entretanto, foi exceção a esta tendência, biotransformando preferencialmente hidrocarbonetos (fitano e

diidrofenantreno), mesmo em presença de compostos oxigenados. A existência de interações simbióticas entre as comunidades microbianas aeróbias e anaeróbias nos processos de biodegradação de biomarcadores do petróleo, foi avaliada simulando atuação de ambas as microbiotas sobre uma mistura de hidrocarbonetos e compostos oxigenados. Os resultados obtidos sugeriram que a microbiota anaeróbia poderia sobreviver às custas dos metabólitos produzidos pela microbiota aeróbia durante a biodegradação do petróleo. A produção de exopolímeros microbianos com atividade bioemulsificante de hidrocarbonetos também foi determinada, verificando-se que microrganismos tidos com excelentes produtores de EPS não corresponderam às linhagens que apresentaram atividade biodegradadora de hidrocarbonetos do petróleo. Análises de triagens enzimáticas de alto desempenho (HTS) foram realizadas, e *Dietzia* sp. sobressaiu-se quanto às excelentes atividades de lipases, esterases e monooxigenases, enquanto *Halomonas* sp. apresentou o melhor desempenho quanto à atividade de epóxido hidrolase.

*Abstract***Enzymatic and Biodegrader Activities of Petroleum Microorganisms from Campos Basin (Pampo Sul)**

Keywords: *petroleum; biocatalysis; biotransformations; exopolymers.*

Samples of petroleum formation water and oils were collected from Pampo Formation (Campos Basin). Applying different conditions of microbial cultivation it was recuperated 92 bacterial strains from among 29 were identified by molecular techniques based in rDNA 16S. The predominance of *Bacillus* genus was observed in this recuperated bacterial community. The production of microbial secondary metabolites with antibiotic activity was investigated through analysis of antibiograms and Microbial Inibitory Concentrations (MIC) assays. Strains of *Bacillus* produced metabolites with microbial growth inhibition that can actuate in the petroleum reservoir in the selection of microbial species. Under anaerobic conditions microbial consortia were characterized by independent of cultivation techniques, identifying bacteria of *Petrotoga* genus as main constituent from the sampled reservoir. Two distinct species of methanogenic archaea, *Methanohalophilus* sp and *Methanomethylovorans* sp, were identified too. Analysis for the detection of the biodegrader activities of anaerobic microbiota under petroleum biomarkers were realized. Strong tendency of this microbial community to oxygenated compounds biotransformation was observed. The biodegradation of petroleum biomarkers under aerobic conditions was investigated as a form to determinate the microbial preferences for the petroleum compounds, in mixture or isolate, evaluating the formed products. The results presented the preference for the biotransformation of long chain carboxylic acids before the metabolism of hydrocarbons. Although, the strain of

Micrococcus sp. preferred the biotransformation of hydrocarbons (phytane and dihydrophenanthrene), not biodegrading the fatty acid in strong levels. To investigate about the existence of symbiotic interactions between aerobic and anaerobic microbial communities in petroleum biodegradation processes, the actuation of the both microbiota under a mixture of hydrocarbons and oxygenated compounds was simulated. The obtained results suggest that the anaerobic microbiota can survive from the aerobic metabolites produced by the aerobic community. The production of microbial exopolymers with bioemulsifier activity of hydrocarbons was determined too. It was verified that strains presented as excellent producers of bioemulsifiers are not efficient petroleum biodegraders. Analysis of High Throughput Screening (HTS) were realized and *Dietzia* sp. presented strong activities of lipases, esterases and monooxygenases, while *Halomonas* sp. was the best result how the epoxide hydrolase activity.

Índice

<i>Lista de Abreviaturas e Símbolos</i>	<i>xxi</i>
<i>Lista de Figuras</i>	<i>xxiii</i>
<i>Lista de Tabelas</i>	<i>xxix</i>
<i>Lista de Esquemas</i>	<i>xxxi</i>

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. PETRÓLEO E SUA ORIGEM	1
1.2. MICRORGANISMOS EXTREMÓFILOS	4
1.3. BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO E ARQUÉIAS METANOGÊNICAS	5
1.4. BIODEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO	9
1.5. PRODUÇÃO MICROBIANA DE SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES	19
1.6. ATIVIDADES BIOCATALÍTICAS	25
2. OBJETIVOS	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1. CAPÍTULO 1 – ENRIQUECIMENTOS E CARACTERIZAÇÕES DE LINHAGENS MICROBIANAS AERÓBIAS E ANAERÓBIAS	37
3.1.1. ENRIQUECIMENTOS E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSÓRCIOS MICROBIANOS ANAERÓBIOS	37
3.1.2. ENRIQUECIMENTOS MICROBIANOS AERÓBIOS	44
3.1.2.1. RECUPERAÇÃO DA MICROBIOTA AERÓBIA DE ÁGUAS DE FORMAÇÃO E ÓLEOS DO RESERVATÓRIO PAMPO	45
3.1.2.2. IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS AERÓBIAS OBTIDAS	48
3.1.3. ENSAIOS DE ANTIBIOGRAMA E MIC (CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA)	54
3.1.I. CONCLUSÕES PARCIAIS – CAPÍTULO 1	61

3.2. CAPÍTULO 2 – BIOTRANSFORMAÇÕES AERÓBIAS E ANAERÓBIAS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DO PETRÓLEO	63
3.2.1. BIOTRANSFORMAÇÕES ANAERÓBIAS DE HIDROCARBONETOS E COMPOSTOS OXIGENADOS	63
3.2.2. BIOTRANSFORMAÇÕES AERÓBIAS DE BIOMARCADORES DO PETRÓLEO	71
3.2.2.1. ABORDAGEM 1	72
3.2.2.2. ABORDAGEM 2	93
3.2.2.3. ABORDAGEM 3	103
3.2.I. CONCLUSÕES PARCIAIS – CAPÍTULO 2	109
3.3. CAPÍTULO 3 – PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXOPOLÍMEROS DE BACTÉRIAS DO PETRÓLEO BRASILEIRO	111
3.3.1. PRODUÇÃO DE EPS E CRESCIMENTO BACTERIANO	111
3.3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS EXOPOLÍMEROS MICROBIANOS	118
3.3.3. BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS	122
3.3.I. CONCLUSÕES PARCIAIS – CAPÍTULO 3	127
3.4. CAPÍTULO 4 – ENSAIOS DE TRIAGEM ENZIMÁTICA DE ALTO DESEMPENHO	129
3.4.1. DETECÇÃO DA ATIVIDADE DE EPÓXIDO HIDROLASES	129
3.4.2. DETECÇÃO DAS ATIVIDADES DE ESTERASES E LIPASE	132
3.4.3. DETECÇÃO DA ATIVIDADE DE BAEYER-VILLIGER MONOOXIGENASES	136
3.4.I. CONCLUSÕES PARCIAIS – CAPÍTULO 4	141
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	143
5. PARTE EXPERIMENTAL	149
5.1. CAPÍTULO 1 – ENRIQUECIMENTOS E CARACTERIZAÇÕES DE LINHAGENS MICROBIANAS AERÓBIAS E ANAERÓBIAS	150

5.1.1. ÁREA DE ESTUDO E COLETA DAS AMOSTRAS	150
5.1.2. ENRIQUECIMENTOS MICROBIANOS ANAERÓBIOS	153
5.1.2.1. ENRIQUECIMENTOS DE ARQUÉIAS METANOGÊNICAS	153
5.1.2.2. ENRIQUECIMENTOS DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO	160
5.1.3. ISOLAMENTO DE CULTURAS ANAERÓBIAS	162
5.1.4. CARACTERIZAÇÃO DOS CONSÓRCIOS MICROBIANOS ANAERÓBIOS – ANÁLISES INDEPENDENTES-DE-CULTIVO	165
5.1.5. ENRIQUECIMENTOS MICROBIANOS AERÓBIOS	167
5.1.5.1. ÁGUAS DE FORMAÇÃO DE PETRÓLEO	167
5.1.5.2. ÓLEOS BRUTOS	171
5.1.6. ISOLAMENTO DAS CULTURAS MICROBIANAS AERÓBIAS	174
5.1.7. IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS AERÓBIAS OBTIDAS	175
5.1.8. ENSAIOS DE ANTIBIOGRAMA E MIC (CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA)	177
5.2. CAPÍTULO 2 – BIOTRANSFORMAÇÕES AERÓBIAS E ANAERÓBIAS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DO PETRÓLEO	180
5.2.1. PREPARO DE SUBSTRATOS AOS EXPERIMENTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO	180
5.2.2. BIOTRANSFORMAÇÕES ANAERÓBIAS DE HIDROCARBONETOS E COMPOSTOS OXIGENADOS PELA MICROBIOTA ANAERÓBIA	186
5.2.3. BIOTRANSFORMAÇÕES AERÓBIAS DE BIOMARCADORES DO PETRÓLEO	190
5.3. CAPÍTULO 3 – PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXOPOLÍMEROS DE BACTÉRIAS DO PETRÓLEO BRASILEIRO	197
5.3.1. REATIVAÇÃO DAS CULTURAS BACTERIANAS	197
5.3.2. PREPARO DE SOLUÇÕES DE SUBSTRATOS ORGÂNICOS	198

5.3.3. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EXOPOLÍMEROS MICROBIANOS	199
5.3.4. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS EPS MICROBIANOS	201
5.3.5. CRESCIMENTO BACTERIANO FRENTE A HIDROCARBONETOS	204
5.3.6. BIODEGRADADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS	204
5.4. CAPÍTULO 4 – ENSAIOS DE TRIAGEM ENZIMÁTICA DE ALTO DESEMPENHO (HTS)	206
5.4.1. REATIVAÇÃO E PREPARO DOS MICRORGANISMOS	206
5.4.2. PREPARO DE SOLUÇÕES	206
5.4.2.1. SONDAS FLUOROGÊNICAS	206
5.4.2.2. SOLUÇÃO TAMPÃO BORATO	207
5.4.2.3. SOLUÇÃO DE PERIODATO DE SÓDIO	207
5.4.2.4. SOLUÇÕES DE BSA	207
5.4.3. ENSAIOS DE HTS	208
5.4.3.1. LEITURAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS DE FLUORESCÊNCIA	208
5.4.3.2. DETECÇÃO DAS ATIVIDADES DE HIDROLASES	209
5.4.3.3. DETECÇÃO DAS ATIVIDADES DE BAEYER-VILLIGER MONOOXIGENASES	209
6. ANEXOS	213

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
BHM	Caldo Bushnell Hass (Bushnell Hass Broth)
BSA	Albumina de Soro Bovino
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
CH ₃ CN	Acetonitrila
CPQBA	Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DBO	Demanda Biológica de Oxigênio
DEPT	“Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNA _r	DNA ribossomal
EM	Espectrometria de Massas
EPS	Substâncias Poliméricas Extracelulares
eV	Elétrons-volt
FID	“Flame Ionization Detector”
GYM	Extrato de Malte e Glicose
<i>Hha</i> I	Endonuclease (enzima de restrição) extraída da bactéria <i>Haemophilus haemolyticus</i>
Hz	Hertz
HTS	Triagem Enzimática de Alto Desempenho(High Throughput Screening)
MB	Caldo Marine (Marine Broth)
MHz	Megahertz
<i>Msp</i> I	Endonuclease (enzima de restrição) extraída da bactéria <i>Moraxella</i> sp.
<i>m/z</i>	Razão entre a massa do fragmento por carga e sua respectiva carga elétrica
M	Mol
mM	milimol
NA	Nutriente Ágar

NB	Caldo Nutriente (Nutrient Broth)
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
nm	Nanômetros
PA	100% de pureza
PAHs	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
PDB	Caldo Dextrose Batata (Potato Dextrose Broth)
RNA	Ácido Ribonucleico
TMS	Tetrametilsilano
TSB	Caldo Trypticase Soja (Trypticase Soy Broth)
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
rpm	Rotações por Minuto
v/v	Relação Volume por Volume
δ	Deslocamento Químico
Ø	Controle negativo

Lista de Figuras

Figura 1	Exemplos de ambientes onde microrganismos extremófilos podem ser encontrados. (a) geleiras; (b) bocas de vulcões.	4
Figura 2	Árvore filogenética simplificada, apresentando os três domínios da vida.	6
Figura 3	Rota proposta por So <i>et al.</i> (2003), para a degradação anaeróbia de <i>n</i> -alcanos via adição de um carbono (carboxilação subterminal ao C3).	13
Figura 4	Representação de parte da rota redutiva para a degradação anaeróbia de naftaleno, 2-metilnaftaleno e tetralina por bactérias redutoras de sulfato.	14
Figura 5	Biodegradação aeróbia de <i>n</i> -alcanos: [A] oxidação monoterminal; [B] oxidação biterminal; [C] oxidação subterminal.	16
Figura 6	Biodegradação aeróbia de hidrocarbonetos aromáticos. Monooxigenase [1]; Dioxigenase [2]; Reações não-específicas [3].	17
Figura 7	Estrutura molecular do emulsan, um biosurfactante comercial produzido pela bactéria <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , em que ácidos graxos encontram-se ligados à heteropolissacarídeos.	20
Figura 8	Ilustração sobre a comunicação intercelular bacteriana EPS.	23
Figura 9	(a) Reação de oxidação com substrato fluorogênico produzindo o ânion umbeliferona, gerando fluorescência. (b) Microplaca ilustrando a fluorescência da umbeliferona em reações positivas quanto á atividade enzimática.	26
Figura 10	Estrutura tridimensional da lipase de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	30
Figura 11	(a) Cromatograma obtido por CG-FID de amostra de metano padrão. (b) Cromatograma obtido por CG-FID de amostra de metano extraída dos ensaios de enriquecimento do inóculo anaeróbio.	38
Figura 12	(a) Microscopia óptica comum: bastonetes Gram negativos, característicos de arqueas metanogênicas. (b) Fluorescência: autofluorescência da célula. (c) Contraste de fase: paredes celulares espessas.	38

Figura 13	Análise de restrição (ARDRA) dos clones de DNAr 16S com a enzima de restrição <i>Msp</i> I, identificando dois perfis distintos.	40
Figura 14	Filogenia das seqüências de DNAr 16S de clones representativos de grupos de ARDRA.	41
Figura 15	Linhagens inoculadas em ágar para identificação por técnicas moléculas baseadas no DNAr 16S.	50
Figura 16	Amostras dos ensaios de antibiograma realizados. (A = controle negativo, ou seja, discos estéreis imersos em água destilada autoclavada).	56
Figura 17	(a) Cromatograma de corrente iônica total do fitano e colestano (0 dia). (b) Cromatograma de corrente iônica total do fitano e colestano (120 dias).	64
Figura 18	(a) Cromatograma de corrente iônica total da amostra metilada do ácido octadecanóico em tempo 0. (b) Cromatograma de corrente iônica total da amostra metilada do ácido octadecanóico, após 90 dias de monitoramento.	66
Figura 19	<u>1</u> a = 18 α (H)-oleanano; <u>1</u> b = 18 β (H)-oleanano (<u>1</u> b).	68
Figura 20	<u>2</u> a = α -amirina; <u>2</u> b = β -amirina	68
Figura 21	(a) Cromatograma de corrente iônica total da mistura de α e β -amirina em tempo 0. (b) Cromatograma de corrente iônica total da mistura de α e β -amirina frente ao inóculo anaeróbico, após 45 dias de incubação.	69
Figura 22	Espectro de massas do drimano rearranjado, obtido a partir da biotransformação anaeróbia de β -amirina.	70
Figura 23	Biomarcadores avaliados quanto à biotransformação anaeróbia: (a) fitano; (b) diidrofenantreno; (c) ácido nonadecanóico; (d) colestano; (e) diidrocolesterol.	72
Figura 24	(a) Cromatograma de corrente iônica total do diidrofenantreno e fitano (tempo 0). (b) Cromatograma de íons totais dos biomarcadores após 32 dias sob ação do <i>Microbacterium</i> sp.	74
Figura 25	(a) Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores após 20 dias de monitoramento. (b) Espectro de massas do composto de <i>m/z</i> 309, detectado após 20 dias de incubação dos biomarcadores junto à <i>Methylobacterium</i> sp.	75

Figura 26	Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores após 35 dias sob ação da <i>Pseudomonas stutzeri</i> .	76
Figura 27	Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores após 40 dias sob ação do <i>Bacillus megaterium</i> .	76
Figura 28	Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores após 35 dias sob ação da <i>Halomonas sp.</i>	77
Figura 29	Perfis de biodegradação do diidrofenantreno por bactérias aeróbias.	79
Figura 30	Perfis de biodegradação do fitano por bactérias aeróbias.	79
Figura 31	Perfis de biodegradação do ácido nonadecanóico por bactérias aeróbias.	80
Figura 32	Perfis de biodegradação do 5α-colestano por bactérias aeróbias.	80
Figura 33	(a) Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, em tempo 0. (b) Cromatograma de íons totais dos biomarcadores, após 35 dias da inoculação de <i>Pseudomonas sp.</i>	83
Figura 34	Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 40 dias da inoculação da <i>Pseudomonas stutzeri</i> .	84
Figura 35	(1) Espectro de massas do metabólito (<i>m/z</i> 386) produzido por <i>Dietzia sp.</i> e <i>Pseudomonas stutzeri</i> .(b) Espectro de massas da 5 α -colestano-2-ona descrito pela biblioteca Wiley 275.	85
Figura 36	Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 10 dias da inoculação da <i>Dietzia sp.</i>	86
Figura 37	(a) Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 35 dias da inoculação de <i>Bacillus pumilus</i> 12. (b) Espectro de massas do composto de <i>m/z</i> 382. (c) Espectro de massas do acetato de 24-cetocolesterila descrito pela biblioteca Wiley 275.	87
Figura 38	Cromatograma de corrente iônica total da mistura de biomarcadores, após 35 dias da inoculação de <i>Achromobacter xylooxidans</i> .	88
Figura 39	Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 20 dias da inoculação da <i>Micrococcus sp.</i>	89

Figura 40	Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 30 dias da inoculação de <i>Brevibacillus sp.</i>	90
Figura 41	Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 25 dias da inoculação de <i>Bacillus subtilis</i> .	91
Figura 42	Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 35 dias da inoculação de <i>Bacillus sp.</i>	91
Figura 43	(a) Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 30 dias da inoculação de <i>Bacillus megaterium</i> 2. (b) Espectro de massas do composto de m/z 386, sugerido como 5- β -colestano-3-ona.	92
Figura 44	Perfil de biodegradação do fitano por <i>Micrococcus sp.</i>	95
Figura 45	(a) Cromatograma de corrente iônica total do fitano frente à <i>Micrococcus sp.</i> , tempo 0. (b) Cromatograma de corrente iônica total do fitano frente à <i>Micrococcus sp.</i> , após 35 dias.	96
Figura 46	Cromatograma de corrente iônica total do fitano e metabólitos formados a partir de sua biotransformação por <i>Micrococcus sp.</i> , após 6 dias da inoculação junto à bactéria.	97
Figura 47	Espectro de massas do 3,7,11-trimetil, dodecanoato de metila (1).	97
Figura 48	Espectro de massas do 4,8,12-trimetil, tridecanoato de metila (2).	97
Figura 49	Espectro de massas de 6,10,14-trimetil, 2-pentadecanona (3).	98
Figura 50	Espectro de massas do 5,9,13-trimetil, tetradecanoato de metila (4).	98
Figura 51	Espectro de massas do 3,7,11,15-tetrametil, 1-hexadecanol (fitol) (5).	98
Figura 52	Espectro de massas do 3,7,11,15-tetrametil, hexadecanoato de metila (ácido fitânico) (6).	99
Figura 53	(a) Cromatograma de corrente iônica total do colestano frente a <i>Bacillus megaterium</i> , tempo 0. (b) Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 30 dias da inoculação de <i>Bacillus megaterium</i> .	101

Figura 54	(a) Cromatograma de corrente iônica total do colestano frente a <i>Bacillus pumilus</i> , tempo 0. (b) Cromatograma de corrente iônica total do colestano, após 30 dias da inoculação de <i>Bacillus pumilus</i> .	102
Figura 55	Perfis de biodegradação dos biomarcadores avaliados frente ao consórcio entre as microbiotas aeróbias e anaeróbias do petróleo.	105
Figura 56	Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, frente às microbiotas, aeróbias e anaeróbias, tempo 0.	105
Figura 57	Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 5 dias de incubação junto às microbiotas.	106
Figura 58	Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 20 dias de incubação junto às microbiotas.	106
Figura 59	Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 120 dias de incubação junto às microbiotas.	107
Figura 60	Curvas de crescimento microbiano de bactérias do petróleo, tendo fenantreno como substrato.	115
Figura 61	Curvas de crescimento microbiano de bactérias do petróleo, tendo octadecano como substrato.	115
Figura 62	Curvas de crescimento microbiano de bactérias do petróleo, tendo fenantreno + octadecano como substratos.	116
Figura 63	Reação de desidratação de pentoses e aldopentoses em meio ácido.	119
Figura 64	Produto formado a partir da reação entre furfural e fenol.	119
Figura 65	Sondas fluorogênicas avaliadas e reações para a detecção da atividade enzimática microbiana de epóxido hidrolases.	130
Figura 66	Atividades enzimáticas microbianas de epóxido hidrolases sobre	130

	as sondas avaliadas.	
Figura 67	Sondas fluorogênicas avaliadas e reação para a detecção da atividade enzimática microbiana de esterases e lipase.	132
Figura 68	Atividades enzimáticas de esterases das bactérias que apresentaram desempenhos de níveis 2 e 3, sobre as sondas ES1 e ES2.	133
Figura 69	Atividades enzimáticas de lipase das bactérias que apresentaram desempenhos de níveis 2 e 3, sobre a sonda LIP1.	133
Figura 70	Sondas fluorogênicas avaliadas e reações para a detecção da atividade enzimática microbiana de Baeyer-Villiger monooxigenases.	136
Figura 71	Atividades enzimáticas de Baeyer-Villiger monooxigenases das bactérias que apresentaram desempenhos de níveis 1 e 2, sobre as sondas S1 e S2.	137
Figura 72	Coleta das amostras na Plataforma Pampo.	151
Figura 73	Técnica de “Roll Tube” para o isolamento de colônias microbianas anaeróbias estritas.	163
Figura 74	Sistema para promoção de atmosfera anaeróbia (N ₂ / CO ₂) acoplado à câmara anaeróbia para a manipulação, plaqueamento e isolamento de culturas anaeróbias.	164
Figura 75	(a) Frascos contendo as amostras de óleos (Coleta 1). (b) Inoculação das amostras em diferentes meios de cultivo. (c)	172

	Amostras inoculadas e com crescimento microbiano.	
Figura 76	Resumo esquemático do procedimento para isolamento das linhagens aeróbias obtidas.	175
Figura 77	Reações para a obtenção do fitano, tendo-se fitol como material de partida.	184
Figura 78	Curva de calibração de glicose, incluindo equação de regressão linear, definindo linha de tendência entre os pontos.	202

Lista de Tabelas

Tabela 1	Níveis de biodegradação enumerados em escala de 1 a 10, segundo Peters e Moldowan (1993).	3
Tabela 2	Mudanças físicas e químicas que ocorrem durante a biodegradação do óleo bruto à gás natural.	10
Tabela 3	Linhagens identificadas a partir das diferentes amostras avaliadas.	49
Tabela 4	Resumo dos melhores resultados encontrados (“Antibiograma adaptado” e MIC).	59
Tabela 5	Biodegradação de Fitano e Diidrofenantreno.	73
Tabela 6	Taxas de biodegradação dos biomarcadores pelas linhagens aeróbias.	81
Tabela 7	Produção de EPS por bactérias aeróbias de petróleo brasileiro.	113
Tabela 8	Produção de EPS (%) em função do aumento da biomassa.	114
Tabela 9	Teor de carboidratos dos EPS bacterianos produzidos frente aos diferentes substratos avaliados.	120
Tabela 10	Taxas de biodegradação dos hidrocarbonetos, tanto isoladamente, quanto em mistura, pelas bactérias que sobressaíram quanto à produção de EPS, ou crescimento microbiano junto aos substratos avaliados.	123
Tabela 11	Intensidades relativas de fluorescência das biorreações com os microrganismos que apresentaram atividade enzimáticas de hidrolases.	135
Tabela 12	Intensidades relativas de fluorescência das biorreações com os microrganismos que apresentaram atividades enzimáticas de monooxigenases.	139
Tabela 13	Detalhes sobre os poços amostrados na Plataforma Pampo (Coleta 1).	152
Tabela 14	Detalhes sobre os poços amostrados na Plataforma Pampo (Coleta 2).	152
Tabela 15	Composição do meio basal Zinder.	153

Tabela 16	Composição da solução de metais traço.	154
Tabela 17	Composição nutricional do meio de enriquecimento da microbiota metanogênica de águas de formação e óleos da Bacia de Campos.	156
Tabela 18	Composição da solução de vitaminas.	156
Tabela 19	Composição da solução de vitaminas BRS.	161
Tabela 20	Composição do meio BAT.	169
Tabela 21	Composição da Solução de Elementos Traço, adicionada ao meio BAT.	169

Lista de Esquemas

Esquema 1	Sistema para implementação de atmosfera anaeróbia em meios de cultura e soluções.	155
Esquema 2	Protocolo utilizado para obtenção de extratos orgânicos para análise cromatográfica.	188
Esquema 3	Resumo esquemático da metodologia adotada nos ensaios de biotransformação.	192

1. INTRODUÇÃO

1.1. PETRÓLEO E SUA ORIGEM

Para que haja a formação do petróleo é necessário que a matéria orgânica se deposite em ambientes com pouco oxigênio (anóxia), pois em ambientes ricos em oxigênio, a biodegradação da matéria orgânica é total, levando à formação de CO₂ e H₂O (Tissot e Welte, 1984)¹.

No processo de sedimentação, a matéria orgânica deposita-se continuamente à razão de 5 a 500 metros por milhões de anos, de acordo com seu peso, forma e tamanho (Restlé, 1984)². Com o soterramento progressivo inicia-se a transformação da matéria orgânica, ocorrendo intensa atividade microbiana, onde grupos funcionais começam a ser eliminados e as ligações com heteroátomos são quebradas. A matriz mineral, rica em centros catalíticos, ativa as reações físico-químicas (hidrólise, desidratação e desaminação). Neste **primeiro estágio evolutivo**, denominado como *Diagênese*, ocorre a transformação do biopolímero inicial em um geopolímero, o querogênio. Sua composição é controlada, principalmente, pelas características da matéria orgânica inicial e pela natureza e extensão da atividade microbiana na sedimentação¹.

No **segundo estágio evolutivo**, a *Catagênese*, ocorrem processos termoquímicos intensos, transformando o querogênio em outras classes de substâncias orgânicas. A qualidade e quantidade do óleo gerado, depende do tipo de querogênio e da faixa de temperatura a que foi submetida a rocha geradora durante a evolução geológica da bacia¹.

¹ Tissot, B.P., Welte, D.H.; *Petroleum Formation and Occurrence – A New Approach to Oil and Gas Exploration*, 2th ed., Springer, New York, 1978.

² Restlé, A. (1994) – O Petróleo – Tradução e adaptação: Mello, M. R.; Hessel, M. A. e Soldan, A. L.: Petrobrás. CENPES, RJ.

A *Metagênese*, o **terceiro estágio evolutivo**, é alcançado a grandes profundidades, onde temperaturas muito altas e pressões mais elevadas promovem o craqueamento do óleo cru e o rearranjo de moléculas aromáticas, é a fase de geração de gás¹. A maioria das acumulações de petróleo e gás é encontrada entre a superfície e profundidades de 6000 a 7000 metros.

As pesquisas sobre origem, acúmulo, migração e biodegradação de óleos são de grande importância para a exploração eficaz de petróleo, onde os estudos são auxiliados, na maioria das vezes, pela análise dos fósseis geoquímicos – os denominados **Biomarcadores** (Philp, 1985³; Mello *et al*, 1988⁴).

Marcadores biológicos, fósseis geoquímicos ou biomarcadores, são moléculas derivadas de organismos vivos, tipicamente compostos orgânicos complexos formados por carbono, hidrogênio e outros elementos, as quais apresentam pequenas diferenças estruturais se comparadas às suas biomoléculas genitoras (Peters e Moldowan, 1993⁵).

Muitos biomarcadores em óleos brutos são mais resistentes à biodegradação, sendo assim aplicados em estudos geoquímicos de petróleos determinando inter-relações genéticas e graus de biodegradação. A oxidação de óleos durante a biodegradação leva a uma diminuição sistemática no conteúdo de parafinas e um aumento da densidade dos óleos, conteúdo de compostos sulfurosos, acidez e viscosidade (Hunt, 1979)⁶, levando à diminuição do valor econômico e prejuízos nas operações de exploração e refino.

Peters e Moldowan (1993)⁵ determinaram indicadores qualitativos, gerando uma escala para determinação do grau de biodegradação de óleos, baseando-se na

³ Philp, F.P. ; *Fossil Fuel Biomarkers: Applications and Spectra*, 1th ed., Elsevier: New York, 1985.

⁴ Mello, M.R.; Gaglianone, P.C.; Brassell, S.C.; Maxwell, J.R.; *Mar. Petrol. Geol.* **1988**, 5, 205-223.

⁵ Peters, K.E.; Moldowan, J.M.; *The Biomarker Guide*, 1th ed., Prentice-Hall: New Jersey, 1993.

⁶ Hunt, J.M.; *Petroleum Geochemistry and Geology*, 1th ed., Freeman: San Francisco, 1979.

1.2. MICRORGANISMOS EXTREMÓFILOS

Ambientes moderados são importantes para sustentar a vida, o que inclui pH neutro, temperatura entre 20 e 40 °C, pressão atmosférica de 1 atm e acessíveis quantidades de água, nutrientes e sais minerais. Muitos ambientes extremos, tais como nascentes muito ácidas ou quentes, lagos salinos e/ou alcalinos, desertos e oceanos, são encontrados na natureza e também constituem habitats para determinados seres vivos, principalmente microrganismos, os quais são denominados extremófilos (Magot *et al.*, 2000⁷; Satyanarayana *et al.*, 2005⁸) (Figura 1).



Figura 1. Exemplos de ambientes onde microrganismos extremófilos podem ser encontrados. (a) geleiras; (b) bocas de vulcões⁹.

Ambientes extremos incluem temperaturas muito altas ou baixas, altas pressões e salinidades, grandes variações de pH, baixos teores de água e nutrientes, incluindo também condições de altos níveis de radiação, metais pesados e compostos tóxicos (solventes orgânicos)⁸.

⁷ Magot, M.; Ollivier, B.; Patel, B.K.C. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2000**, 77, 103-116.

⁸ Satyanarayana, T., Raghukumar, C., Shivaji, S.; *Curr. Sci.* **2005**, 89, 78-90.

⁹ <http://www.ucmp.berkeley.edu/archaea/archaea.html>, acessada em julho de 2006.

A salinidade e o pH das águas de formação também podem limitar o desenvolvimento bacteriano. Os níveis de salinidade muitas vezes chegam à saturação, enquanto o pH varia entre 5 e 8. No entanto, os valores de pH verificados a 1 atm, não refletem a real condição do meio, onde aferições *in situ*, registraram valores entre 3 e 7⁷.

Extremófilos são diversos quanto ao seu metabolismo, incluindo organismos metanogênicos, sulfato-redutores, nitrato-redutores e aeróbios, onde a maioria das espécies conhecidas são classificadas como anaeróbias estritas heterotróficas redutoras de sulfeto (Kristjánsson & Hreggvidsson, 1995)¹⁰.

Muitos pesquisadores têm se dedicado ao estudo dos extremófilos, onde interações entre microrganismos termófilos e óleos brutos sob condições de laboratório e reservatórios vêm sendo investigadas no decorrer dos últimos 40 anos (Premuzic & Lin, 1999)¹¹.

1.3. BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO E ARQUÉIAS METANOGÊNICAS

A segunda metade do século XX testemunhou o avanço da biologia molecular e o subsequente desenvolvimento de métodos eficientes na análise de estruturas primárias de ácidos nucleicos e proteínas. Para os evolucionistas, uma das maiores conquistas foi o progresso nas “Ciências da Vida”, onde Woese propôs o terceiro domínio dos organismos vivos: o Archaea. Esta descoberta trouxe uma mudança na nomenclatura previamente utilizada na classificação dos organismos, onde o termo “reino” foi substituído por subdivisões principais de três domínios: Archaea, Bacteria e Eucarya (Woese *et al.*, 1990)¹² (Figura 2).

¹⁰ Kristjánsson, J.K; Hreggvidsson, G.O.; W. J. *Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *11(1)*, 17-25.

¹¹ Premuzic, E.Y., Lin, M.S.; *J. Pet. Sci. Eng.* **1999**, *22*, 171-180.

¹² Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1990**, *87*, 4576-4579.

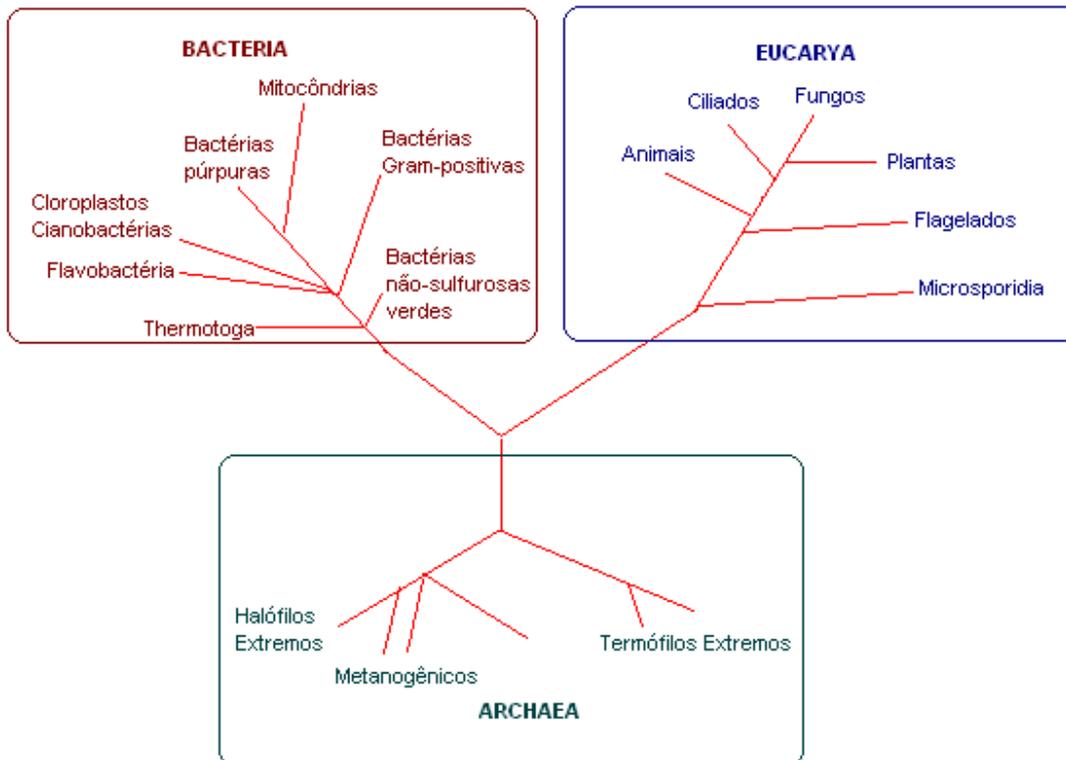


Figura 2. Árvore filogenética simplificada, apresentando os três domínios da vida (Xu & Glansdorff, 2002)¹³.

De acordo com Canhos e Vazoller (1999), os microrganismos pertencentes ao Domínio Bacteria encontram-se presentes nos mais diversos habitats. Apresentam diversidade metabólica, com representantes heterotróficos, organotróficos, quimiorganotróficos, litotróficos e fototróficos. As bactérias redutoras do íon sulfato (BRS) estão alocadas neste domínio, de acordo com a filogenia construída com base na comparação de seqüências do RNAr 16S (Madigan *et al.*, 1997¹⁴; Canhos e Vazoller, 1999¹⁵).

¹³ Xu, Y, Glansdorff, N. *Comparat. Biochem. Physiol.* **2002**, 133, 677-688.

¹⁴ Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J.; *Brock Biology of Microorganisms*, 8th ed., Prentice Hall: New Jersey, 1997.

¹⁵ Canhos, V.P.; Vazoller, R.F. 1999. Biodiversidade do Estado de São Paulo: Microrganismos e Vírus. Fapesp, São Paulo.

Alguns organismos tais como plantas, fungos e muitas bactérias podem utilizar sulfato como fonte de enxôfre, incorporando-o como sulfeto em várias moléculas orgânicas, em um processo denominado como redução assimilativa do sulfato (Manahan, 1994¹⁶; White, 1995¹⁷). A característica comum às bactérias redutoras do íon sulfato é a capacidade única de utilizar o sulfato como acceptor final de elétrons durante a oxidação de matéria orgânica, reduzindo-o a sulfeto de hidrogênio, através do processo denominado como redução desassimilativa de sulfato, pois neste caso, grande parte do enxôfre não é assimilada pelo microrganismo (Widdel e Hansen, 1992)¹⁸.

Bactérias redutoras de sulfato são freqüentemente descritas como componentes da microbiota indígena tanto de reservatórios de petróleo quanto de áreas contaminadas por óleos. Estas bactérias constituem amplo grupo de microrganismos anaeróbios, capazes de degradar substratos orgânicos, incluindo *n*-alcanos, tolueno, benzeno e hidrocarbonetos poliaromáticos (Dhilon *et al.*, 2003¹⁹; Amend e Teske, 2004²⁰; Young e Phelps, 2005²¹). A necessidade de ambientes anaeróbios estritos e a baixa velocidade de crescimento das BRS tornam difícil o isolamento e identificação dos morfotipos responsáveis pela biodegradação de hidrocarbonetos, assim como a condução de experimentos de degradação, em laboratório.

O domínio Archaea inclui as linhagens mais antigas dos seres vivos do planeta, tais como os hipertermófilos, os quais são organismos que se desenvolvem a temperaturas entre 80° e 113°C (a máxima temperatura descrita até o momento,

¹⁶ Manahan, S. *Environmental Chemistry*, 6th ed., Lewis Publishers: New York, 1994.

¹⁷ White, D. C. *Oikos* **1995**, *74*, 174-181.

¹⁸ Widdel, F., Hansen, T.A.. (1992) The Dissimilatory Sulfate- and Sulfur- Reducing Bacteria. In Balows, A.; Trüper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W.; Schleifer, K.H. eds, *The prokaryotes*, 2th ed., Springer-Verlag, New York, NY, pp. 583-624.

¹⁹ Dhilon, A.; Teske, A.; Dhilon, J.; Stahl, D.A., Sogin, M.L. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 2765-2772.

²⁰ Amend, J.P.; Teske, A. *Palaeo* **2005**, *219*, 131-155.

²¹ Young, L.Y.; Phelps, C.D. *Environmental Health Perspectives* **2005**, *113(1)*, 62-67.

apresentada para *Pyrolobus fumarii*). A partir de análises filogenéticas de procariotas, constatou-se que os hipertermófilos são a maioria dentre os organismos primitivos ainda existentes¹³.

Os organismos pertencentes ao domínio Archaea são considerados únicos, com propriedades metabólicas extraordinárias e filogenia particular. Compreendem organismos anaeróbios sensíveis ao oxigênio, termófilos e halófilos extremos. São organismos evolutivamente distintos daqueles pertencentes ao domínio Bacteria em função das características de organização do genoma, expressão gênica, composição celular e filogenia; apesar de ambos apresentarem organização celular procariótica¹⁵.

Alguns organismos pertencentes a este domínio apresentam vias metabólicas semelhantes às aquelas encontradas em organismos do domínio Bacteria. Porém, outros apresentam vias metabólicas raras, como as arqueias metanogênicas, que produzem gás metano através de sistemas enzimáticos únicos. O metabolismo autotrófico é comum em muitos organismos metanogênicos e termófilos extremos. Existem também arqueias quimiorganotróficas que utilizam diferentes compostos orgânicos como fontes de energia para seu crescimento¹⁴.

As arqueias metanogênicas são encontradas nos mais diversos habitats naturais, tais como: sedimentos de lagos, rios, mares, pântanos, trato gastrointestinal de animais ruminantes, reservatórios de petróleo, dentre outros. Em estudos realizados sobre a metanogênese em óleos, foi proposto que bactérias aeróbias biotransformavam hidrocarbonetos em produtos polares, tais como ácidos graxos, os quais seriam consumidos por comunidades anaeróbias metanogênicas (Rozanova *et al.*, 1997)²².

²² Rozanova, E.P.; Savvichev, A.S.; Miller, Y.M.; Ivanov, M.V. *Microbiology* **1997**, *66*, 718-725.

1.4. BIODEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos, incluindo alguns constituintes organometálicos, principalmente níquel e vanádio, complexados (Van Hamme *et al.* 2003)²³, sendo que os hidrocarbonetos podem constituir tanto substratos, quanto produtos do metabolismo microbiano (Bushnell e Hass, 1941²⁴; Ehrlich, 1990²⁵). Microrganismos, por sua vez, são equipados por arsenais enzimáticos capazes de utilizar o petróleo como fontes de carbono e energia²³, sendo este o motivo do direcionamento generalizado às pesquisas em biogeoquímica, biologia molecular e microbiologia, para a determinação de espécies envolvidas e atividades das mesmas sobre óleos *in situ*.

A problemática da degradação, deterioração e recuperação de petróleo, por sua vez, consiste basicamente no fato do esgotamento das reservas mundiais, existindo poucas perspectivas para o descobrimento de novos reservatórios. Durante 15 a 20 anos, a produção mundial de petróleo foi de 30 bilhões de barris por ano, no entanto, ao final do século XX, tal número foi reduzido a no máximo 10 bilhões, tendendo à diminuição para 5 bilhões e finalmente sua exaustão (White *et al.*, 2003)²⁶.

Os efeitos da biodegradação na composição e propriedades físico-químicas de óleos brutos e gases naturais são bem conhecidos e levam à diminuição do teor de hidrocarbonetos saturados e do grau API (American Petroleum Institute, o qual é um índice que determina o valor econômico do petróleo) e ainda, ao aumento da densidade dos óleos, conteúdo de enxôfre, acidez, viscosidade e conteúdo de

²³ Van Hamme, J. D.; Singh, A.; Ward, O. P. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, 67(4), 503-549.

²⁴ Bushnell, L. D.; Haas, H. F. *J. Bacteriol.* **1941**, 41, 653-673.

²⁵ Ehrlich, H.L.; *Geomicrobiology*, 1th ed., Marcel Dekker: New York, 1990.

²⁶ White, N.; Thompson, M.; Barwise, T. *Nature* **2003**, 426, 334-343.

metais, os quais influenciam a produção de óleo, através da redução da velocidade de vazão e operações de refino²⁶ (Tabela 2).

Tabela 2. Mudanças físicas e químicas que ocorrem durante a biodegradação do óleo bruto a gás natural²⁶

	Óleos leves				Óleos pesados	
	Maior perda de massa – 50%		(Rearranjo estrutural / menor perda de massa – < 20%)			
Ácidos Totais (mg KOH por g de óleo)	0,2	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5+
Grau API	36	32	31	28	20	5-20
Gas : Óleo (Kg gás por Kg de óleo)	0,17	-	0,12	0,08	0,06	<0,04
Umidade Gás (%)	20		10		5	2
Conteúdo de Enxofre (wt%)	0,3	0,4	0,5	-	1,0	1,5+
Conteúdo de Hidrocarbonetos Saturados (%)	75	70	65	60	50	35

O Brasil possui mais de 20 bacias petrolíferas, produzindo uma média diária de 2.288.696 barris de petróleo. Considerada a maior reserva petrolífera da Plataforma Continental Brasileira, a Bacia de Campos tem cerca de 100 mil quilômetros quadrados e se estende do estado do Espírito Santo até Cabo Frio, no litoral norte do estado do Rio de Janeiro. Atualmente, estão em operação mais de 400 poços de óleo e gás, mais de 30 plataformas de produção e 3.900 quilômetros de dutos submarinos²⁷.

Sua formação relaciona-se à abertura do oceano Atlântico, no Cretáceo Inferior e os óleos nela encontrados, apresentam características geoquímicas de óleos lacustres, correlacionando-se aos folhelhos da Formação Lagoa Feia (Cretáceo Inferior). As acumulações de petróleo ocorrem principalmente em

²⁷ http://www2.petrobras.com.br/Petrobras/portugues/plataforma/pla_campos_petroleo.htm, acessada em outubro de 2006.

reservatórios turbidíticos do Cretáceo ou Terciário (Mohriak *et al.*, 1990)²⁸. Os óleos da Bacia de Campos apresentam graus de biodegradação variáveis, o que provoca a diminuição significativa do seu potencial de refino e valor econômico. O processo de biodegradação dos óleos na Bacia de Campos parece estar intimamente relacionado à infiltração de águas meteóricas em contato com os reservatórios contendo petróleo²⁸.

No entanto, enquanto a biodegradação por infiltrações pode, indubitavelmente, proceder aerobiamente com elevadas velocidades de degradação, estudos ambientais e de aquíferos sugerem que os lentos processos anaeróbios dominam a degradação de hidrocarbonetos na sub-superfície, envolvendo múltiplas etapas de oxidação, redução de metais e metanogênese (Hunkeler *et al.*, 1998²⁹; Zengler *et al.*, 1999³⁰).

Um vasto número de microrganismos, incluindo aeróbios, anaeróbios estritos e anaeróbios facultativos, com diferentes propriedades fisiológicas têm sido isolados de reservatórios de petróleo sendo que a maioria é capaz de crescer utilizando ácidos orgânicos, álcoois e hidrogênio como fontes de energia. Entretanto, a escassez de detalhes sobre a realização das coletas das amostras e recuperação dos microrganismos e ainda, a possível infiltração de água da superfície, resultante de águas de injeção ou características geológicas locais, freqüentemente leva à interpretação de que a presença de bactérias aeróbias somente poderia ser advinda de contaminações de tubulações ou de manipulação de amostras, uma vez que reservatórios de petróleo são tidos como ecossistemas estritamente anaeróbios⁷.

²⁸ Mohriak, N.U., Mello, M.R., Dewey, J.F., Maxwell, J.R. Em *Classic Petroleum Provinces*; Brooks, J., ed., Geological Society, London, 1990, pp. 119-141.

²⁸ Hunkeler, D., Jorger, D., Haberli, K., Hohener, P., Zeyer, P.; *J. Contam. Hydrol.* **1998**, *32*, 41-61.

³⁰ Zengler, K., Richnow, H.R., Rossello-Moro, R., Michaelis, W., Widdel, F.; *Nature* **1999**, *401*, 266-269.

Existe uma grande discussão em estudos biogeoquímicos e microbiologia do petróleo, sobre qual a microbiota responsável pela efetiva biodegradação do petróleo.

Enquanto, os detalhes e velocidades dos processos ainda são pobremente entendidos, a função central das bactérias e arqueias na degradação do petróleo é muito bem aceita, onde a predição do grau de biodegradação do óleo prioriza a exploração ou não de poços.

Durante muitas décadas, assumiu-se que a biodegradação de hidrocarbonetos constituía-se como processo unicamente aeróbio, o qual somente ocorreria em presença do oxigênio molecular²⁶ (Evans *et al.*, 1971)³¹, sempre considerando-se que águas meteóricas, que se infiltravam nos reservatórios, carregariam oxigênio e nutrientes suficientes ao crescimento microbiano de comunidades aeróbias. Entretanto, em 1990, Horstad *et al.*³², realizando cálculos para a determinação do balanço do volume de água presente nos reservatórios propuseram que o influxo de águas meteóricas para os reservatórios não significava a entrada de oxigênio para o interior dos mesmos, em virtude de dois fatores: (1) a manutenção dos níveis de oxigênio da água após atravessar solos e aquíferos com relativa quantidade de matéria orgânica; (2) a observação comum de que em reservatórios de óleos biodegradados, em bacias marinhas, freqüentemente continham água salina, a qual era indicativa do mínimo influxo de água fresca nos poços.

Posteriormente, em 1991, Aeckersberg *et al.*³³ reportaram sobre bactérias redutoras de sulfato hábeis a mineralizar hexadecano, anaerobiamente. A partir deste momento, inúmeros trabalhos foram publicados trazendo como ponto chave a biodegradação anaeróbia de hidrocarbonetos, a qual atualmente é a mais bem aceita dentre os grupos de pesquisas mundiais.

³¹ Evans, C.R.; Rogers, M.A.; Bailey, N.J.L.; *Chem. Geol.* **1971**, *8*, 147-170.

³² Horstadt, I.; Larter, S.R.; Dypvic, H.; Aagaard, P.; Bjornvik, A.M.; Johansen, P.E.; Eriksen, S.; *Org. Geochem.* **1990**, *16*, 497-510.

³³ Aeckersberg, F.; Bak, F.; Widdel, F.; *Arch. Microbiol.* **1991**, *156(1)*, 5-14.

Entretanto, a biodegradação anaeróbia de hidrocarbonetos é um processo muito lento, se comparada à aeróbia. As rotas metabólicas de degradação de *n*-alcanos não são bem elucidadas até o momento, sendo que muitos autores têm discutido sobre um mecanismo de ativação molecular que envolve a adição de um carbono ou uma molécula de fumarato aos hidrocarbonetos (Wilkes *et al.*, 2002³⁴; So *et al.*, 2003³⁵) (Figura 3).

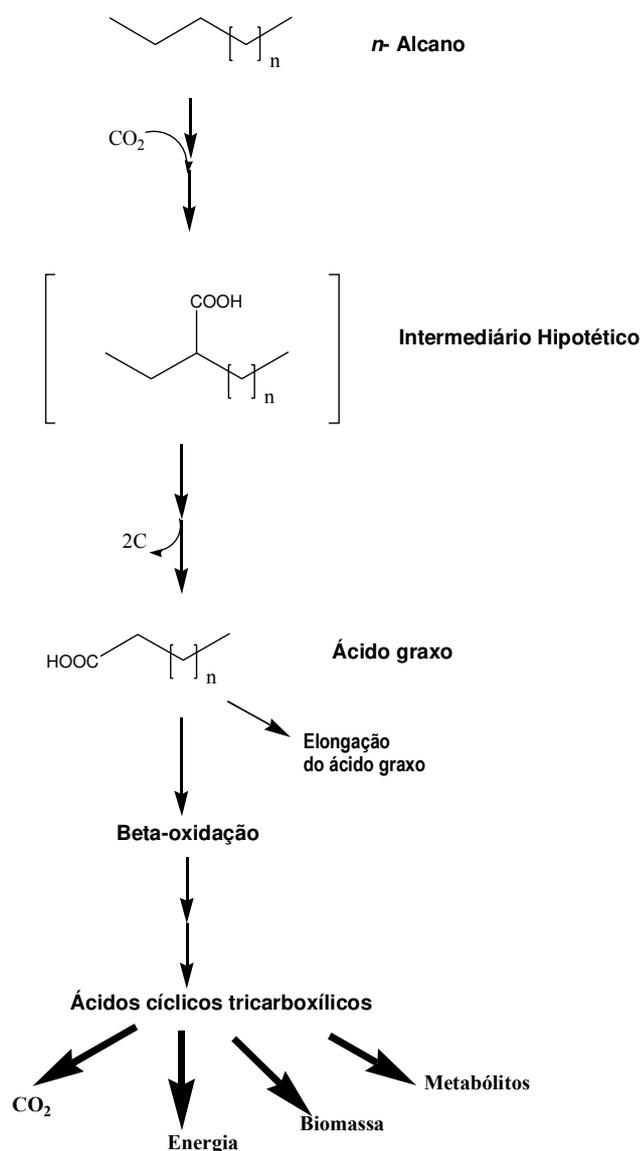


Figura 3. Rota proposta por So *et al.* (2003)³⁵, para a degradação anaeróbia de *n*-alcanos via adição de um carbono (carboxilação subterminal ao C3). ($n=1$).

³⁴ Wilkes, H.; Rabus, R.; Fischer, T.; Armstroff, A.; Behrends, A.; Widdel, F.; *Arch. Microbiol.* **2002**, *177*, 235-243.

³⁵ So, C.M.; Phelps, C.D.; Young, L.Y.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 3892-3900.

Relatos sobre metabólitos gerados a partir da biotransformação de hidrocarbonetos aromáticos tais como naftaleno e fenantreno, identificaram produtos tais como ácido 2-naftóico, e determinaram rotas metabólicas (a partir do fumarato) utilizadas por bactérias redutoras de sulfato compatíveis com as condições fisiológicas dos poços de petróleo, buscando-se assim sedimentar a hipótese de que a microbiota anaeróbia seria a única responsável pela biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo *in situ* (Annweiller *et al.*, 2002³⁶, Aitken *et al.*, 2004³⁷) (Figura 4).

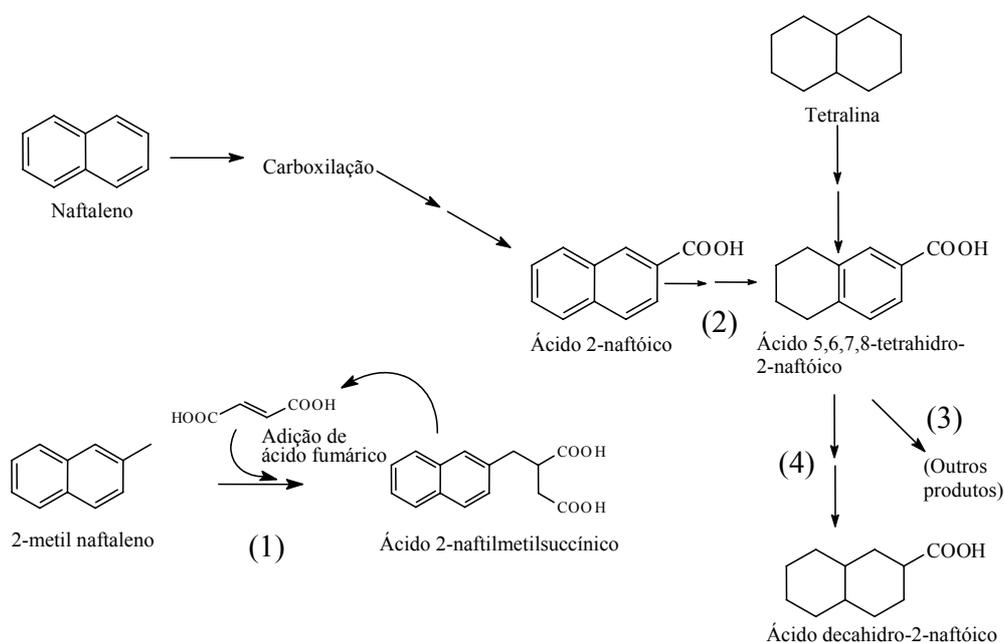


Figura 4. Representação de parte da rota redutiva para a degradação anaeróbia de naftaleno, 2-metilnaftaleno e tetralina por bactérias redutoras de sulfato. Fonte: Aitken *et al.* (2004)³⁷.

Apesar dos vários relatos atuais da literatura, a respeito da biodegradação anaeróbia do petróleo, sabe-se que o reservatório de petróleo não é um ambiente homogêneo, onde a caracterização de óleos biodegradados por nosso grupo de

³⁶ Annweiller, E., Michaelis, W., Meckenstock, R.U. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, 68(2), 852-858.

³⁷ Aitken, C.M., Jones, D.M., Larter, S.R. *Nature* **2004**, 431, 291-294.

pesquisa (Rodrigues *et al.*, 2005)³⁸, evidenciaram a presença de ácidos de parede celular microbiana de bactéria aeróbia, na composição dos mesmos. Acredita-se que as águas de formação possam sim, sustentar o crescimento de um elevado número de bactérias, o que contribui à hipótese de que não somente bactérias anaeróbias, mas também aeróbias, poderiam ser responsáveis pela biodegradação de hidrocarbonetos nos reservatórios (Grabowski, 2005)³⁹.

Além disso, o conhecimento mundial em ecologia microbiana de reservatórios de óleos é ainda insuficiente para que se possa excluir a hipótese de que bactérias aeróbias não sejam microrganismos indígenas destes ambientes⁶. Não há dados na literatura que relatem sobre microrganismos que tenham sido enriquecidos ou isolados de reservatórios de petróleo, que sejam capazes de biodegradar hidrocarbonetos leves sob condições anaeróbias (Vieth e Wilkes, 2006⁴⁰).

As reações fundamentais da biodegradação aeróbia de hidrocarbonetos, por sua vez, já são bem elucidadas (Atlas, 1984⁴¹; Gibson, 1984⁴²; Ensign, 2001⁴³). A etapa fundamental da degradação microbiana aeróbia é a adição de um átomo oxigênio, e em alguns casos até dois átomos de oxigênio, ao hidrocarboneto, convertendo-o em um álcool (no caso de hidrocarbonetos alifáticos) (Figura 5) ou a um fenol (tratando-se de aromáticos) (Figura 6). Epóxidos também são descritos como intermediários desta etapa. Esta oxidação torna os hidrocarbonetos mais solúveis em água, gerando sítios reativos na molécula para que novas reações possam ocorrer. A reação requer energia, a qual é tipicamente gerada pela oxidação de um intermediário biológico reduzido, tal como o NADH.

³⁸ Rodrigues, D. C., Vasconcellos, S. P., Alves, P.B.; Nascimento, L.R.; Abreu Filho, B.A., Oliveira, V.M., Manfio, G.P.; Santos Neto, E.V.; Marsaioli, A.J.; *Org. Geochem.* **2005**, *36(10)*, 1443-1453.

³⁹ Grabowski, A., Blanchet, D., Jeanthon, C.; *Res. Microbiol.* **2005**, *156*, 814-821

⁴⁰ Vieth, A., Wilkes, H.; *Geochim. Cosmochim Acta* **2006**, *70*, 651-665.

⁴¹ Atlas, R.M. *Microbiol. Rev.* **1981**, *45(1)*, 180-209.

⁴² Gibson, D.T.; *Microbial Degradation of Organic Compounds*, 1th ed. Dekker: New York, 1984.

⁴³ Ensign, S.A.; *Biochemistry* **2001**, *40*, 5845-5853.

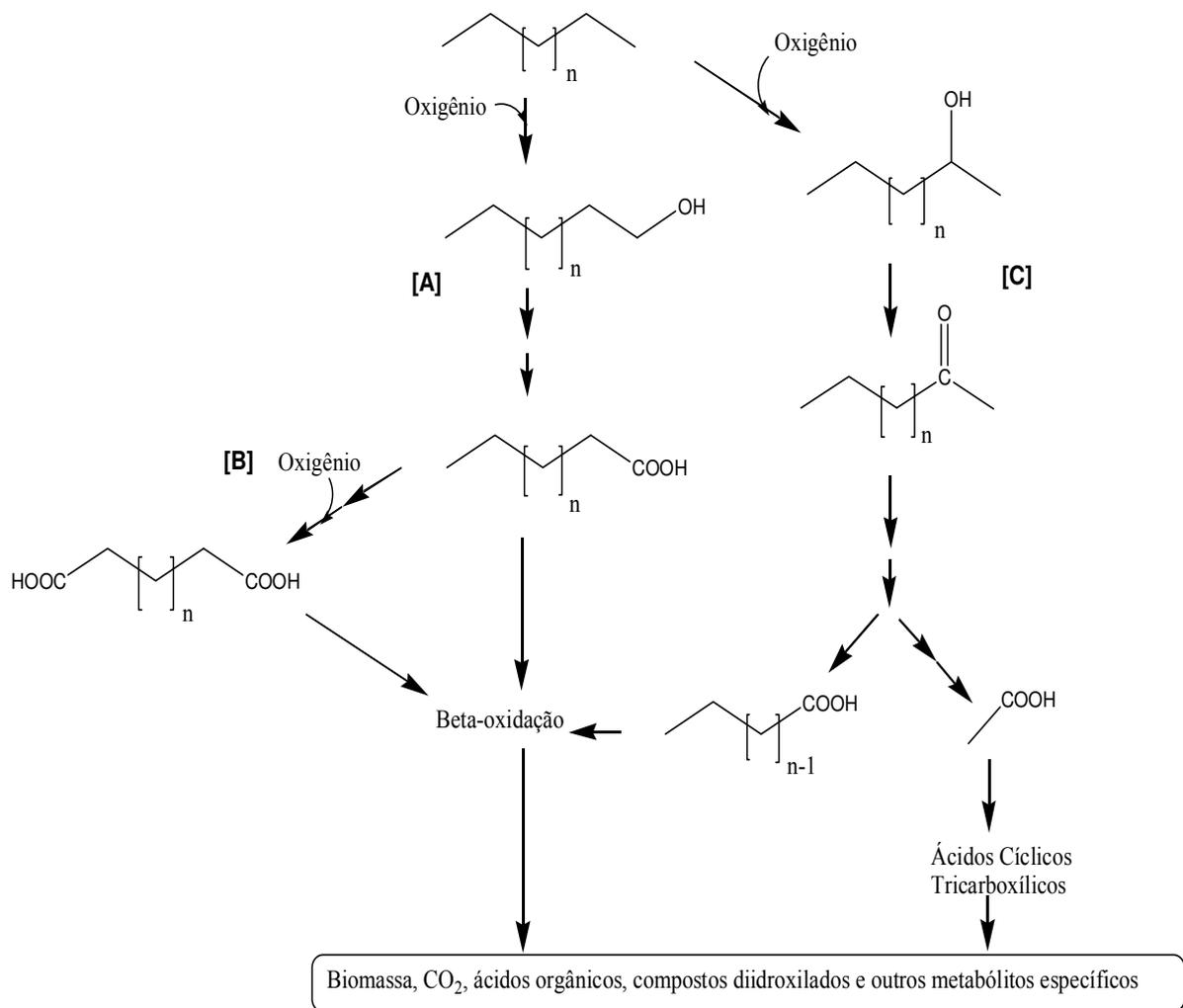


Figura 5. Biodegradação aeróbia de n -alcanos: [A] Oxidação monoterminal; [B] oxidação biterminal; [C] oxidação subterminal^{41,42,43}.

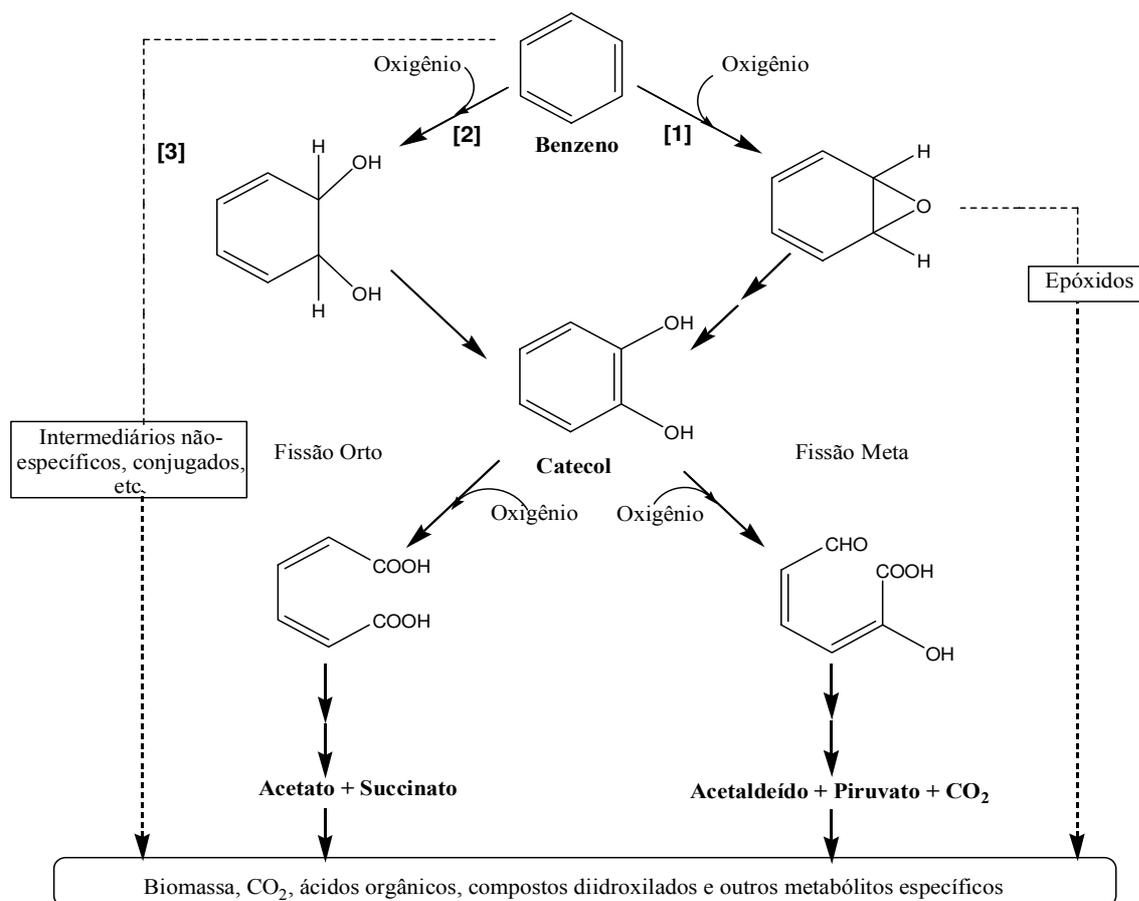


Figura 6. Biodegradação aeróbia de hidrocarbonetos aromáticos. Monooxigenase [1]; Dioxigenase [2]; Reações não-específicas [3]^{41,42,43}.

A biodegradação aeróbia de *n*-alcanos se inicia pela atividade de uma monooxigenase, a qual introduz um grupo hidroxila na cadeia alifática. Os principais intermediários da degradação de alcanos são ácidos graxos, os quais são produzidos a partir de alcanóis, via aldeídos. Estes ácidos podem ser decompostos por rotas biossintéticas típicas de degradação de ácidos carboxílicos, em que a molécula é quebrada em ácidos menores. Ácidos graxos podem servir como fontes de carbono para bactérias de uma comunidade, podendo aumentar o índice de degradação de hidrocarbonetos. Diferentes rotas de biodegradação têm sido demonstradas para compostos aromáticos, onde o metabolismo pode iniciar-se pela atividade enzimática de uma monooxigenase ou dioxigenase, havendo a adição de

um ou dois átomos de oxigênio no substrato. A molécula é oxidada formando um diol, havendo a subsequente clivagem do anel. Piruvato é um dos principais intermediários desta reação, enquanto os produtos majoritários são biomassa e dióxido de carbono. É importante ressaltar que a biodegradação aeróbia de aromáticos também poderá ocorrer por reações denominadas como não-específicas, obtendo-se os mesmos produtos das reações promovidas pelas oxigenases (Berthe-Corti e Höpner, 2005)⁴⁴.

Numa comunidade de microrganismos a capacidade metabólica é meramente efeito aditivo da habilidade de cada membro deste consórcio em degradar diferentes compostos de uma mistura, como por exemplo, o petróleo. Torna-se irreal e simplista, afirmar que uma cultura degradou completamente um óleo, uma vez que este processo somente ocorrerá no ambiente, cometabolicamente⁴⁴.

A degradação anaeróbia de tolueno por culturas puras de bactérias redutoras de sulfato e bactérias desnitrificantes, levam ao acúmulo de seus produtos finais reacionais, ou seja, benzilsuccinato e benzilfumarato (Evans *et al.*, 1992)⁴⁵. Da mesma forma, a degradação de *m*- ou *o*-cresol, por bactérias desnitrificantes, levam ao acúmulo de 4-hidroxi-3-metil-benzoato e 4-hidroxi-2-metil-benzoato, respectivamente (Rudolphi *et al.*, 1991)⁴⁶. No entanto, estes metabólitos microbianos não são encontrados sob condições naturais, ou seja, nos reservatórios de petróleo, podendo-se afirmar que quando em comunidades microbianas, estes produtos podem servir como substratos para o crescimento de outras espécies, tanto aeróbias, quanto anaeróbias, as quais, por sua vez, levariam à completa mineralização do substrato original.

⁴⁴ Berthe-Corti, L.; Höpner, T.; *Palaeo* **2005**, *219*, 171-189.

⁴⁵ Evans, P.J.; Ling, W.; Goldschmidt, B.; Ritter, E.R.; Young, L.Y.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 496-501.

⁴⁶ Rudolphi, A.; Tschsch, A.; Fuchs, G. *Arch. Microbiol.*; **1991**, *155*, 238-248.

1.5. PRODUÇÃO MICROBIANA DE SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES (EPS)

Surfactantes são substâncias capazes de alterar características de superfícies interfaciais. Emulsificantes, por sua vez, constituem uma sub-classe de surfactantes, os quais estabilizam dispersões de um líquido em outro, como por exemplo, emulsões óleo-água (Ron e Rosenberg, 2001)⁴⁷.

A produção mundial de surfactantes na década de 1990 era em torno de US\$ 9,4 bilhões por ano (Shaw, 1994)⁴⁸, havendo uma previsão do aumento deste valor em 35%, ao final do século XX. A grande maioria de todo o surfactante, correntemente em uso, é produzida quimicamente, sendo derivado do petróleo. Entretanto, o interesse pela produção microbiana de surfactantes vem aumentando nos últimos anos, devido à sua diversidade, ou seja, propriedades de solubilizar várias classes de compostos serem ambientalmente amigáveis e com aplicações tanto em estudos de proteção ambiental, quanto na fabricação de produtos de higiene pessoal, alimentos, entre outras. (Banat *et al.*, 1991⁴⁹; Fiechter, 1992⁵⁰; Banat, 1995⁵¹).

Bioemulsificantes são surfactantes produzidos por microrganismos que aumentam a biodisponibilidade de hidrocarbonetos promovendo a estabilização de emulsões água-óleo, existentes nos reservatórios de petróleo. A produção e funções dos bioemulsificantes vêm sendo objetos de intensas investigações, principalmente

⁴⁷ Ron, E.Z.; Rosenberg, E.; *Environ. Microbiol.* **2001**, 3(4), 229-236.

⁴⁸ Shaw, A.; *Soap Cosmet. Chem. Specialities* **1994**, 70, 24-34.

⁴⁹ Banat, I.M.; Samarah, N.; Murad, M.; Horne, R.; Benerjee, S.; *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1991**, 7, 80-84.

⁵⁰ Fiechter, A.; *Pure Appl. Chem.* **1992**, 64, 1739-1743.

⁵¹ Banat, I.M.; *Bioresource Technol.* **1995**, 51, 1-12.

aplicando-se hidrocarbonetos como fontes de carbono (Desai e Banat, 1997⁵²; Cuny *et al.*, 2004⁵³).

O entendimento e a otimização dos mecanismos microbianos de degradação de compostos do petróleo é de interesse global, sendo que a etapa limitante e crucial da biodegradação é a emulsificação dos hidrocarbonetos, a qual atua pelo aumento da biodisponibilidade de tais compostos (Churchill *et al.*, 1995)⁵⁴.

Muitos microrganismos são excelentes produtores de bioemulsificantes, os quais possuem estruturas anfifílicas, geralmente de elevado peso molecular, contendo uma parte da molécula hidrofóbica que pode ser constituída por um ácido graxo de cadeia longa, e uma parte da molécula hidrofílica, que pode ser um carboidrato, um ácido carboxílico, fosfato, aminoácido, peptídeo cíclico e / ou um álcool (Figura 7)⁵².

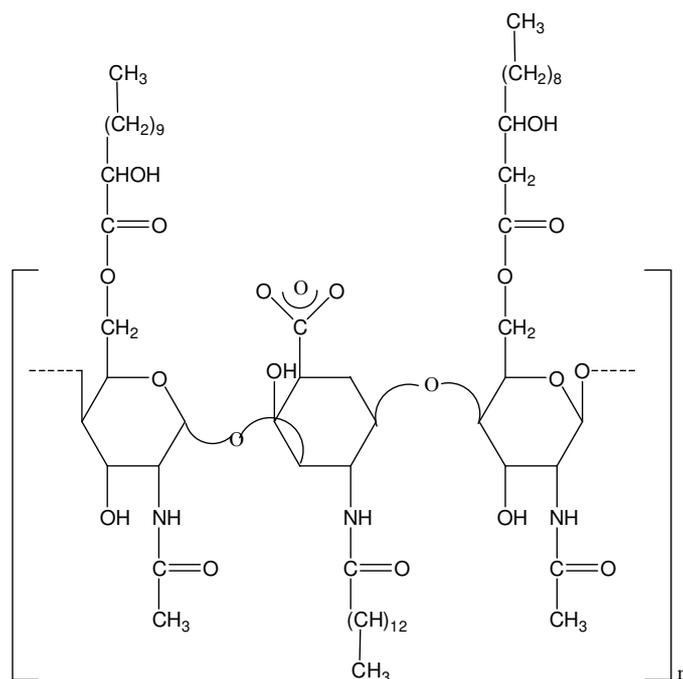


Figura 7. Estrutura molecular do emulsan, um biosurfactante comercial produzido pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus*, em que ácidos graxos encontram-se ligados à heteropolissacarídeos⁵².

⁵² Desai, J.D.; Banat, I.M.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1997**, *61(1)*, 47-64.

⁵³ Cuny, P.; Acquaviva, M.; Gilewicz, M.; *Ophelia* **2002**, *58(3)*, 282-287

⁵⁴ Churchill, P.R.; Dudley, R.J.; Churchill, S.A. *Waste Manage* **1995**, *15*, 371-377.

Hidrocarbonetos e carboidratos estão sempre presentes como blocos de construção das moléculas de bioemulsificantes. De acordo com Syltsatck e Wagner (1985)⁵⁵, existem as seguintes possibilidades para que haja a síntese de diferentes moléculas de bioemulsificantes: (i) as moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas são sintetizadas “de novo”, por duas rotas independentes; (ii) a molécula hidrofílica é sintetizada “de novo”, enquanto a síntese da molécula hidrofóbica é induzida pelo substrato; (iii) a molécula hidrofóbica é sintetizada “de novo”, enquanto a síntese da molécula hidrofílica é condicionada pelo substrato; e (iv) a síntese de ambas as moléculas é substrato dependente.

Vários gêneros de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos têm sido descritas como produtoras de bioemulsificantes: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus* e *Alcanivorax*⁴⁴.

Mas como e por que os microrganismos produzem bioemulsificantes? A grande maioria dos microrganismos sobrevivem e crescem como agregados celulares, onde esta forma de crescimento e organização é denominada como biofilme (Flemming *et al.*, 2000)⁵⁶. A produção de bioemulsificantes é acompanhada pela formação de biofilmes, aos quais os microrganismos se mantêm aderidos⁴⁴. Uma ocorrência comum à formação do biofilme é a de que os microrganismos encontram-se envolvidos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), a qual é responsável pela estrutura, coesão, propriedades físico-químicas e atividade destes agregados celulares. O EPS forma uma estrutura tridimensional, gelatinosa e altamente hidratada, na qual os microrganismos se mantêm imobilizados⁵⁶.

EPS microbianos são polímeros biossintéticos (biopolímeros), que podem ser produzidos tanto por microrganismos procariotas (reinos *Bacteria* e *Archaea*),

⁵⁵ Syltsatck, C.; Lang, S.; Matulovic, U.; Wagner, F.Z.; *Z. Naturforsch* **1985**, *40C*, 61-67.

⁵⁶ Flemming, H.-C.; Wingender, J.; Mayer, C.; Köstgens, V.; Borchard, W. *Community Structure and Co-operation in Biofilms*, Cambridge University Press: Cambridge, 2000.

como por eucariotos (algas, fungos) (Sutherland, 1994)⁵⁷. Gehr e Henry (1983)⁵⁸ descreveram que materiais extracelulares são compostos que podem ser removidos dos microrganismos, particularmente bactérias, sem que haja o rompimento das células, mantendo a viabilidade das mesmas. Esta definição leva à observação de que EPS não são estruturas essenciais à bactéria, onde a não produção ou a extração destes exopolímeros não implicam na perda do crescimento ou viabilidade celular.

Freqüentemente, polissacarídeos são citados como os principais componentes dos EPS microbianos⁵⁶ (Costerton *et al.*, 1981⁵⁹, Costerton *et al.* 1987⁶⁰) e por esta razão, o termo exopolissacarídeos muitas vezes é utilizado como sinônimo de EPS. Entretanto, as substâncias poliméricas extracelulares produzidas pelos microrganismos, também incluem: proteínas, ácidos nucléicos, lipídeos / fosfolipídeos e substâncias húmicas. Ácidos urônicos são também descritos como componentes de polímeros extracelulares, sendo muito importantes para a manutenção da estrutura física dos biofilmes, através de interações eletrostáticas com cátions multivalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+})⁵⁶.

Os EPS têm diferentes funções nas células, dependendo de sua composição específica, estando geralmente associados a mecanismos de nutrição ou defesa celular, ou seja, os microrganismos produzem tais substâncias como forma de sobreviverem às condições do meio ao qual se encontram. A produção, composição e propriedades dos EPS microbianos variam em resposta a fatores ambientais, tais como acesso a nutrientes e pHs variáveis. Os EPS podem contribuir em muito para o ataque celular a hidrocarbonetos, promovendo a adesão microbiana às moléculas e subsequente solubilização das mesmas (Shreve *et al.*, 1995)⁶¹.

⁵⁷ Sutherland, I.W.; *Biotechnol. Adv.* **1994**, *12*, 393-448.

⁵⁸ Gehr, R.; Henry, J.G.; *Water Res.* **1983**, *17*, 1743-1748.

⁵⁸ Costerton, J.W.; Irvin, R.T.; Cheng, K.-J.; *Annu. Rec. Microbiol.* **1981**, *35*, 299-324.

⁶⁰ Costerton, J.W.; Cheng, K.-J.; Geesey, G.G.; Ladd, T.I.; Nickel, J.C.; Dasgupta, M.; Marrie, T.J.; *Annu. Ver. Microbiol.* **1987**, *41*, 435-464.

⁶¹ Shreve, G.S.; Inguva, S.; Gunnam, S.; *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **1995**, *4*, 331-337.

Os EPS são usualmente produzidos durante a fase estacionária do crescimento microbiano, ou seja, quando a multiplicação celular é diminuída, mantendo-se a densidade celular estável. Em alguns casos, é proposto que a produção de exopolímeros é induzida por sinais moleculares, envolvidos no mecanismo denominado como “quorum sensing”, ou comunicação inter celular, o qual emite sinais, denominados como autoindutores, que promoveriam mudanças fisiológicas nas atividades das células, quando as mesmas atingissem uma determinada densidade populacional (Figura 8). Este mecanismo regulatório parece ser geral, atuando tanto na produção de biofilmes de altos, como de baixos pesos moleculares, ou seja, o microrganismo somente produzirá emulsificantes quando houver aumento da densidade celular e conseqüente início da fase estacionária de crescimento (Brint e Ohman, 1995⁶²; Van Delden *et al.*, 1998⁶³; Decho, 2000⁶⁴; Ron e Rosenberg, 2002⁶⁵).

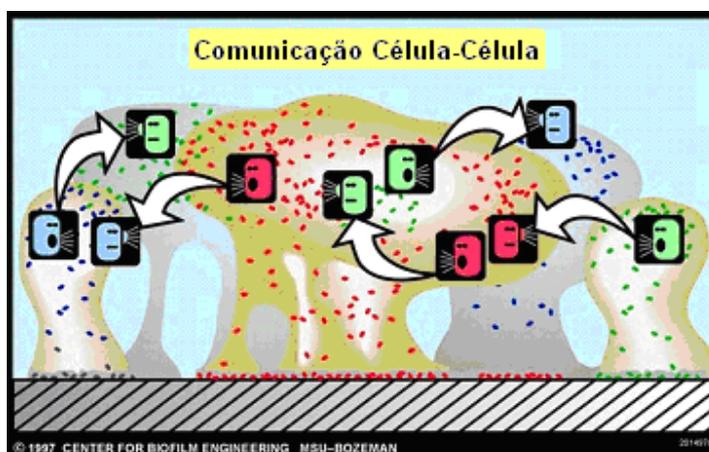


Figura 8. Ilustração sobre a comunicação intercelular bacteriana EPS⁶⁶.

⁶² Brint, J.M.; Ohman, D.E.; *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 7155-7163.

⁶³ Van Delden, C.; Pesci, E.C.; Pearson, J.P.; Iglewski, B.H.; *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 4499-4502.

⁶⁴ Decho, A.W.; *Continental Shelf Research* **2000**, *20*, 1257-1273.

⁶⁵ Ron, E.Z.; Rosenberg, E.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 249-252.

⁶⁶ <http://www.erc.montana.edu> (Acessada em 31 de agosto de 2006).

Como estas bactérias estariam crescendo na interface óleo-água, a produção de EPS seria um mecanismo de comunicação bacteriana resultante do aumento da densidade celular, buscando aumentar a área de acesso às bolhas de óleo, tornando os hidrocarbonetos mais solúveis. Assim, quando as frações de hidrocarbonetos, mais facilmente degradáveis, se esvaíssem, haveria uma diminuição da densidade celular e conseqüente menor produção de emulsificantes, o que faria com que as bactérias buscassem novas frações de compostos passíveis de serem metabolizados, elevando-se novamente o crescimento bacteriano e, em seqüência, nova liberação de EPS⁴⁷.

Vários estudos evidenciaram as excelentes atividades emulsificantes de EPS bacterianos para óleos brutos (Bouchotroch *et al.* 2000⁶⁷, Cohen 2002⁶⁸). Algumas espécies bacterianas se destacam como eficientes produtoras de bioemulsificantes, dentre elas estão *Bacillus* sp. (Cooper e Goldenberg, 1987)⁶⁹; *Halomonas* sp. (Martínez-Checa *et al.*, 2001)⁷⁰; *Volcaniella eurihalina* (Calvo *et al.*, 2002)⁷¹; *Pseudomonas* sp.; *Corynebacterium* sp.; *Acinetobacter* sp. (Rahman *et al.*, 2003)⁷² e *Bacillus pumilus* (Calvo *et al.*, 2004)⁷³. Portanto os EPS de origem microbiana constituem hoje um tópico atual e importante nas pesquisas de biodegradação de petróleo.

⁶⁷ Bouchotroch, S.; Quesada, E.; Izquierdo, I.; Rodríguez, M.; Béjar, V.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *24*, 374-378.

⁶⁸ Cohen, Y.; *Int. Microbiol.* **2002**, *5*, 189-193.

⁶⁹ Cooper, D.G.; Goldenberg, B.G.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1987**, *53*(2), 224-229.

⁷⁰ Martínez-Checa, F.; Toledo, F.L.; Vilchez, R.; Quesada, E.; Calvo, C.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *58*(3), 358-363.

⁷¹ Calvo, C.; Martínez-Checa, F.; Toledo, F.L.; Porcel, J.; Quesada, E.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *60*(3), 347-351

⁷² Rahman, K.S.M.; Rahman, T.J.; Lakshmanaperumalsamy, P.; Marchant, R.; Banat, I.M.; *Acta Biotechnol.* **2003**, *23*(4), 335-345.

⁷³ Calvo, C.; Toledo, F.L.; González-López, J.; *J. Biotechnol.* **2004**, *109*, 255-262.

1.6. ATIVIDADES BIOCATALÍTICAS

O estudo das biotransformações de compostos orgânicos por microrganismos vêm aumentando ao longo dos anos, resultando no conhecimento de um número crescente de reações para aplicações industriais. Entre os métodos analíticos para a seleção de microrganismos voltados a uma aplicação específica, encontram-se a cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência. Entretanto, tais técnicas são dispendiosas e lentas, dificultando a aplicação em triagens de grande porte (Reymond, 2001)⁷⁴.

Assim, as técnicas de triagem de alto desempenho (HTS), fundamentadas na emissão de fluorescência são principalmente dirigidas para a detecção do potencial catalítico de enzimas microbianas, sendo muito aplicadas devido à sua simplicidade, possibilidade de miniaturização e velocidade de ensaio. Essas técnicas permitem realizar reações com microgramas de substratos e as leituras podem ser feitas em microplacas de 96, 386 ou mais poços, e a cinética pode ser acompanhada sem o processamento das reações (Figura 9).

⁷⁴ Reymond, J-L. *Chimia* **2001**, 55, 1049-1052.

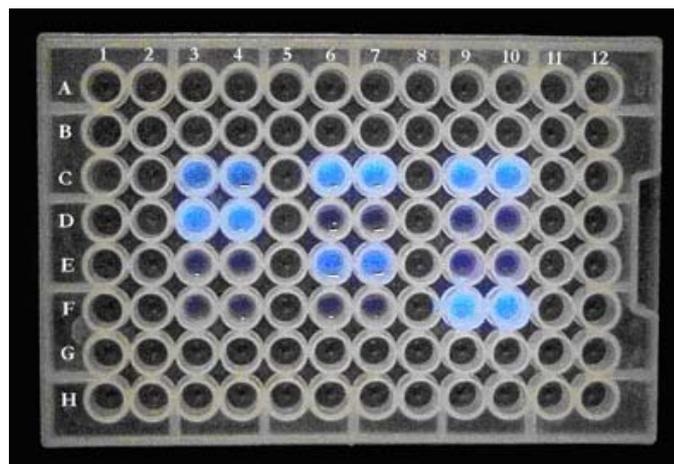
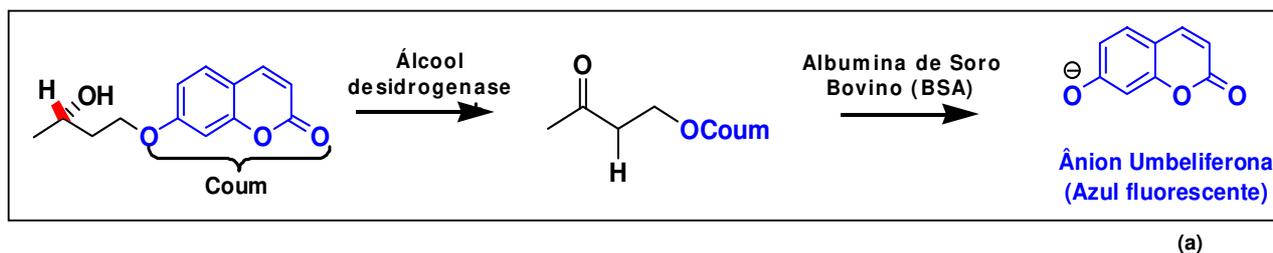


Figura 9. (a) Reação de oxidação com substrato fluorogênico produzindo o ânion umbeliferona, gerando fluorescência (Goddard e Reymond, 2004)⁷⁵. (b) Microplaca ilustrando a fluorescência da umbeliferona em reações positivas quanto à atividade enzimática⁷⁶.

Através da aplicação desta metodologia é possível detectar vários tipos de enzimas, com alta seletividade, incluindo álcool desidrogenases (Klein e Reymond, 1998)⁷⁷, aldolases (Jourdain *et al.*, 1998)⁷⁸, lipases e esterases (Klein e Reymond, 1999)⁷⁹, acilases e fosfatases (Badalassi *et al.*, 2000)⁸⁰, proteases (Badalassi *et al.*, 2002)⁸¹, transaldolases (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2003)⁸², transcetolases (Sevestre *et*

⁷⁵ Goddard J-P., Reymond, J-L. *Trends Biotechnol.* **2004**, 22(7), 363-370

⁷⁶ <http://www.dcb.unibe.ch/groups/reymond/research1.html> (Acessada em 30/08/2006).

⁷⁷ Klein, G.; Reymond, J.-L.; *Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 1113-1116.

⁷⁸ Jourdain, N.; Perez-Carlon, R.; Reymond, J.-L.; *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 9415-9418.

⁷⁹ Klein, G.; Reymond, J.-L.; *Helv. Chim. Acta* **1999**, 82, 400-407.

⁸⁰ Badalassi, F.; Wahler, D.; Klein, G.; Crotti, P.; Reymond, J.-L.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, 39, 4067-4070.

⁸¹ Badalassi, F.; Nguyen, H.K.; Crotti, P.; Reymond, J.-L.; *Helv. Chim. Acta* **2002**, 85, 3090-3098

⁸² Gonzalez-Garcia, E.M.; Hélaine, V.; Klein, G.; Schuermann, M.; Sprenger, G.; Fessner, W.-D.; Reymond, J.-L.; *Chem. Eur. J.* **2003**, 9(4), 893-899.

al., 2003)⁸³, Baeyer-Villigerases (Gutierrez *et al.*, 2003)⁸⁴ e epóxido hidrolases (Badalassi *et al.*, 2004)⁸⁵.

Enzimas produzidas por microrganismos hipertermofílicos, estão sendo muito investigadas, em virtude de sua extraordinária termoestabilidade e tolerância à desnaturação. Triagens de microrganismos hipertermofílicos foram realizadas por muitos grupos de pesquisas resultando na descoberta de novas linhagens com atividades diferenciadas. Um exemplo clássico e valioso do uso de enzimas termoestáveis obtidas a partir de um organismo termofílico é a DNA polimerase, a qual é utilizada na Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), catalisando a adição do desoxiribonucleosídeo 5' trifosfato ao 3'-OH terminal, de uma cadeia polinucleotídica, formando pares de bases complementares, os quais se alinham à uma nova cadeia, gerando o genoma de um determinado organismo (Woese *et al.*, 1990)¹². Enzimas termoestáveis, tais como, amilases (glicose, frutose), xilanases (branqueamento de papel), proteases (processamento de alimentos), lipases (detergentes), entre muitas outras, são utilizadas em indústrias químicas, alimentícias, farmacêuticas, de papel e têxteis (Fujiwara, 2002)⁸⁶, e já vêm sendo descritas como produzidas por microrganismos extremófilos.

As biotransformações oxidativas de hidrocarbonetos envolvem normalmente as oxigenases, as quais catalisam a inserção de um (monooxigenases) ou dois átomos de oxigênio (dioxigenases) em um ponto específico da molécula, freqüentemente com alta regio e estereosseletividade. As monooxigenases são divididas em duas classes principais: as dependentes de flavinas e as dependentes do citocromo P450. Nos últimos 10 anos, a oxidação enzimática de Baeyer-Villiger tem se mostrado como uma estratégia eficiente, onde estas flavoenzimas,

⁸³ Sevestre, A.; Hélaïne, V.; Gytot, G.; Martin, C.; Hecquet, L.; *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 827-830.

⁸⁴ Gutierrez, M.C.; Slegers, A.; Simpson, H.D.; Alphand, V.; Furstoss, R.; *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3500-3506.

⁸⁵ Badalassi, F.; Klein, G.; Crotti, P.; Reymond, J.-L.; *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2557-2566.

⁸⁶ Fujiwara, S. J.; *J. of Biosc. Bioeng.* **2002**, *94(6)*, 518-525.

denominadas como Baeyer-Villiger monooxigenases (BVMOs), catalisam a oxidação nucleofílica de cetonas, assim como a oxidação eletrofílica de vários heteroátomos, tais como enxôfre, selênio, nitrogênio e fósforo. Oxidações de Baeyer-Villiger mediadas por enzimas constituem uma grande ferramenta da Química Verde na produção de lactonas quirais. Muitos organismos têm sido descritos como catalisadores destas reações, sendo que as monooxigenases microbianas vêm ganhando destaque na produção de vários intermediários quirais para a indústria (Mihovilovic *et al*, 2003⁸⁷; Mihovilovic *et al*, 2006⁸⁸).

Como já descrito anteriormente no item 1.4, a biodegradação de alcanos e aromáticos envolve sistemas enzimáticos, os quais são responsáveis pelo ataque primário aos substratos. Dioxigenases são as enzimas chaves na completa mineralização de moléculas monoaromáticas ou de um dos anéis de um sistema poliaromático. Entretanto, hidrocarbonetos poliaromáticos são alvos de ataque de monooxigenases microbianas, onde a atividade destas enzimas resulta na formação de um epóxido (Figura 6), o qual é um intermediário altamente reativo⁴³. Epóxidos, por sua vez, podem ser transformados em dióis, através da ação de epóxido hidrolases microbianas.

As epóxido hidrolases estão envolvidas em várias rotas de degradação e na biossíntese de importantes compostos biológicos. Recentemente, epóxido hidrolases de microrganismos têm recebido considerável atenção nos processos que envolvem a biotransformação de vários compostos, promovendo reações estereosseletivas de grande importância. Dois aspectos importantes aumentaram os interesses por epóxido hidrolases, onde o primeiro é que tais enzimas não necessitam de cofatores e o segundo é que as epóxido hidrolases possuem um amplo leque de substratos, sendo que ambos, epóxidos e dióis, opticamente puros, podem ser utilizados como

⁸⁷ Mihovilovic, M.D.; Rudroff, F.; Müller, B.; Stanetty, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13(8), 1479-1482.

⁸⁸ Mihovilovic, M.D.; Snajdrova, R.; Grötzi, B. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, 39, 35-140.

importantes blocos de construção em sínteses assimétricas (Swaving e Bont, 1998)⁸⁹.

Os primeiros exemplos de epóxido hidrolases microbianas foram descobertos nas bactérias dos gêneros *Flavobacterium* (Martin e Foster, 1955)⁹⁰ e *Pseudomonas* (Allen e Jakoby, 1969)⁹¹, e são responsáveis pela conversão de 2,3-epoxisuccinato em ácido tartárico. É importante ressaltar que succinato também é descrito como produto da biotransformação de compostos aromáticos após a atividade de monooxigenases microbianas⁴³.

A abertura do epóxido pela enzima óxidosqualeno ciclase, leva à formação de uma molécula policíclica, semelhante ao colesterol, o qual sabe-se ser o precursor natural do biomarcador colestano, presente no petróleo. Esqualeno epoxidase, por sua vez, catalisa a epoxidação de esqualeno a 2,3-óxidoesqualeno, o qual é substrato para a formação de esteróis e uma grande variedade de triterpenóides (Leber *et al.*, 1998⁹²; Volkman, 2005⁹³). Pode-se assim pressupor sobre a atividade de oxigenases e epóxido hidrolases, não somente na biodegradação de hidrocarbonetos, mas também na biossíntese de biomarcadores do petróleo.

Lipases e esterases, por sua vez, catalisam tanto a hidrólise, quanto a síntese de ésteres formados a partir de glicerol e ácidos carboxílicos de cadeia longa. Estas reações usualmente procedem com elevada regio e enantiosseletividade, fazendo destas enzimas um grupo importante de biocatalisadores em Química Orgânica. Lipases e esterases de origem microbiana têm grande importância em biotecnologia, por serem estáveis em solventes orgânicos, não requererem cofatores, possuem

⁸⁹ Swaving, J.; de Bont, J.A.M.; *Enz. Microbiol. Technol.* **1998**, *22*, 19-26.

⁹⁰ Martin, W.R.; Foster, J.W.; *J. Bacteriol.* **1955**, *70*, 405-414.

⁹¹ Allen, R.H.; Jakoby, W.B.; *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 2078-2084.

⁹² Leber, R., Landl, K., Zinser, E., Ahorn, H., Spok, A., Kohlwein, S.D., Turnowsky, F., Daum, G.; *Mol. Biol. Cell* **1998**, *9*, 375-386.

⁹³ Volkman, J. K.; *Org. Geochem.* **2005**, *36*, 139-159.

alta especificidade com relação ao substrato e, novamente, alta enantiosseletividade (Whiteley *et al.*, 2003⁹⁴; Suzuki *et al.*, 2004⁹⁵, Hasan *et al.*, 2006⁹⁶).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* sp., vêm sendo bem descritas quanto à produção de lipases (Figura 10). A aplicação industrial mais importante das lipases, atualmente, consiste em sua adição a detergentes de uso doméstico.

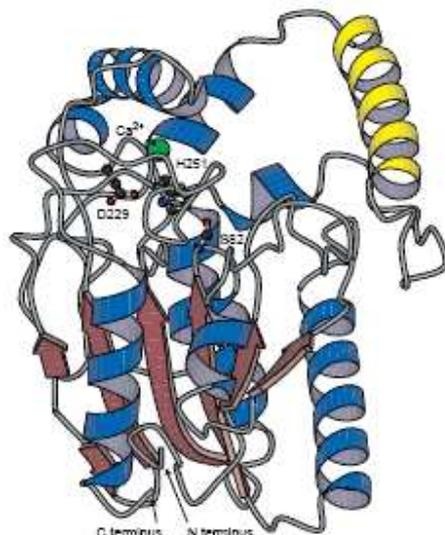


Figura 10. Estrutura tridimensional da lipase de *Pseudomonas aeruginosa*(Jaeger e Reetz, 1998)⁹⁷.

Esterases e lipases providas de organismos tolerantes a condições adversas de sobrevivência, geralmente apresentam termoestabilidade, tanto em meio orgânico quanto aquoso, propriedade esta altamente desejável em processos industriais.

⁹⁴ Whiteley, C.G.; Burgess, J.E.; Melamane, X.; Pletschke, B.; Rose, P.D.; *Water Research* **2003**, *37*, 289-296.

⁹⁵ Suzuki, Y. Miyamoto, K., Ohta, H.; *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *236*, 97-102.

⁹⁶ Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A.; *Enzyme Microb. Technol.*, **2006**, no prelo.

⁹⁷ Jaeger, K.-E.; Reetz, M.T.; *Tibtech* **1998**, *16*, 396-403.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

A biodegradação do petróleo vem sendo muito estudada visando tanto a solução de problemas ambientais, quanto a sua exploração nos reservatórios. No plano ambiental, busca-se principalmente a otimização da biodegradação microbiana aeróbia ou anaeróbia, de forma que as linhagens selecionadas apresentem alta eficiência para metabolizar estes compostos. No que diz respeito ao estudo da biodegradação relacionada à exploração de petróleo, busca-se informações sobre o metabolismo microbiano das culturas envolvidas nos processos de biotransformação dos óleos nos reservatórios.

Há uma grande polêmica sobre a população responsável pela efetiva biodegradação do petróleo *in situ*, havendo uma vertente de pesquisa que traz evidências sobre a atuação única da microbiota anaeróbia neste processo^{33,34,35}. Outras vertentes, por sua vez, acreditam que somente sob condições aeróbias poderia ocorrer a efetiva biodegradação dos óleos^{29,40,41,42}.

A existência de relações simbióticas entre diferentes espécies de microrganismos anaeróbios promovendo a biodegradação de moléculas do petróleo foi descrita por Grabowski *et al.* em 2005³⁹. A proposta do presente estudo seria a sustentação, através de resultados experimentais, da hipótese proposta por Rozanova *et al* (1997)²², ou seja, a existência de consórcios metabólicos entre comunidades microbianas aeróbias e anaeróbias, onde as bactérias anaeróbias sobreviveriam dos metabólitos produzidos pela microbiota aeróbia, a partir da biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo.

Assim, de forma a verificar e confirmar experimentalmente a existência destes consórcios estabeleceu-se quatro etapas de trabalho, cujos resultados poderiam trazer informações importantes, tanto com relação à caracterização da

microbiota presente em reservatório de petróleo brasileiro, quanto no que se refere à atividade biotransformadora da mesma.

Objetivos específicos:

- 1) Caracterizar a microbiota presente nos óleos e águas de formação do campo Pampo, da Bacia de Campos (RJ), através de enriquecimentos microbianos, de forma a recuperar-se espécies bacterianas tanto aeróbias quanto anaeróbias, permitindo assim a posterior avaliação do atividade biotransformadora destas linhagens.
- 2) Avaliar os produtos do metabolismo microbiano tanto em consórcios como em culturas puras, investigando-se principalmente a ocorrência de metabolismos simbióticos entre a microbiota aeróbia e anaeróbia do petróleo.
- 3) Avaliar a produção e a composição de exopolímeros com atividade emulsificante pelas bactérias isoladas do petróleo.
- 4) Investigar a atividade de monooxigenases, epóxido hidrolases, lipases e esterases de bactérias isoladas a partir das amostras de águas de formação e de óleos do campo Pampo, através de técnicas de triagem enzimática de alto desempenho (HTS) baseada na detecção da atividade enzimática por sondas fluorogênicas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CAPÍTULO 1 – ENRIQUECIMENTOS E CARACTERIZAÇÕES DE LINHAGENS MICROBIANAS AERÓBIAS E ANAERÓBIAS

Este capítulo refere-se aos resultados obtidos através da execução da etapa 1, descrita como primeiro objetivo específico do presente trabalho.

3.1.1. ENRIQUECIMENTOS E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSÓRCIOS MICROBIANOS ANAERÓBIOS

Para a realização destes experimentos, foram implementadas técnicas específicas para o manuseio de amostras em condições de anaerobiose (item 5.1.2.1, Parte Experimental), trazendo uma nova linha de pesquisas relacionadas a microrganismos no Instituto de Química, Unicamp.

Partindo-se das amostras provenientes da Coleta 1 (item 5.1.1, Tabela 12, Parte Experimental), tanto de óleos quanto de águas de formação de petróleo, foi possível a recuperação de um consórcio microbiano anaeróbio, produtor de metano (Figura 11), cujas células mostraram-se fluorescentes (Figura 12).

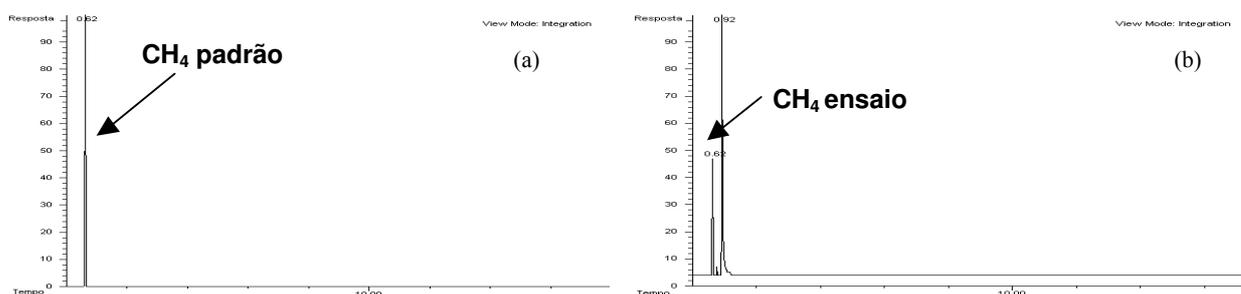


Figura 11. (a) Cromatograma obtido por CG-FID de amostra de metano padrão. (b) Cromatograma obtido por CG-FID de amostra de metano extraída dos ensaios de enriquecimento do inóculo anaeróbico.

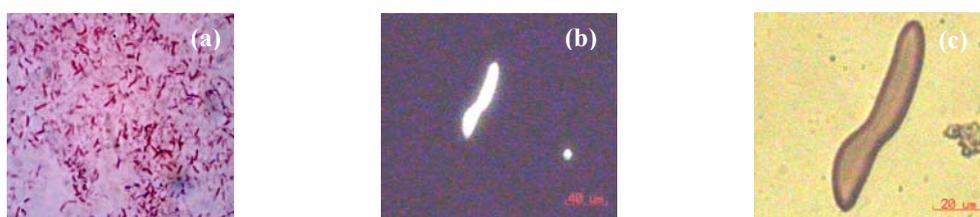


Figura 12. (a) Microscopia óptica comum: bastonetes Gram negativos, característicos de arqueias metanogênicas. (b) Fluorescência: autofluorescência da célula. (c) Contraste de fase: paredes celulares espessas.

No entanto, após várias tentativas de isolamento dos microrganismos presentes neste consórcio, através da aplicação da técnica de “Roll Tube” (Holland *et al*, 1987⁹⁸; Adachi, 1999⁹⁹) e plaqueamento direto em câmara de anaerobiose⁹⁸ (item 5.1.3, Parte Experimental), optou-se pela caracterização da composição microbiana do consórcio utilizando-se técnicas moleculares independentes de cultivo. Assim, foram construídas bibliotecas de DNA ribossomal 16S a partir do DNA total da microbiota, as quais são adequadas análises de diversidade microbiana de amostras mistas ou de origem ambiental, de forma a obter-se a composição das espécies predominantes no consórcio anaeróbico recuperado a partir do petróleo do campo Pampo. Tais análises foram realizadas sob supervisão da Dra. Valéria Maia de Oliveira, nos

⁹⁸ Holland, K.T.; Knapp, J.S.; Shoemith, J.G.; *Anaerobic Bacteria*, 1th ed., Blackie & Son: New York, 1987.

⁹⁹ Adachi, K.; *FEMS Microbiol. Ecol.* **1999**, 30(1), 77-85.

laboratórios da Divisão de Recursos Microbianos do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP.

Cerca de 50 clones resultantes da biblioteca de DNAr 16S foram analisados empregando a metodologia de ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) a fim de se detectar os perfis representativos de grupos taxonômicos diferentes, antes de proceder ao sequenciamento do DNAr 16S e inferência filogenética. Após a triagem com duas enzimas de restrição (*Hha* I e *Msp* I) (Brosius *et al.*, 1980)¹⁰⁰ (Parte Experimental, ítem 5.1.4), que cortam em sítios com quatro pares de bases, determinando maior polimorfismo de bandas entre os clones, obteve-se 2 clones com perfis de restrição diferentes, determinando grupos taxonômicos potencialmente distintos (Figura 13). O sequenciamento do DNAr 16S destes clones e subsequente análise filogenética revelaram que estes organismos pertencem ao gênero *Petrotoga* (ordem *Thermotogales*) (Figura 14), caracterizado por bactérias Gram negativas, anaeróbias estritas, termofílicas e fermentativas (Bergey's, 2001)¹⁰¹. Até o momento, estes organismos têm sido recuperados apenas de reservatórios de petróleo profundos (L'Haridon *et al.*, 2002)¹⁰². A aparente persistência destes organismos em reservatórios de petróleo sugere tolerância a altas concentrações de metais pesados, pressão e ao petróleo¹⁰⁰.

Entretanto, não foi detectada a presença de arquéias metanogênicas dentre os clones analisados. Uma possível explicação para este resultado poderia ser a ocorrência das metanogênicas em baixa abundância no consórcio, quando comparadas com as bactérias do gênero *Petrotoga*. Nesta

¹⁰⁰ Brosius, J.; Dull, T.J.; Noller, H.F.; *Proc. Natl. Acad. USA* **1980**, 77(1), 201-204.

¹⁰¹ Bergey, D. H.; *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology* 5th ed., William & Wilkins: Baltimore. 2001.

¹⁰² L'Haridon, S.; Miroshnichenko, M.L.; Hippe, H.; Fardeau, M.-L.; Bonch-Osmolovskaya, E.A.; Stackebrandt, E.; Jeanthon, C.; *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2002**, 52, 1715-1722.

caso, seria necessário o *screening* de um número bem maior de clones a partir da biblioteca de DNAr 16S a fim de confirmar a presença de arqueias metanogênicas.

Portanto, a presença destes organismos no consórcio microbiano foi sugerida apenas a partir da produção de metano, detectada através das análises de CG-FID e por caracteres microscópicos, ou seja, bastonetes Gram negativos, e emissão de fluorescência (Jones *et al*, 1987¹⁰³; Wasserfallen *et al*, 2000¹⁰⁴).

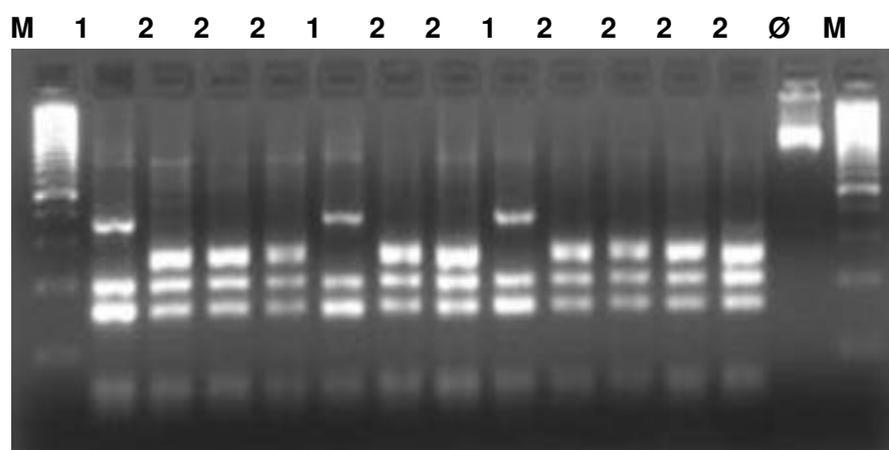


Figura 13. Análise de restrição (ARDRA) dos clones de DNAr 16S com a enzima de restrição *Msp* I, identificando dois perfis distintos (1 e 2). M: marcador de peso molecular; Ø: controle negativo.

¹⁰³ Jones, W.J.; Wagle, D.P.; Whitman, W.B.; *Microbiol. Rev.* **1987**, *51*, 135-177

¹⁰⁴ Wasserfälen, A.; Nolling, J.; Pfister, P.; Reeve, J.; de Macario, E.C. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **2000**, *50*, 43-53.

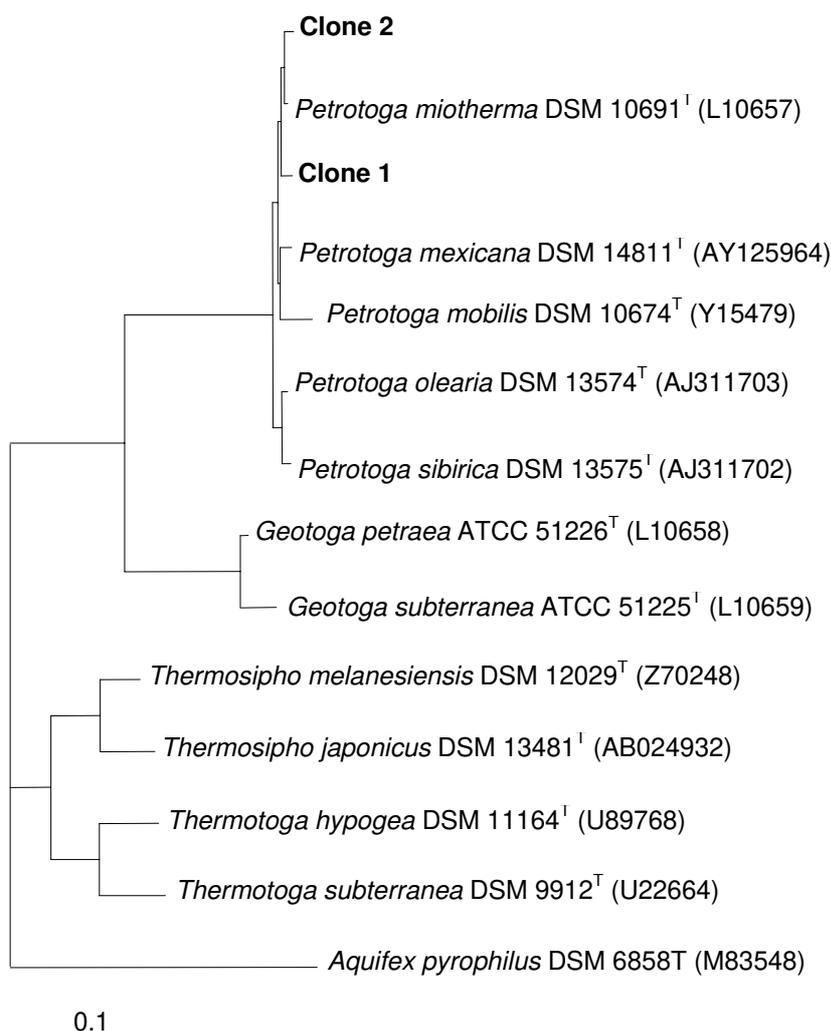


Figura 14. Filogenia das seqüências de DNAr 16S de clones representativos de grupos de ARDRA (Kimura, 1980¹⁰⁵; Saitou e Nei, 1987¹⁰⁶; software PAUP¹⁰⁷).

Não foram detectadas bactérias redutoras de sulfato na microbiota recuperada a partir da Coleta 1 utilizando as técnicas moleculares independentes de cultivo (bibliotecas de DNAr 16S). Estes resultados não eram esperados, uma vez que as amostras possuíam um forte odor de gás

¹⁰⁵ Kimura, M.; *J. Mol. Biol.* **1980**, *16*, 111-120.

¹⁰⁶ Saitou, N., Nei, M.; *Mol. Biol. Evol.* **1987**, *4*, 406-425.

¹⁰⁷ Swofford, D. L. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony*, Versão 4.0 beta, Lab. of Molecular Systematics, Smithsonian Institute (software).

sulfídrico, o qual é tido como produto do metabolismo destas bactérias. Além disso, bactérias redutoras de sulfato são amplamente descritas pela literatura^{7,30} como grandes degradadoras do petróleo, sendo esperada sua presença majoritária em amostras de óleos biodegradados. Este insucesso, no entanto, foi atribuído ao meio de cultivo inadequado utilizado, o qual não propiciou o crescimento destas bactérias. Por outro lado, também se considerou a hipótese de ocorrência de amplificação preferencial na reação de amplificação (PCR), ou seja, os “primers”, ou oligonucleotídeos sintéticos, utilizados podem ter amplificado preferencialmente outros organismos presentes no consórcio, deslocando as sulfato redutoras na reação, as quais não foram, portanto, representadas na biblioteca de DNAr 16S obtida.

Assim, no intuito de detectar outras espécies bacterianas anaeróbias que também pudessem participar de comunidades microbianas do petróleo do campo Pampo, novos enriquecimentos microbianos foram realizados a partir das amostras, tanto de óleos quanto de águas de formação, provenientes da Coleta 2 (Tabela 13, item 5.1.1, Parte Experimental), sendo que novas condições e meios de cultura foram avaliados (item 5.1.2.2, Parte Experimental).

A partir das amostras de águas de formação enriquecidas a para a recuperação de arqueias metanogênicas (item 5.1.2.1, Parte Experimental), foram obtidos 7 perfis de restrição distintos, dos quais cinco foram correspondentes à arqueias não cultiváveis, relacionadas à mecanismos de oxidação de metano. Os dois perfis restantes corresponderam à duas espécies distintas de arqueias metanogênicas *Methanohalophilus* sp. (Kotelnikova e Pedersen, 1997)¹⁰⁸ e *Methanomethylovorans* sp. (Simankova *et al.*, 2003)¹⁰⁹.

¹⁰⁸ Kotelnikova, S.; Pedersen, K.; *FEMS Microbiol. Lett.* **1997**, *20*, 339-349.

Foram avaliadas duas condições de cultivo para a recuperação de bactérias redutoras de sulfato a partir das amostras de óleos e águas referentes à Coleta 2, entretanto somente obteve-se perfis de restrição de linhagens bacterianas a partir de amostras de águas e óleos enriquecidas sob a condição 1 avaliada (ítem 5.1.2.1, Parte Experimental). Foram recuperados 3 perfis de restrição distintos, todos pertencentes ao gênero *Petrotoga*, confirmando a presença majoritária de bactérias deste gênero nos poços de petróleo do campo Pampo.

Miranda-Tello *et al.* (2004)¹¹⁰ descreveram sobre a bactéria *Petrotoga mexicana*, isolada a partir de óleos de reservatórios de petróleo mexicanos, caracterizada como bastonetes Gram-negativos, com temperatura ótima de crescimento de 55 °C e alta similaridade filogenética (97 a 99%) às espécies de *Petrotoga mobilis*, *Petrotoga sibirica*, *Petrotoga miotherma* e *Petrotoga olearia*. Tal bactéria é capaz de reduzir enxôfre elementar, tiosulfato e sulfeto a gás sulfídrico.

Correlacionando-se tais relatos aos resultados obtidos quanto às características microscópicas das células microbianas (bastonetes Gram-negativos), temperatura de crescimento (55 °C) (ítem 5.1.2.1, Parte Experimental) e identificação filogenética dos clones de *Petrotoga* recuperados a partir das amostras de óleos e águas de formação provenientes da coleta 1 (Figuras 13 e 14), aliados à detecção de bactérias do mesmo gênero, através dos enriquecimentos da Coleta 2, podemos pressupor sobre a real presença de *Petrotoga mexicana* em nossos enriquecimentos, uma vez

¹⁰⁹ Simankova, M.V.; Kotsyurbenko, O.R.; Lueders, T.; Nozhevnikova, A.N.; Wagner, B.; Conrad, R.; Friedrich, M.W.; *System. Appl. Microbiol.* **2003**, *26*, 312-318.

¹¹⁰ Miranda-Tello, E.; Fardeau, M-L.; Thomas, P.; Ramirez, F.; Casalot, L.; Cayol, J-L.; Garcia, J-L.; Ollivier, B. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2004**, *54*, 169-174.

que os perfis de restrição obtidos foram recuperados a partir de condições aplicadas ao cultivo de bactérias redutoras de sulfato (Condição 1).

Entretanto, após várias tentativas, empregando-se ambas as técnicas para o isolamento de culturas anaeróbias, ou seja, “Roll-tube”⁹⁸ e plaqueamento direto em ágar, em câmara de anaerobiose⁹⁸, não foi possível a obtenção de linhagens bacterianas puras a partir dos consórcios anaeróbios obtidos.

Outras técnicas que envolvem a diluição seriada dos consórcios microbianos, como forma de quantificar e caracterizar fisiologicamente comunidades anaeróbias, são descritas pela literatura (Vazoller, 1995)¹¹¹. Uma possibilidade para estudos futuros que venham a ser realizados com os consórcios microbianos anaeróbios obtidos de amostras de petróleo, seria a aplicação adicional destas técnicas de diluição, buscando-se o isolamento de morfotipos que possam ser avaliados quanto ao seu potencial biodegradador de hidrocarbonetos, atividade biocatalítica, produção de bioemulsificantes, entre outros importantes parâmetros, tanto no âmbito industrial quanto ambiental.

3.1.2. ENRIQUECIMENTOS MICROBIANOS AERÓBIOS

Sabe-se que apenas cerca de 1% dos microrganismos presentes no ambiente são cultiváveis, ou seja, podem ser recuperados em condições de laboratório (Orphan *et al.*, 2000)¹¹². Entretanto, para a realização de ensaios

¹¹¹ Vazoller, R.F. *Tese de Doutorado*, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, Brasil, 1995.

¹¹² Orphan, V.J., Taylor, L.T., Hafenbradl, D., Delong, E.F.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, 66(2), 700-711.

que simulem os mecanismos utilizados pelos microrganismos para a manutenção de sua sobrevivência, ou ainda, para a degradação de determinadas moléculas como fontes de carbono e energia, temos de trabalhar com linhagens cultivadas. Assim, a partir da amostragem de óleos e águas de formação, foram realizados enriquecimentos a fim de se obter o maior número possível de morfotipos cultiváveis que pudessem estar envolvidos em processos de biodegradação do petróleo do campo Pampo, para posterior viabilização de experimentos em laboratório que simulassem as condições dos poços e permitissem obter novas informações sobre as atividades biotransformadoras das linhagens recuperadas.

3.1.2.1. RECUPERAÇÃO DA MICROBIOTA AERÓBIA DE ÁGUAS DE FORMAÇÃO E ÓLEOS DO CAMPO PAMPO

a) Coleta 1:

Os enriquecimentos da microbiota aeróbia de amostras de águas de formação do petróleo, coletadas em poços do campo Pampo Sul em maio de 2002, foram realizados utilizando-se três meios de cultura distintos: Caldo Nutriente (Difco), meio BAT (Darland e Brock, 1971¹¹³ e meio Zinder¹¹⁴ “modificado” (ítem 5.1.5.1, Parte Experimental), tendo-se obtido 25 morfotipos bacterianos distintos, incluindo-se bastonetes Gram-positivos, Gram-negativos, coco-bacilos Gram-negativos e cocos Gram-positivos.

¹¹³ Darland, G., Brock, T.D.; *J. of Gen. Microbiol.* **1971**, 67, 9-15.

¹¹⁴ Zinder, S.H.; Cardwell, S.C.; Anguish, T.; Lee, M.; Koch, M.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1984**, 47, 796-807.

Os enriquecimentos seletivos para o crescimento de espécies de bactérias a partir das amostras de óleos, foram realizados em colaboração com a graduanda Lucía Jimena Dussan (Universidade Javeriana da Colômbia). Culturas microbianas aeróbias foram obtidas somente a partir dos enriquecimentos das amostras de óleos classificados como moderadamente biodegradados (Tabela 12, item 5.1.1, Parte Experimental). Em ambos os meios não seletivos, NB e TSB (descritos no item 5.1.5.2, Parte Experimental), empregados nos enriquecimentos realizados, foram observados bastonetes e coco-bacilos Gram positivos. No caldo *Acinetobacter*, observou-se a presença de coco-bacilos Gram negativos e no caldo Marine foram obtidos bastonetes longos Gram positivos. No caldo Bushnell Hass, por sua vez, também foram observados coco-bacilos Gram positivos, no entanto, tal meio de cultura empregado, possuía somente óleo bruto (item 5.1.1., óleo P1, Coleta 1 – Tabela 12, Parte Experimental) como fonte de carbono ao crescimento microbiano, indicando a recuperação de bactérias hábeis à biodegradação de hidrocarbonetos. Não foi verificado o crescimento de fungos empregando-se as condições e meios de cultura (item 5.1.5.2, Parte Experimental) selecionados à presente investigação.

A partir dos enriquecimentos realizados, para a recuperação de bactérias aeróbias, tanto das amostras de óleos quanto de águas de formação, foi obtida uma biomassa significativa da microbiota cultivável presente no campo Pampo, a qual após procedimentos de esgotamento em placas de Petri com ágar (Pelczar *et al*, 1980)¹¹⁵, possibilitou o isolamento de 29 linhagens, através de caracterização macroscópica (cor das colônias, brilho, tamanho) e microscópicas (morfologia celular e Gram). A partir dos enriquecimentos em meio BAT, seletivo para o crescimento de bactérias do gênero

¹¹⁵ Pelczar, M., Reid, R., Chan, E.C.S.; *Microbiologia*, 1th ed., McGraw-Hill do Brasil: São Paulo, 1980.

Alicyclobacillus sp, foram recuperados bastonetes Gram positivos, compatíveis com o gênero *Alicyclobacillus* sp, os quais foram posteriormente submetidos a análises moleculares visando a sua identificação.

Todas estas linhagens foram identificadas através de taxonomia molecular, baseada no sequenciamento parcial e análise filogenética do DNA ribossomal 16S.

b) Coleta 2:

As amostras coletadas em julho de 2005, incluindo águas de formação e óleos, foram inoculadas em 4 meios de cultura distintos: Caldo Nutriente (NB) e Nutriente Ágar (NA, Difco), Marine Ágar (Difco); meio mineral mínimo Zinder “modificado (Zinder, 1984)¹¹⁴ e NB adicionado de 3% de NaCl, para o cultivo de bactérias halofílicas moderadas (Quillaguamán *et al*, 2006)¹¹⁶, descritos na Parte Experimental (Itens 5.1.5.1 e 5.1.5.2, Parte Experimental).

A partir destes enriquecimentos microbianos, foram recuperadas 63 culturas bacterianas aeróbias macroscopicamente distintas, as quais estão sendo atualmente caracterizadas, por *fingerprints* genéticos e análises filogenéticas do DNAr 16S, em estudo paralelo conduzido na Divisão de Recursos Microbianos (CPQBA/UNICAMP).

¹¹⁶ Quillaguamán, J., Delgado, O., Mattiasson, B., Hatti-Kaul, R. *Enz. Microbiol. Technol.* **2006**, *38*, 148-156.

3.1.2.2. IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS AERÓBIAS OBTIDAS

Estudos recentes de ecologia microbiana vêm empregando metodologias moleculares combinadas com técnicas tradicionais baseadas em cultivo, utilizando uma abordagem polifásica na tentativa de realizar uma ampla caracterização da diversidade microbiana em diferentes ambientes. Os métodos moleculares baseados em análises do DNAr 16S são correntemente aplicados para a descrição de membros constituintes de comunidades bacterianas, enquanto o enriquecimento e o isolamento de linhagens é de extrema necessidade para a caracterização das rotas de degradação e metabolismo microbiano (Brito *et al.*, 2006)¹¹⁷.

Todas as 29 linhagens recuperadas das amostras de águas de formação de petróleo e de óleos, provenientes da Coleta 1, foram identificadas por técnicas moleculares baseadas em DNAr 16S (Tabela 3). Após o cultivo das bactérias em meio sólido (Figura 15), o DNA genômico de cada cultura foi extraído e o DNAr 16S foi amplificado através da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). As seqüências parciais de DNAr 16S obtidas, após sequenciamento automatizado, foram comparadas com seqüências de organismos já identificados e depositados na base de dados Genbank¹¹⁸ (Ítem 5.1.7, Parte Experimental), a fim de se obter a afiliação filogenética.

¹¹⁷ Brito, E.M. S.; Guyoneaud, R.; Goñi-Urriza; Ranchou-Peyruse, A.; Verbaere, A.; Crapez, M.A.C.; Wasserman, J.C.A.; Duran, R. *Res. Microbiol.* **2006**, no prelo.

¹¹⁸ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Acessada em julho de 2004).

Tabela 3. Linhagens identificadas a partir das diferentes amostras avaliadas

Linhagem	Identificação	Origem
1	<i>Bacillus pumilus</i> 1	Águas de formação ^(a)
2	<i>Bacillus pumilus</i> 2	Águas de formação ^(a)
3	<i>Bacillus pumilus</i> 3	Águas de formação ^(a)
4	<i>Bacillus pumilus</i> 4	Águas de formação ^(a)
5	<i>Bacillus pumilus</i> 5	Águas de formação ^(a)
6	<i>Bacillus pumilus</i> 6	Águas de formação ^(a)
7	<i>Bacillus pumilus</i> 7	Águas de formação ^(a)
8	<i>Bacillus pumilus</i> 8	Águas de formação ^(a)
9	<i>Bacillus pumilus</i> 9	Águas de formação ^(a)
10	<i>Bacillus pumilus</i> 10	Águas de formação ^(a)
11	<i>Bacillus pumilus</i> 11	Águas de formação ^(a)
12	<i>Bacillus pumilus</i> 12 ^(c)	Águas de formação ^(a)
13	<i>Bacillus megaterium</i> 1	Águas de formação ^(a)
14	<i>Bacillus megaterium</i> 2	Águas de formação ^(a)
15	<i>Bacillus megaterium</i> 3	Águas de formação ^(a)
16	<i>Bacillus</i> sp. 1	Águas de formação ^(a)
17	<i>Bacillus</i> sp. 2	Águas de formação ^(a)
18	<i>Bacillus</i> sp. 3	Águas de formação ^(a)
19	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Águas de formação ^(a)
20	<i>Pseudomonas</i> sp.	Águas de formação ^(a)
21	<i>Halomonas</i> sp.	Águas de formação ^(a)
22	<i>Micrococcus</i> sp. ^(a)	Águas de formação ^(a)
23	<i>Microbacterium</i> sp. ^(a)	Águas de formação ^(a)
24	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Óleo (P2) ^(b)
25	<i>Dietzia</i> sp.	Óleo (P2) ^(b)
26	<i>Methylobacterium</i> sp.	Óleo (P2) ^(b)
27	<i>Brevibacillus</i> sp.	Óleo (P2) ^(b)
28	<i>Bacillus subtilis</i>	Óleo (P2) ^(b)
29	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	Óleo (P2) ^(b) e águas de formação ^(a)

^(a) Bactérias isoladas a partir do enriquecimento, sob condições aeróbias, de 7 amostras de águas de formação de petróleo, fornecidas pela Petrobras em julho de 2003. ^(b) Bactérias isoladas a partir de enriquecimentos da amostra de óleo P2, proveniente da Coleta 1, realizada na Plataforma Pampo em maio de 2002.

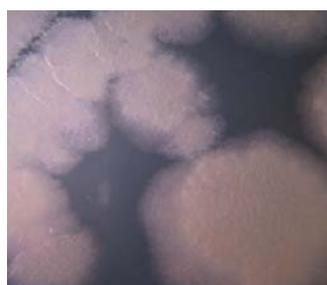
*Pseudomonas* sp*Bacillus subtilis*

Figura 15. Linhagens inoculadas em ágar para identificação por técnicas moléculas baseadas no DNAr 16S.

Bactérias do gênero *Microbacterium* foram descritas por Supaphol *et al.* (2006)¹¹⁹ em amostras de solos tropicais contaminadas com petróleo, enquanto a atividade biocatalítica desta espécie foi discutida por Li *et al.* (2005)¹²⁰, em estudos sobre a biodessulfurização de compostos orgânicos. No entanto, a espécie *Microbacterium* sp. não havia sido descrita, ainda, em comunidades provindas de águas de formação de petróleo. *Micrococcus* sp., por sua vez, é bem descrita como hábil degradadora de hidrocarbonetos e constituinte de microbiota de ambientes contendo petróleo (Joshi e Walia, 1996¹²¹, Torres *et al.*, 2005¹²²), o que corrobora os resultados de recuperação de bactérias deste gênero a partir das amostras de águas de formação de petróleo, provenientes do campo Pampo.

Bactérias do gênero *Bacillus* também são comumente descritas por vários autores que relatam sobre comunidades microbianas de petróleo e microrganismos que utilizam hidrocarbonetos como fontes de carbono e energia⁴⁴ (Toledo *et al.*, 2006¹²³). Linhagens de *Bacillus* sp., em geral, são ditas como degradadoras secundárias, ou seja, assimilam os metabólitos

¹¹⁹ Supaphol, S., Panichsakpatana, S., Trakulnaleamsai, S., Tungkananuruk, N., Roughjanajirapa, P., O'Donnell, A. G.; *J. of Microbiol Methods* **2006**, 65(3), 432-441.

¹²⁰ Li, W., Zhang, Y., Wang, M. D., Shi, Y.; *FEMS Microbiol. Letters*, **2005**, 247, 45-50.

¹²¹ Joshi, B., Walia, S.; *FEMS Microbiol. Ecol.* **1995**, 19(1), 5-15.

¹²² Torres, L. G., Rojas, N., Bautista, G., Iturbe, R.; *Proc. Biochem.* **2005**, 40, 3296-3302.

¹²³ Toledo, F. L., Calvo, C., Rodelas, B., González-López, J. *Syst. and Appl. Microbiol.* **2006**, 29(3), 244-252.

produzidos por bactérias tidas como degradadoras primárias, iniciando o processo de biotransformação de hidrocarbonetos (DuTeau *et al.*, 1998)¹²⁴. O fato dos *Bacillus* serem conhecidos produtores de biossurfactantes (Quesada *et al.*, 1993)¹²⁵ correlaciona ambos os relatos da literatura, ou seja, através da síntese de surfactantes tais bactérias conseguem emulsificar o petróleo, tornando-o mais acessível ao consumo microbiano (Barathi & Vasudevan, 2001)¹²⁶. Assim, linhagens de outras espécies iniciariam o processo de biodegradação dos hidrocarbonetos e demais compostos, enquanto os *Bacillus* poderiam sobreviver dos produtos do metabolismo destas cepas. No presente estudo foram recuperadas doze linhagens de *Bacillus pumilus*, três de *Bacillus megaterium*, três de *Bacillus* sp. e uma cepa de *Bacillus subtilis*. A predominância deste gênero nos enriquecimentos microbianos sugere sua grande adaptação a reservatórios de petróleo, incluindo sua habilidade à sobrevivência em ambientes extremos, ou seja, alta salinidade, temperatura e pressão elevadas, escassez de nutrientes e deficiência dos teores de oxigênio.

Linhagens pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, por sua vez, também são conhecidas como hábeis degradadoras de hidrocarbonetos, tendo sido apontadas em estudos recentes como componentes da microbiota indígena de reservatórios de petróleos⁴⁴ (Déziel *et al.*, 1996¹²⁷; Prabhu *et al.*, 2003¹²⁸). Estes dados de literatura corroboram os resultados de recuperação de bactérias deste gênero a partir das amostras de petróleo do campo Pampo Sul da Bacia de Campos, sugerindo fortemente que tais microrganismos não são

¹²⁴ DuTeau, N. M., Rogers, J. D., Bartholomay, C. T., Reardon, K. F.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 4994-4999.

¹²⁵ Quesada, E., Béjar, V., Calvo, C.; *Experimentia* **1993**, *49*, 1037-1041.

¹²⁶ Barathi, S., Vasudevan, N.; *Environ. Int.* **2001**, *26*, 413-416.

¹²⁷ Déziel, É., Paquette, G., Villemur, R., Lépine, F., Bisailon, J. G.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*(6), 1908-1912.

¹²⁸ Prabhu, Y., Phale, P. S.; *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* **2003**, *61*(4), 342-351.

contaminantes adquiridos na coleta das amostras, ou provenientes de biofilmes de tubulações que carregam o petróleo à superfície, mas sim, correspondem a consituíntes nativos do reservatório.

Halomonas sp., por sua vez, corresponde a um gênero bacteriano classificado como halofílico moderado, ou seja, desenvolvem-se em concentrações de NaCl entre 3 e 15%¹¹⁶. Esta bactéria já foi descrita por García *et al* (2005)¹²⁹ quanto ao seu potencial catabólico de compostos orgânicos aromáticos em estudos de biorremediação. O fato da bactéria ter sido isolada em nosso estudo é justificado pela origem das amostras que foram investigadas, onde o NaCl, pré-requisito ao crescimento da bactéria, encontra-se em abundância.

Até a realização do presente trabalho, bactérias do gênero *Alicyclobacillus* sp. não haviam sido descritas em reservatórios de petróleo. O isolamento e a identificação molecular de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, assim como a determinação da composição de suas membranas, correlacionando a presença de ácidos em suas paredes celulares com a presença destes ácidos em amostras de óleos biodegradados provenientes de reservatórios de petróleos brasileiros, levaram-nos à publicação de dados inéditos sobre a descrição destes microrganismos em reservatórios de petróleo

38

É importante ressaltar que a partir da amostra de óleo P2, caracterizada geoquimicamente como moderadamente biodegradada (comunicação pessoal, Dr. Eugenio Vaz dos Santos Neto), foi possível o isolamento de 5 linhagens bacterianas distintas, as quais não foram recuperadas a partir das águas de formação avaliadas. Utilizando-se os meios de cultura não seletivos, NB e TSB (item 5.1.5.2, Parte Experimental), foi possível a recuperação de *Bacillus*

¹²⁹ García, M. T., Ventosa, A., Mellado, E.; *FEMS Microbiol. Ecol.* **2005**, *54*, 97-109.

subtillis e *Methylobacterium* sp., respectivamente. Ambas as bactérias, assim como, *Achromobacter xylosoxidans*, *Microbacterium* sp. e *Pseudomonas* sp., têm sido extensivamente descritas pela literatura como excelentes degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em estudos ambientais (Meyer *et al.*, 1999¹³⁰; Moody *et al.*, 2001¹³¹; Widada *et al.*, 2002¹³²; Gauthier *et al.*, 2003¹³³).

Bacillus subtillis já havia sido descrito como isolado de águas de formação em reservatórios da China (Nazina *et al.*, 2002)¹³⁴. Bactérias do gênero *Methylobacterium*, por sua vez, foram detectadas por Orphan *et al* (2000)¹¹², a partir de análises de amostras de óleos na Califórnia. Linhagens de *Brevibacillus* foram isoladas a partir de amostras de óleos brutos no México, por Pineda *et al.* em 2004¹³⁵. *Achromobacter xylosoxidans* e *Methylobacterium* sp. também foram descritas por Andreoni *et al* (2004)¹³⁶, como eficientes degradadoras de fenantreno em experimentos realizados para a verificação de bactérias isoladas de solos contaminados por petróleo.

O meio mineral Bushnell Hass (item 5.1.5.2, Parte Experimental) permitiu a recuperação de uma linhagem de *Dietzia* sp., demonstrando sua habilidade de sobreviver às custas do metabolismo de hidrocarbonetos do petróleo como fontes únicas de carbono e energia. Esta bactéria já havia sido descrita como isolada de solos poluídos por petróleo, assim como em

¹³⁰ Meyer, S., Moser, R., Neef, A., Stahl, U., Kampfer, P.; *Microbiology* **1999**, *145*, 1731-1741.

¹³¹ Moody, J. D., Freeman, J. P., Doerge, D. R., Cerniglia, C. E.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 1476-1483.

¹³² Widada, J., Nojiri, H., Kasuga, K., Yoshida, T., Habe, H., Omori, T.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *58*, 202-209.

¹³³ Gauthier, E., Deziel, E., Villemur, R., Juteau, P., Lepine, F., Beaudet, R.; *J. of Appl. Microbiol.* **2003**, *94*, 301-311

¹³⁴ Nazina T.N.; Grigor'yan A.A.; Xue Y-F.; Sokolova D.S.; Novikova E.V.; *Microbiology* **2002**, *71*, 91-97.

¹³⁵ Pineda, G., Boll, G., Lira, C.; *Biodegradation* **2004**, *15*, 145-151.

¹³⁶ Andreoni, A. Cavalca, L., Rao, M. A., Nocerino, G., Bernasconi, S., Dell'Amico, E., Colombo, M., Gianfreda, L.; *Chemosphere*, **2004**, *57*, 401-412.

sedimentos provenientes de mangues brasileiros, também contaminados por petróleo, tendo alto potencial à degradação de hidrocarbonetos¹¹⁴ (Chaillan *et al*, 2004)¹³⁷.

Os resultados de isolamento e identificação apresentados neste estudo sugerem fortemente a presença de microrganismos aeróbios em ecossistemas contendo petróleo, tornando-se plausível a hipótese de que bactérias aeróbias participam ativamente nos processos de biodegradação de óleos *in situ*.

3.1.3. ENSAIOS DE ANTIBIOGRAMA E MIC (CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA)

A predominância de bactérias do gênero *Bacillus* dentre os isolados obtidos neste estudo e a existência de hipóteses sobre microrganismos capazes de inibir o desenvolvimento de outros em reservatórios de petróleo, através da produção de antibióticos, levaram à realização de análises de antibiogramas (Madigan, 2000¹³⁸, Bendle *et al.*, 2004¹³⁹) e Concentração Inibitória Mínima (MIC) (Cole, 1994¹⁴⁰, Bicalho *et al.*, 2003¹⁴¹).

No Brasil, existem reservatórios de óleos rasos, com temperaturas abaixo de 80 °C, ou seja, sob condições em que o processo da paleopasteurização, descrito por Wilhelms *et al.* (2000)¹⁴², não ocorreria,

¹³⁷ Chaillan, F., Flèche, A. L., Bury, E., Phantovong, Y., Grimont, P., Saliot, A., Oudot, J.; *Res. in Microbiol.* **2004**, *155*, 587-595.

¹³⁸ Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J.; *Biology of Microorganisms*, 9th ed., Prentice Hall: New Jersey, 2000.

¹³⁹ Bendle, J.S., James, P.A., Bennett, P.M., Avison, M.B., MacGowan, A.P., Al-Shafi, K.M.; *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2004**, *24*(6), 619-621.

¹⁴⁰ Cole, M.D.. *Biochem. System. and Ecol.* **1994**, *22*(8), 837-856.

¹⁴¹ Bicalho, B. Gonçalves, R.A.C., Zibordi, A.P.M., Manfio, G.P., Marsaioli, A.J. Z. *Naturforsch* **2003**, *58*, 746-751.

¹⁴² Wilhelms, A.; Larter, S.R.; Head, I.; Farrimond, P.; di-Primio, R.; Zwach, C.; *Nature* **2000**, *411*, 1034-1037.

tornando tais ambientes propícios à biodegradação do petróleo. No entanto, os óleos destes poços são tidos como não biodegradados (Dr. Eugenio Vaz dos Santos Neto, comunicação pessoal). Diante da existência de fenômenos como este, em reservatórios de petróleo, investigou-se a existência de possíveis “venenos naturais”, ou seja, comunidades microbianas não biodegradadoras de hidrocarbonetos, mas tolerantes às condições dos reservatórios, as quais pudessem inibir o crescimento de populações degradadoras.

Assim, a atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários das cepas recuperadas a partir das amostras de águas de formação e óleos foi avaliada. Iniciou-se a investigação com uma estratégia de triagem rápida, para determinar quais linhagens se sobressaíam, quanto ao crescimento microbiano, aos consórcios microbianos dos quais foram isoladas. Denominamos este experimento como antibiograma adaptado, onde a formação de halos de crescimento microbiano sobre o consórcio, poderia indicar a maior predominância ou adaptação de uma cepa sobre as demais (ítem 5.1.8 a, Parte Experimental).

As cepas que apresentaram halos de crescimento microbiano superiores a 0,5 cm de diâmetro foram submetidas aos ensaios de Concentração Mínima Inibitória (MIC). Extratos orgânicos dos metabólitos secundários produzidos pelas linhagens foram avaliados em diversas concentrações, determinando-se assim a concentração inibitória mínima em relação às outras cepas (ítem 5.1.8 b, Parte Experimental).

a) Antibiogramas

Os resultados foram avaliados como formação, ou não, de halos de crescimento de cada bactéria sobre o consórcio. As bactérias 6, 7, 8, 9, 10, 11,

14, 15, 17, 18, 19, 20, 25 e 26 (Tabela 3), apresentaram halos de crescimento variáveis entre 0,5 e 3 cm, após 24 horas de incubação a 28° C (Figura 16).



Figura 16. Amostras dos ensaios de antibiograma realizados. (A = controle negativo, ou seja, discos estéreis imersos em água destilada autoclavada).

As linhagens 6, 7, 8, 9, 10 e 11 correspondiam à mesma espécie, *Bacillus pumilus*, indicando uma suposta explicação à predominância das mesmas, frente às demais culturas identificadas a partir das águas de formação e óleos, uma vez que tais linhagens de *Bacillus pumilus* apresentaram halos de crescimento (1 cm) sobre o consórcio microbiano aeróbio.

As culturas 14 e 15, identificadas como *Bacillus megaterium*, também apresentaram crescimento, com halos discretos (0,5 cm) se comparados aos de *Bacillus pumilus*. No entanto, 3 linhagens foram identificadas como pertencentes à espécie *Bacillus megaterium*, o que também poderia determinar maior habilidade de sobrevivência das bactérias ao meio (reservatórios de petróleo).

As cepas 17 e 18, correspondentes a *Bacillus* sp., apresentaram a formação de halos de 1 e 3 cm, respectivamente, o que confirmaria a hipótese de que bactérias pertencentes a este gênero seriam resistentes às condições dos poços, constituindo a grande maioria da microbiota aeróbia.

Pseudomonas stutzeri, linhagem 19, apresentou halo de crescimento de aproximadamente 2 cm. A linhagem 20, do mesmo gênero, *Pseudomonas* sp.,

demonstrou halo de aproximadamente 1 cm. *Dietzia* sp. (25) e *Methylobacterium* sp. (26) apresentaram crescimento ativo junto ao consórcio microbiano, no entanto, apresentaram halos discretos (0,5 cm), se comparados às demais culturas investigadas.

Brevibacillus sp. (27) apresentou halo de crescimento de aproximadamente 3 cm, também demonstrando grande compatibilidade com o consórcio. O gênero *Brevibacillus* já foi descrito como hábil à degradação de hidrocarbonetos (Grishchenkov *et al.*, 2000)¹⁴³ e ainda quanto à utilização de asfaltenos como únicas fontes de carbono e energia (Pineda-Flores *et al.*, 2004)¹⁴⁴. Os resultados encontrados são, portanto, corroborados por relatos da literatura, e poderiam sustentar a hipótese de que *Brevibacillus* sp. é um dos microrganismos efetivamente responsáveis pela degradação do petróleo, uma vez que o mesmo foi isolado a partir de amostras de óleos altamente biodegradados.

Halomonas sp. (21), *Micrococcus* sp. (22), *Microbacterium* sp. (23), *Achromobacter xylosoxidans* (24) e *Bacillus subtilis* (28) não apresentaram crescimento sobre o consórcio microbiano avaliado.

b) Concentração Inibitória Mínima (MIC)

As análises de MIC foram realizadas para determinar se as linhagens que apresentaram crescimento junto ao consórcio, também seriam produtoras de substâncias antimicrobianas capazes de inibir o crescimento de outros gêneros, e em que concentrações isto ocorreria. Extratos orgânicos das bactérias também do consórcio foram obtidos através do seu pré-cultivo no

¹⁴³ Grishchenkov, V.G., Townsend, R.T., McDonald, T.J., Autenrieth, R.L., Bonner, J.S., Boronin, A.M.; *Proc. Biochem.* **2000**, 35, 889-896.

¹⁴⁴ Pineda-Flores, G.; Boll-Arguello, G.; Lira-Galeana, C.; Mesta-Howard, A.M.; *Biodegradation* **2004**, 15, 145-151.

meio de cultura Caldo Nutriente (NB), seguido por extração dos metabólitos gerados, utilizando-se acetato de etila como solvente.

A atividade antifúngica dos extratos foi avaliada frente às cepas de *Aspergillus niger* CCT 1435 e *Candida albicans* CCT 0776, tendo como padrão de referência o produto comercial Loprox[®]. A ação antibacteriana, foi investigada em relação às linhagens de *Staphylococcus aureus* CCT 4295 e *Escherichia coli* CCT 5050, representantes das principais classes de bactérias, Gram positivas e Gram negativas, respectivamente, utilizando-se como antibiótico padrão de referência o Cloranfenicol[®].

Os extratos brutos de *Pseudomonas stutzeri*, *Brevibacillus* sp. e *Methylobacterium* sp. a 1 mg/mL; *Bacillus* sp. 3 e *Bacillus megaterium* 2 a 0,5 mg/mL, mostraram-se ativos sobre *Candida albicans*, inibindo o crescimento da levedura. Os extratos de *Dietzia* sp., *Bacillus* sp. 3 e *Bacillus pumilus* 6, a 1mg/mL, mostraram atividade antibacteriana, sobre a linhagem de *S. aureus*. Os extratos *Bacillus* sp. 3 e *Bacillus pumilus* 6, à concentração de 0,5 mg/mL, e *Brevibacillus* sp., a 1 mg/mL, mostraram atividade sobre a bactéria *E.coli* CCT 5050. Entretanto, os extratos de *Pseudomonas* sp e do consórcio bacteriano não demonstraram atividades antimicrobianas sobre as cepas avaliadas. Torna-se importante ressaltar que nenhum dos extratos bacterianos avaliados apresentou atividade sobre o fungo filamentoso *Aspergillus niger* CCT 1435. No entanto, o extrato de *Bacillus* sp. 3 apresentou os melhores resultados no que se refere ao espectro de atividade, atuando sobre bactérias Gram positivas (*S. aureus*), Gram negativas (*E. coli*) e ainda sobre a levedura *C. albicans* (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo dos melhores resultados encontrados (“Antibiograma adaptado” e MIC)

Extratos Bacterianos	Halo de crescimento (cm)	MIC – <i>S. aureus</i> mg/mL	MIC – <i>E. coli</i> mg/mL	MIC – <i>C. albicans</i> mg/mL	MIC – <i>A. niger</i> mg/mL
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2	-	-	1	-
<i>Brevibacillus</i> sp.	3	-	1	1	-
<i>Methylobacterium</i> sp.	0,5	-	-	1	-
<i>Dietzia</i> sp.	0,5	1	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. 3	3	1	0,5	0,5	-
<i>Bacillus megaterium</i> 2	0,5	-	-	0,5	-
<i>Bacillus pumilus</i> 6	1	1	0,5	-	-
Consórcio bacteriano	-	-	-	-	-
Cloranfenicol (MIC)	-	0,004	0,004	0,004	0,004
Loprox (MIC)	-	0,004	0,004	0,004	0,004

Os resultados apresentados têm caráter investigativo quanto à atuação de metabólitos secundários microbianos na seleção de linhagens componentes da microbiota de reservatórios de petróleo. Foi observado que dentre as cepas avaliadas, algumas se sobressaíram tanto nos antibiogramas (com relação ao diâmetro dos halos de crescimento) quanto nos ensaios de MIC (atividade antimicrobiana), ou seja, *Brevibacillus* sp., *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus* sp. e *Bacillus pumilus*.

3.1.I. CONCLUSÕES PARCIAIS – CAPÍTULO 1

- I) Através dos enriquecimentos microbianos aeróbios e anaeróbios, foi possível a obtenção de consórcios e cepas bacterianas (aeróbias), provindas de águas de formação e óleos do campo Pampo, fornecendo perfis sobre espécies que podem estar envolvidas com a biodegradação do petróleo de uma das maiores reservas brasileiras;
- II) As etapas de isolamento e caracterização de componentes das comunidades microbianas presentes nas amostras de águas de formação de petróleo e óleos, permitiram a identificação de microrganismos aeróbios, cultiváveis, presentes em reservatório de petróleo brasileiro;
- III) Todos os microrganismos isolados e identificados neste estudo, à exceção de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, já foram previamente reportados na literatura como degradadores de hidrocarbonetos e/ou associados a ambientes de reservatórios de petróleo, sugerindo que eles possam ter ampla distribuição nestes ambientes em diferentes regiões geográficas;
- IV) Os experimentos de antibiograma adaptados e MIC têm caráter investigativo quanto à capacidade competitiva das linhagens aeróbias diante do consórcio microbiano do qual foram extraídas, sendo que a sobreposição de halos de crescimento, aliada à detecção da produção de metabólitos secundários com atividade antibiótica podem indicar o porquê da maior predominância de bactérias do

gênero *Bacillus*, dentre as bactérias aeróbias isoladas das amostras de águas de formação do petróleo do campo Pampo. Torna-se importante enfatizar que os resultados obtidos quanto à produção de compostos com atividade antimicrobiana, por bactérias recuperadas a partir de reservatórios de petróleo, constituem relatos inéditos à literatura de referência.

3.2. CAPÍTULO 2 – BIOTRANSFORMAÇÕES AERÓBIAS E ANAERÓBIAS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DO PETRÓLEO

Este capítulo refere-se à execução da etapa 2, descrita como segundo objetivo do presente estudo, onde buscamos a detecção de linhagens, tanto aeróbias quanto anaeróbias, que tivessem habilidade à biotransformação de compostos do petróleo, determinando-se os metabólitos gerados a partir de análises de CG-EM.

3.2.1. BIOTRANSFORMAÇÕES ANAERÓBIAS DE HIDROCARBONETOS E COMPOSTOS OXIGENADOS

Nesta etapa do trabalho buscou-se determinar possíveis biotransformações de compostos orgânicos presentes no petróleo brasileiro pelos consórcios anaeróbios, avaliadas através de perfis cromatográficos, obtidos por CG-EM. Os substratos avaliados foram fitano, colestano, ácido octadecanóico e β -amirina, por representarem classes distintas de compostos orgânicos, incluindo biomarcadores e seus precursores (itens 5.2.1 e 5.2.2, Parte Experimental). Assim, poderia ser obtida uma visão geral da atuação dos microrganismos anaeróbios sobre compostos de difícil biodegradação como o colestano, ou ainda, se a microbiota poderia biotransformar a β -amirina, a qual é o precursor natural do biomarcador oleanano. O ácido octadecanóico foi avaliado como exemplo de ácido carboxílico de cadeia longa, passível de ser metabolizado pela microbiota, como fonte de oxigênio ou carbono. Fitano, por sua vez, foi avaliado como representante da classe dos isoprenóides,

investigando-se sobre possíveis produtos formados através de sua biodegradação anaeróbia.

I) Fitano e 5 α -Colestano

Ensaio para análises da biotransformação anaeróbia dos biomarcadores fitano (C₂₀) e 5 α -colestano (C₂₇) foram realizados, sendo que após 120 dias de avaliação através de CG-EM não foram detectados traços de biodegradação de tais hidrocarbonetos (Figura 17).

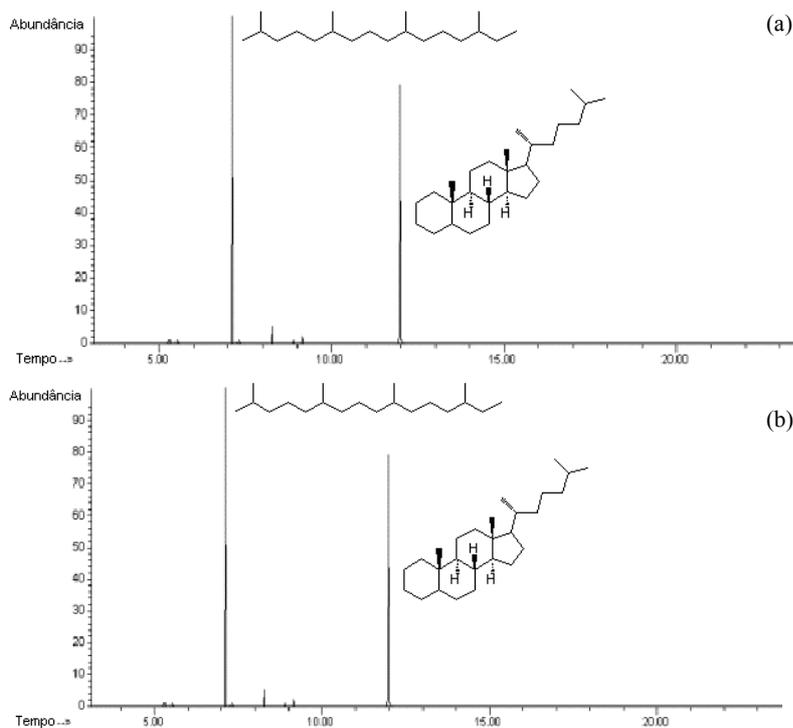


Figura 17. (a) Cromatograma de corrente iônica total do fitano e colestano (0 dia). (b) Cromatograma de corrente iônica total do fitano e colestano (120 dias).

Como já descrito no capítulo 1, através de metodologias independentes de cultivo, foi possível identificar bactérias do gênero *Petrotoga* presentes em alta abundância na microbiota anaeróbia, as quais não são descritas na literatura como degradadoras de hidrocarbonetos, mas sim como tolerantes às

condições (pressão, temperatura, salinidade) dos reservatórios de petróleo (Bergey's, 2001)¹⁰¹. Isto poderia justificar o fato de não termos detectado a biotransformação dos biomarcadores avaliados. Um outro motivo, também de grande importância, seria a não afinidade metabólica do consórcio avaliado sobre os hidrocarbonetos em questão. Neste caso, uma hipótese plausível seria a de que outras populações microbianas, anaeróbias ou não, iniciariam o processo de biodegradação destes compostos, tornando-os acessíveis à microbiota avaliada.

II) Ácido Octadecanóico

No presente experimento um ácido carboxílico serviu para investigar se a microbiota anaeróbia poderia ser alimentada por ácidos provenientes da prévia biotransformação de hidrocarbonetos por microrganismos aeróbios (Connan, 1984)¹⁴⁵, ou ainda por ácidos derivados da lise de paredes celulares microbianas aeróbias³⁸.

O ácido octadecanóico foi utilizado como substrato representante da classe dos ácidos lineares (C₁₀ a C₂₃), sendo inoculado juntamente à microbiota anaeróbia. Após 90 dias de incubação foi detectada atividade microbiana sobre o ácido (Figura 18). As amostras foram metiladas antes das análises cromatográficas (Ítem 5.2.2, Parte Experimental).

¹⁴⁵ Connan, J. Em *Advances in Petroleum Geochemistry*; Brooks, J.; Welte, D.H., eds.; Academic Press: London, 1984.

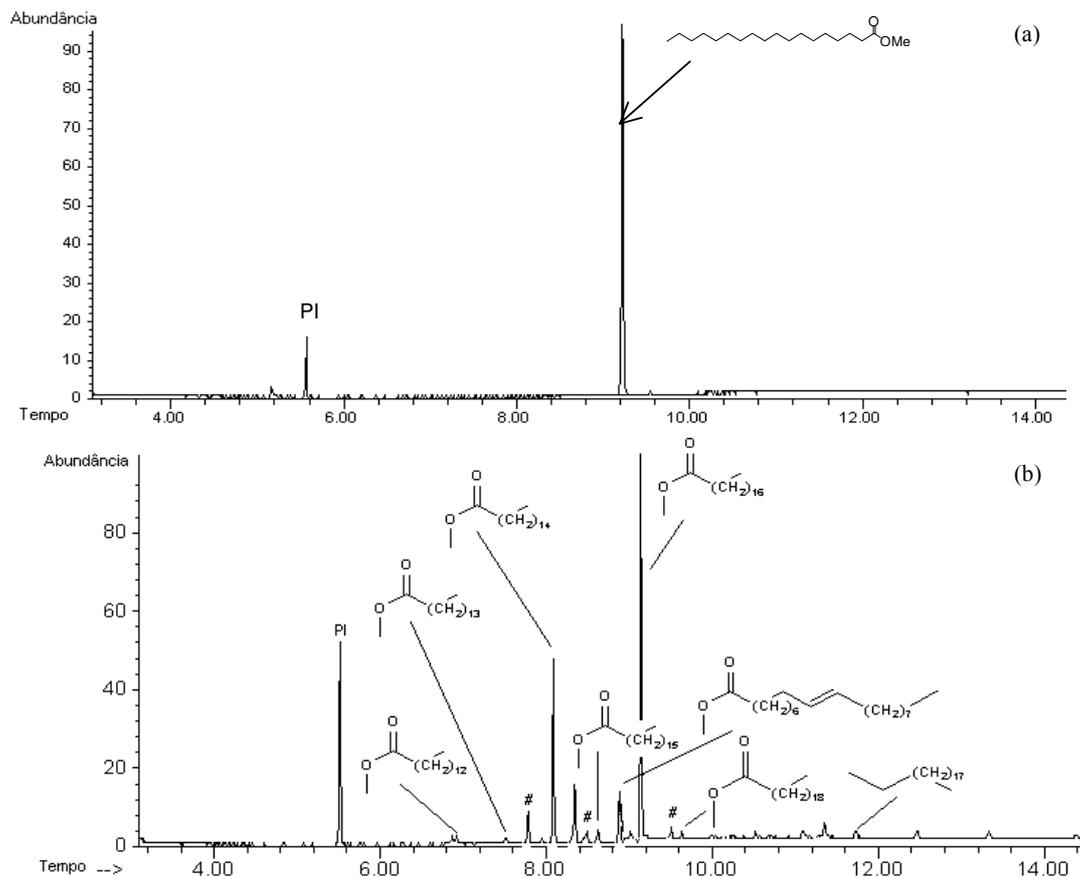


Figura 18. (a) Cromatograma de corrente iônica total da amostra metilada do ácido octadecanóico em tempo 0. (b) Cromatograma de corrente iônica total da amostra metilada do ácido octadecanóico, após 90 dias de monitoramento. PI = padrão interno : Pentadecano. # = contaminantes.

Através da análise dos cromatogramas (Figura 18), foi possível verificar o consumo de 50% do ácido octadecanóico (C₁₈) pela microbiota anaeróbia. Para isto, utilizou-se a abundância do mesmo em relação ao padrão interno (pentadecano). Os produtos majoritários da biotransformação do ácido octadecanóico pela microbiota anaeróbia foram os ácidos tetradecanóico (C₁₄), pentadecanóico (C₁₅), hexadecanóico (C₁₆), 9-octadecenóico e eicosanóico, formando também o hidrocarboneto linear *n*- eicosano. Torna-se importante ressaltar que a microbiota anaeróbia realizou tanto de clivagens do ácido

octadecanóico a ácidos de cadeias menores, quanto à sua elongação, seguida de descarboxilação, formando *n*-alcanos.

Os resultados obtidos, embora preliminares, permitem pressupor que há preferência da microbiota anaeróbia pelo consumo de compostos oxigenados a hidrocarbonetos, se compararmos a capacidade biodegradadora da microbiota frente aos hidrocarbonetos avaliados (fitano e colestano) e ao ácido carboxílico de cadeia longa.

III) β -amirina

Oleananos foram formados em sedimentos através de alterações diagenéticas e catagenéticas de vários triterpenos α -funcionalizados, oriundos de angiospermas (Mackenzie (1982)¹⁴⁶.

A relação produto-precursor entre compostos do tipo β -amirina e 18 α (H)-oleanano é bem estabelecida (ten Haven & Rullkötter, 1988¹⁴⁷; Rullkötter *et al.*, 1994¹⁴⁸). Oleananos são encontrados com duas configurações: 18 α (H)-oleanano (1a) e 18 β (H)-oleanano (1b) (Figura 19). A configuração alfa é a mais estável, termodinamicamente, sendo predominante em óleos brutos e rochas geradoras (Riva *et al.*, 1988¹⁴⁹). Os processos de biodegradação e “water washing”, os quais são os mais importantes após a formação do reservatório, não alteram as estruturas de ambos os isômeros, tornando tal biomarcador importante para estudos de correlações óleo-óleo e óleo-rocha, devido à sua estabilidade (Alberdi & López, 2000)¹⁵⁰.

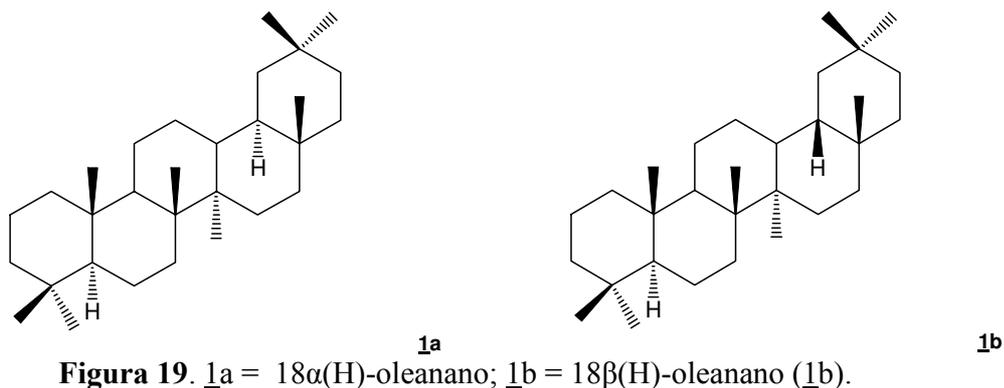
¹⁴⁶ Mackenzie, A.S., Patience, R.L., Yon, D.A., Maxwell, J.R.; *Geochim. et Cosmochim. Acta* **1982**, 46, 783-792.

¹⁴⁷ ten Haven, H.L., Rullkötter, J.; *Geochim. et Cosmochim. Acta* **1988**, 52, 2543-2548.

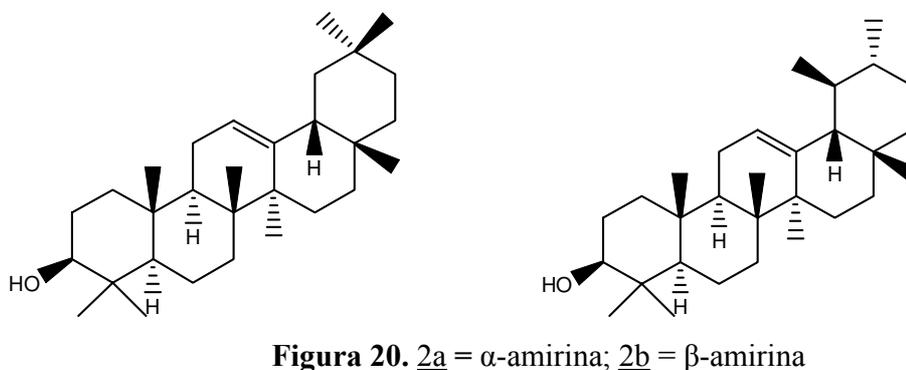
¹⁴⁸ Rullkötter, J., Peakman, T.M., ten Haven, H.L.; *Org. Geochem.* **1994**, 21, 215-233.

¹⁴⁹ Riva, A., Caccialanza, P., Quagliaroli, F.; *Org. Geochem.* **1988**, 13, 671-675.

¹⁵⁰ Alberdi, M., López, L.; *Journal of South American Earth Sciences* **2000**, 13, 751-759.



Dentro deste contexto, os triterpenos* α -amirina (2a) e β -amirina (2b) foram avaliados frente à microbiota anaeróbia (Coleta 1) (Figura 20).



Após 45 dias de incubação a 55°C, observou-se, através de análises de CG-EM, resultados que apontavam que o precursor estava sendo biotransformado pelo consórcio anaeróbio (Figura 21).

* Os padrões de α e β -amirina foram obtidos a partir da resina Breu Branco, a qual foi cedida pelo Msc Eduardo Mattoso Ramos de Souza.

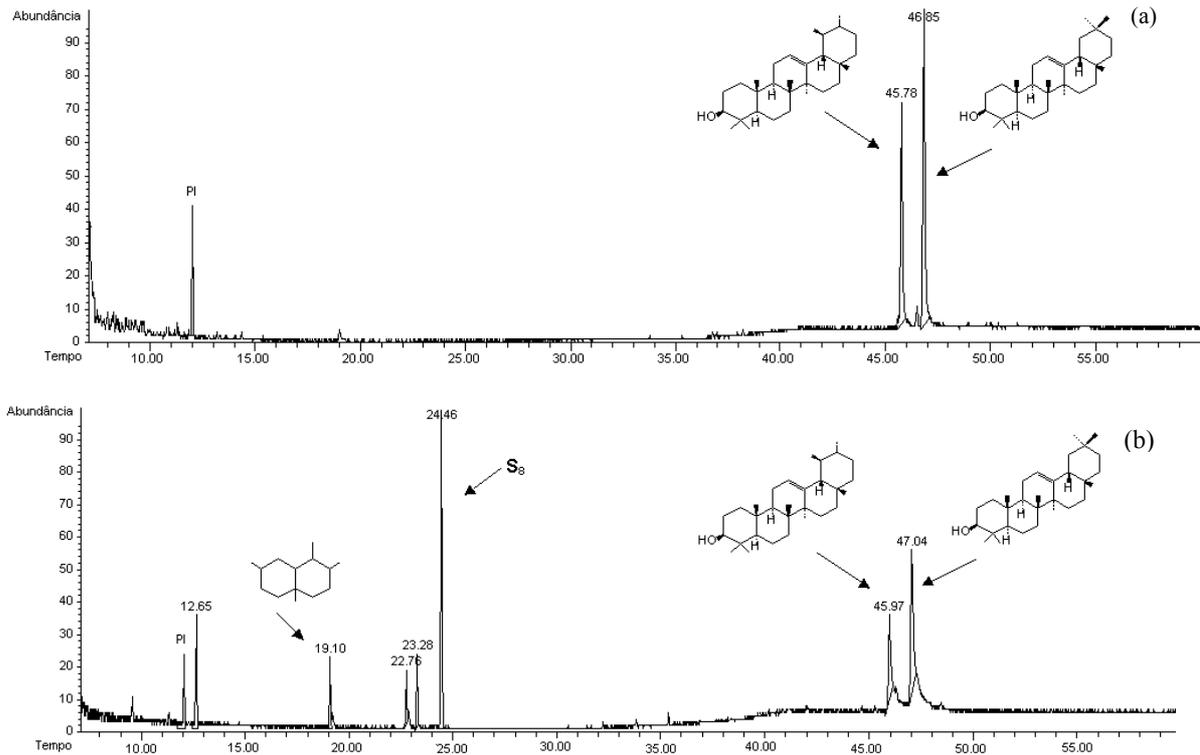


Figura 21. (a) Cromatograma de corrente iônica total da mistura de α e β -amirina em tempo 0. (b) Cromatograma de corrente iônica total da mistura de α e β -amirina frente ao inóculo anaeróbico, após 45 dias de incubação.

Detectou-se 50% de degradação do conteúdo da mistura dos triterpenos adicionados ao meio reacional, observando-se como produtos da biotransformação, um sesquiterpeno do tipo drimano, m/z 123 (Figura 22), além da precipitação de enxôfre (S_8). A detecção de enxôfre (S_8) também corrobora os resultados encontrados no que se refere à presença de *Petrotoga mexicana*¹¹⁰ nos enriquecimentos anaeróbicos obtidos a partir de ambas as coletas de amostras de petróleo do campo Pampo.

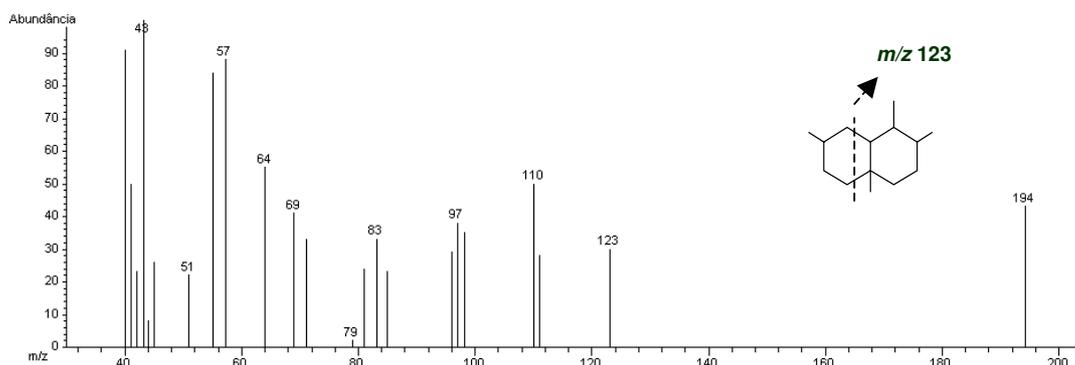


Figura 22. Espectro de massas do drimano rearranjado, obtido a partir da biotransformação anaeróbia de β -amirina.

Os drimanos estão presentes nas amostras geológicas em geral, inclusive aquelas datadas desde o período cambriano, o que descarta a possibilidade de terem sua origem ligada a vegetais superiores. Estes biomarcadores podem ter origem microbiana (Weston *et al.*, 1989)¹⁵¹ ou resultar da biodegradação de hopanos. Os compostos bicíclicos são monitorados em CG-EM através do íon m/z 123 que, para os drimanos, correspondem ao pico-base (Lopes, 1995)¹⁵². No entanto, mesmo não tendo o pico-base de m/z 123, o produto da biotransformação de β -amirina detectado (Figura 22) possui padrão de fragmentação característico de compostos da classe de drimanos, podendo ser considerado como um produto do rearranjo dos mesmos, comparando-se seu espectro de massas a dados da literatura¹⁵².

Não foi possível a avaliação dos biomarcadores frente a culturas anaeróbias puras, pelo fato do isolamento de cepas microbianas a partir dos consórcios anaeróbios não ter sido bem sucedido.

¹⁵¹ Weston, R.J., Philp, R.P., Sheppard, C.M., Woolhouse, A.D.; *Org. Geochem.* **1989**, *14*, 405-421.

¹⁵² Lopes, J.A.D. *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1995.

3.2.2. BIOTRANSFORMAÇÕES AERÓBIAS DE BIOMARCADORES DO PETRÓLEO

O monitoramento da atividade biodegradadora de representantes das espécies bacterianas aeróbias obtidas no presente estudo, foi realizado com o intuito de avaliar a atuação de cada cepa isolada sobre compostos presentes no petróleo, tanto em misturas, quanto isoladamente, onde foram adotadas 3 abordagens distintas, de forma a investigar as preferências microbianas a determinados biomarcadores e a existência de uma interação simbiótica entre bactérias aeróbias e anaeróbias do campo Pampo atuante nos mecanismos de biotransformação do petróleo do mesmo:

- * *Abordagem 1:* Coquetéis de biomarcadores frente à linhagens aeróbias puras;
- * *Abordagem 2:* Linhagens puras frente à um determinado biomarcador;
- * *Abordagem 3:* Sinergismo entre a microbiota aeróbia e anaeróbia na biotransformação de misturas de biomarcadores do petróleo.

Fitano, diidrofenantreno, ácido nonadecanóico, colestano e diidrocolesterol foram selecionados como biomarcadores aos estudos quanto à biotransformação aeróbia, representando classes diferenciadas de compostos presentes no petróleo, ou seja, isoprenóides, aromáticos, ácidos lineares, esteranos e precursor de esteranos, respectivamente (Figura 23).

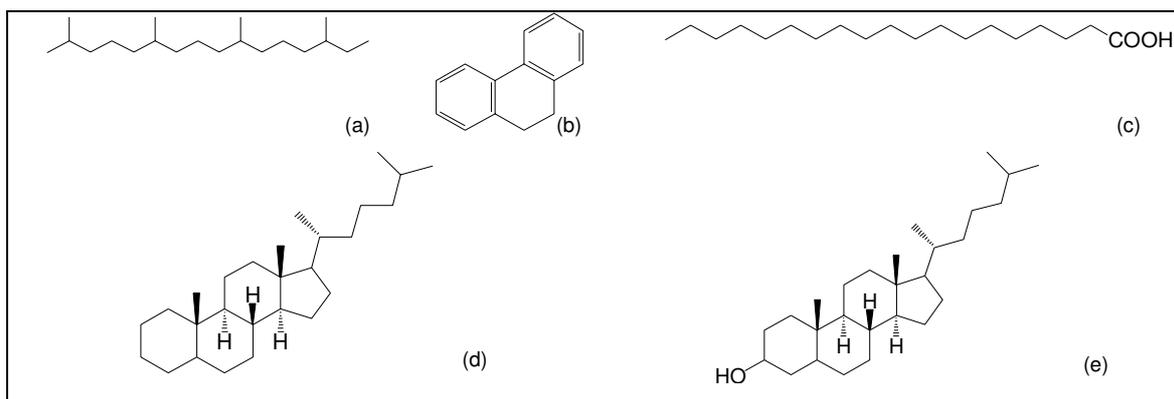


Figura 23. Biomarcadores avaliados quanto à biotransformação anaeróbia: (a) fitano; (b) diidrofenantreno; (c) ácido nonadecanóico; (d) colestano; (e) diidrocolesterol.

3.2.2.1. ABORDAGEM 1

Dentro da Abordagem 1, foram avaliadas duas misturas de biomarcadores, denominados como Coquetel I e Coquetel II, descritos a seguir:

Coquetel I) 9,10-Diidrofenantreno + Fitano + bactérias isoladas

Em ensaios de triagens preliminares realizados (dados não mostrados) para avaliar a capacidade biodegradadora de representantes de cada espécie bacteriana isolada no presente estudo, observou-se que quando adicionava-se uma mistura de hidrocarbonetos (fitano, colestano e diidrofenantreno) e um ácido carboxílico de cadeia longa (ácido nonadecanóico), a grande maioria dos microrganismos apresentava nas análises por CG-EM uma série de ácidos carboxílicos de cadeia longa, os quais poderiam ser derivados da biotransformação do ácido nonadecanóico pelas linhagens, ou da síntese “de novo” de ácidos a partir da biotransformação tanto do ácido nonadecanóico, quanto dos hidrocarbonetos adicionados ao meio reacional ⁵¹. Como forma

rápida de distinguir se as bactérias degradavam o ácido nonadecanóico a ácidos menores ou se estava ocorrendo síntese de novo, forneceu-se a mistura de diidrofenantreno e fitano, avaliando-se a biodegradação de ambos.

Assim, foram selecionadas algumas linhagens que já haviam se sobressaído nos ensaios anteriormente realizados, ou seja, que degradaram hidrocarbonetos, mesmo em presença do ácido carboxílico de cadeia longa no meio: *Bacillus megaterium*, *Microbacterium* sp., *Methylobacterium* sp., *Pseudomonas stutzeri* e *Halomonas* sp.

A Tabela 5 apresenta os valores de biodegradação de ambos os hidrocarbonetos, obtidos após 40 dias de monitoramento por CG-EM.

Tabela 5. Biodegradação de Fitano e Diidrofenantreno

Cepas	Biodegradação de Hidrocarbonetos										Taxas de biodegradação (TB)	
	Índices de Biodegradação (IB)											
	Dia 0		10 dias		20 dias		30 dias		40 dias		A	B
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
<i>B. megaterium</i>	17	12	11	11	14	12	8	8	10	12	41%	ND
<i>Microbacterium</i> sp.	14	13	8	9	6	8	11	8	8	8	44%	36%
<i>Methylobacterium</i> sp.	18	11	18	11	13	11	13	6	6	9	65%	18%
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	14	11	13	11	8	8	6	8	6	9	55%	22%
<i>Halomonas</i> sp.	11	11	9	8	7	8	7	9	8	11	21%	ND

A= diidrofenantreno

B= Fitano

ND = biodegradação não detectada

Os índices de biodegradação foram obtidos a partir da equação 1:

$$IB = I_1 / I_x^{-1}$$

onde:

IB: índice de biodegradação

I₁: áreas do padrão interno de quantificação (pentadecano)

I_x⁻¹: áreas dos biomarcadores durante os diferentes períodos de tempo avaliados

Os valores das taxas de biodegradação foram obtidos através equação 2:

$$TB = [(IB_f \times 100) / IB_i] - 100$$

onde:

TB: taxa de biodegradação

IB_f: índice de biodegradação final do biomarcador

IB_i: índice de biodegradação em tempo 0

Microbacterium sp., uma das bactérias isoladas do consórcio de água de formação de petróleo (Coleta 1), degradou 44% do diidrofenantreno e 36% do fitano, em 40 dias, apresentando o melhor resultado frente ao biomarcador isoprenóide. Não foram detectados os produtos da biodegradação de ambos os biomarcadores, pela bactéria avaliada (Figura 24). É conhecido que bactérias podem incorporar, mas não biotransformar hidrocarbonetos, utilizando-os posteriormente como fontes de carbono à síntese de suas paredes celulares ou produção de emulsificantes⁶³.

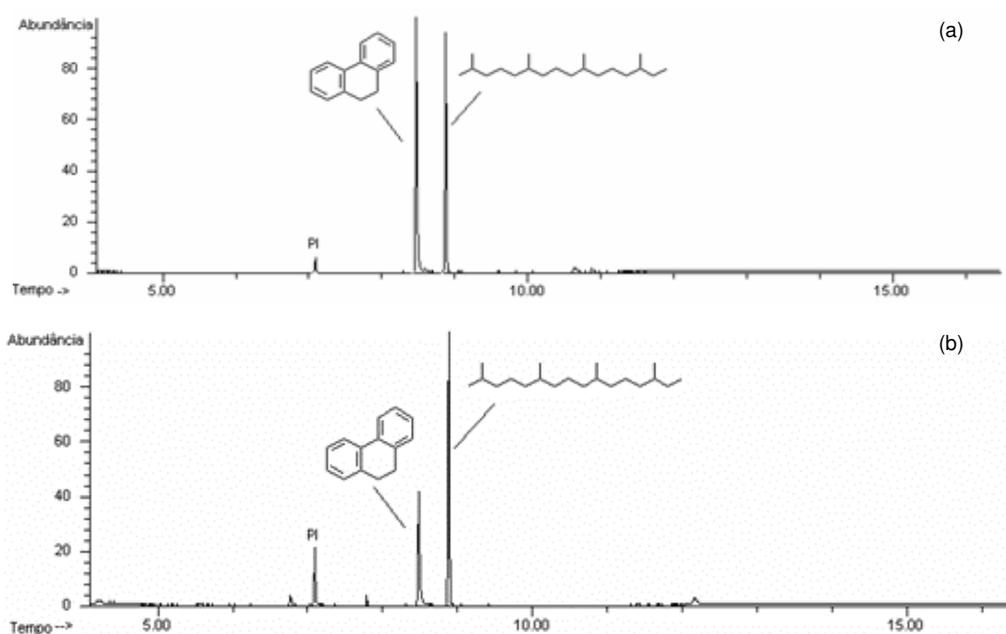


Figura 24. (a) Cromatograma de corrente iônica total do diidrofenantreno e fitano (tempo 0). PI = padrão interno de quantificação. (b) Cromatograma de íons totais dos biomarcadores após 32 dias sob ação do *Microbacterium sp.*

Torna-se importante ressaltar que *Methylobacterium sp.*, uma bactéria isolada de amostra de óleo biodegradado, apresentou o melhor resultado quanto à biodegradação de diidrofenantreno (65%), resultado este inédito na literatura no que se refere ao comportamento desta linhagem frente aos hidrocarbonetos avaliados como fontes de carbono. Observou-se, após 20 dias de monitoramento dos experimentos, a presença de um composto de m/z 309

(tempo de retenção 9,05 minutos), como produto da biotransformação do diidrofenantreno. Este composto possui fragmentação semelhante à morfina, mas não pôde ser isolado e identificado, em virtude de ter sido detectado em quantidades traço (Figura 25).

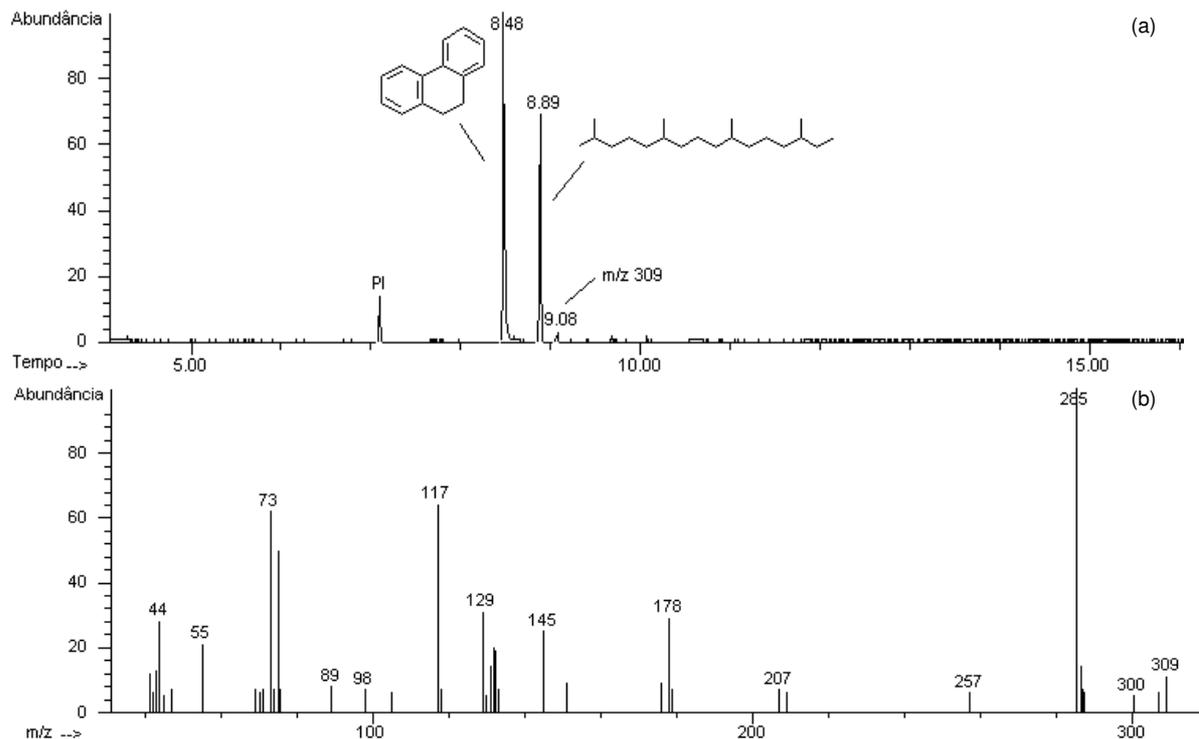


Figura 25. (a) Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores após 20 dias de monitoramento. PI = padrão interno de quantificação. (b) Espectro de massas do composto de m/z 309, detectado após 20 dias de incubação dos biomarcadores junto à *Methylobacterium* sp.

Pseudomonas stutzeri e *Bacillus megaterium* seguiram a mesma tendência dos demais microrganismos descritos, ou seja, a preferência pelo composto aromático (Figuras 26 e 27). Foram detectados ácidos carboxílicos de cadeia longa, como produtos da biotransformação dos hidrocarbonetos avaliados, frente ao *Bacillus megaterium*. Estes ácidos foram metilados (item 5.2.2, Parte Experimental) previamente às análises cromatográficas, motivo pelo qual são descritos como metil ésteres, nos cromatogramas (Figura 27). É conhecido que microrganismos podem metabolizar hidrocarbonetos para a

síntese de suas paredes celulares, cuja base são lipídeos (Bouloubassi *et al*, 2006)¹⁵³, podendo-se pressupor sobre a capacidade de degradação total do diidrofenantreno e produção de ácidos graxos, porém experimentos com fenantreno marcado seriam necessários para a comprovação deste fenômeno.

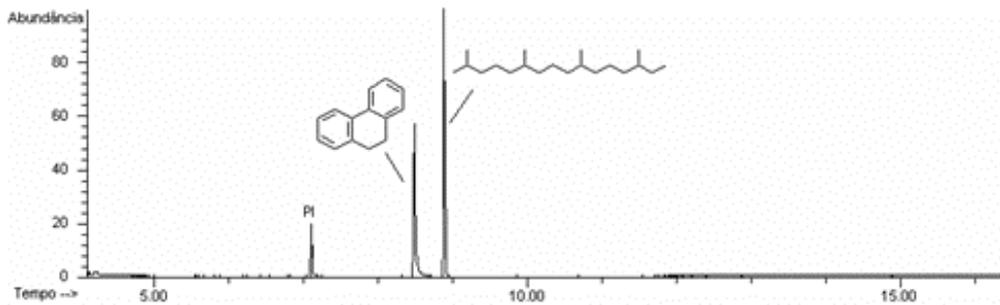


Figura 26. Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores após 35 dias sob ação da *Pseudomonas stutzeri*.

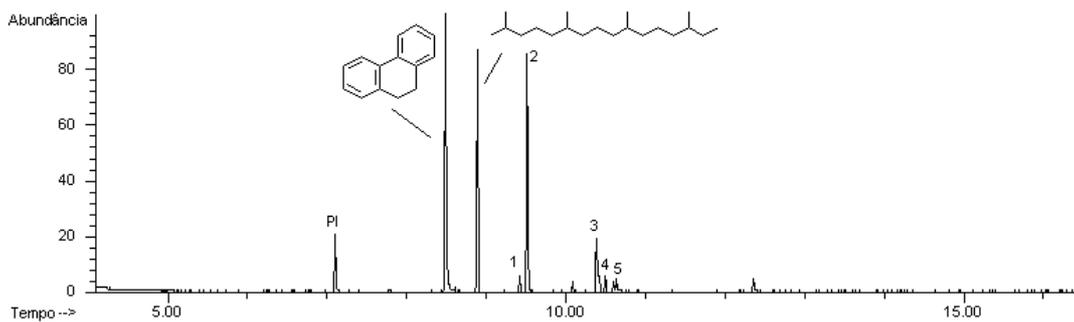


Figura 27. Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores após 40 dias sob ação do *Bacillus megaterium*. PI = padrão interno de quantificação. Ácidos carboxílicos de cadeia longa detectados como ésteres metílicos: 1= 9-hexadecenoato de metila; 2= hexadecanoato de metila; 3= 9-octadecenoato de metila; 4= octadecanoato de metila; 5= 9, 12 octadecadienoato de metila.

Os produtos da biodegradação do diidrofenantreno não foram detectados. Acredita-se que a linhagem de *Pseudomonas stutzeri*, assim como, *Microbacterium* sp., também tenha promovido a incorporação dos hidrocarbonetos e não sua biotransformação, uma vez que os produtos da degradação de ambos os compostos adicionados, não foram observados.

¹⁵³ Bouloubassi, I., Aloisi, G., Pancost, R.D., Hopmans, E., Pierre, C., Sinninghe Damsté, J.S.; *Org. Geochem.* **2006**, no prelo.

A bactéria *Halomonas* sp. é descrita como halofílica moderada¹¹⁶, o que pode justificar sua baixa atividade biodegradadora sobre ambos os biomarcadores avaliados (21% de degradação de diidrofenantreno e, 2% de fitano), ou seja, o meio reacional utilizado (meio Zinder modificado) não foi adicionado de NaCl em sua composição, alterando o metabolismo microbiano sobre os substratos avaliados. Propõe-se como consideração a novos estudos, a adição de sal ao meio reacional, como forma de potencializar a atividade microbiana degradadora. Novamente, ácidos carboxílicos de cadeia longa foram detectados como produtos do metabolismo microbiano (Figura 28).

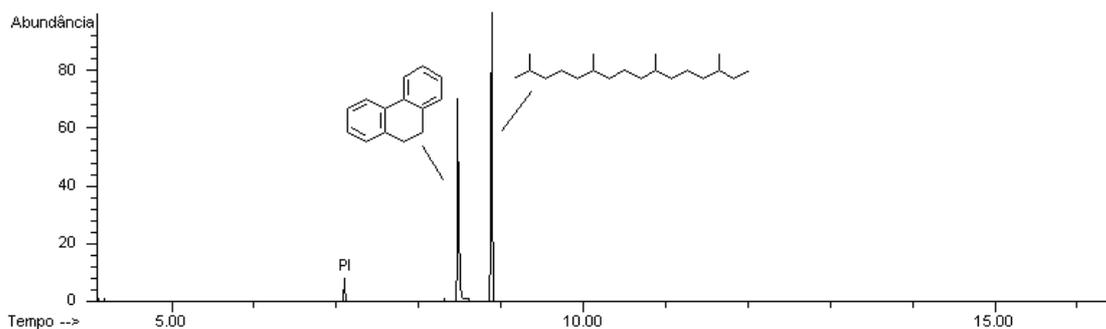


Figura 28. Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores após 35 dias sob ação da *Halomonas* sp.

Através dos resultados apresentados, pôde-se verificar que diidrofenantreno foi o hidrocarboneto preferido para degradação de todas as linhagens avaliadas, o que também é confirmado por relatos da literatura, os quais descrevem sobre a habilidade de bactérias de ambiente marinho a degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) (Balashova *et al.*, 1999)¹⁵⁴. Tais compostos são persistentes quando dispostos no ambiente, onde sua alta carcinogenicidade, mutagenicidade e toxicidade são alvos de vários

¹⁵⁴ Balashova, N. V., Kosheleva, I. A., Golovchenko, N. P., Boronin, A. M.; *Proc. Biochem.* **1999**, *35*, 291-296.

estudos que buscam sua eliminação através de microrganismos que os utilizem como fontes de carbono e energia (Tam *et al.*, 2002)¹⁵⁵.

Por outro lado, as bactérias avaliadas são bem descritas como produtoras de biosurfactantes (Scheibenbogen *et al.*, 1994¹⁵⁶; Verhoef *et al.*, 2003¹⁵⁷), os quais aumentam o contato dos hidrocarbonetos às células, promovendo assim um aumento da solubilidade do mesmo e maior facilidade à biodegradação (Syakti *et al.*, 2004)¹⁵⁸. Finalmente pode-se sugerir que as linhagens investigadas poderiam ser importantes ferramentas para a biorremediação de locais contaminados por PAHs.

Coquetel II) 9,10-Diidrofenantreno + Fitano + Ácido Nonadecanóico + 5 α -Colestano) + Microrganismos Isolados

De forma a constatar a real preferência microbiana a hidrocarbonetos ou compostos oxigenados, optou-se pela investigação de linhagens, as quais em ensaios preliminares realizados haviam apresentado habilidade à biotransformação tanto de hidrocarbonetos quanto de ácidos carboxílicos de cadeia longa.

O coquetel de biomarcadores do petróleo foi avaliado frente às seguintes bactérias do petróleo: *Micrococcus* sp., *Dietzia* sp., *Pseudomonas stutzeri*, *Brevibacillus* sp., *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus* sp. e *Bacillus subtilis*.

¹⁵⁵ Tam, N.F.Y.; Guo, C.L.; yau, W.Y.; wong, y.S.; *Mar. Poll. Bull.* **2002**, *45*, 316-324.

¹⁵⁶ Scheibenbogen, K.; Zytner, R.G.; Lee, H.; Trevors, J.T.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1994**, *59*, 53-59.

¹⁵⁷ Verhoef, R.; de Waard, P.; Schols, H.A.; Siika-Aho, M.; voragen, A.G.J.; *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 1851-1859

¹⁵⁸ Syakti, A.D.; Acquaviva, M.; Gilewicz, M.; Doumenq, P.; Bertrand, J.C.; *Environ. Res.* **2004**, *96*, 228-234.

As Figuras 29 a 32, apresentam os perfis de biodegradação de cada biomarcador, obtidos no decorrer de 40 dias de monitoramento por CG-EM.

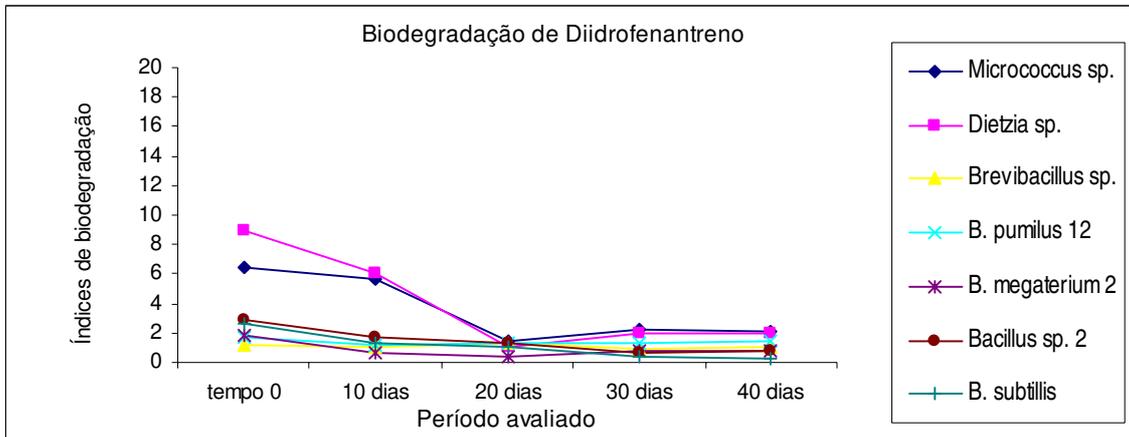


Figura 29. Perfis de biodegradação do **diidrofenantreno** por bactérias aeróbias.

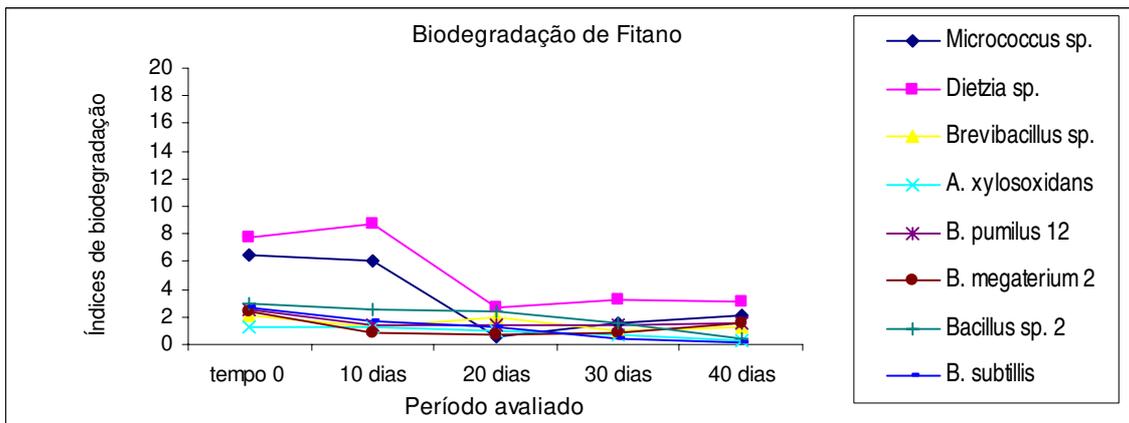


Figura 30. Perfis de biodegradação do **fitano** por bactérias aeróbias.

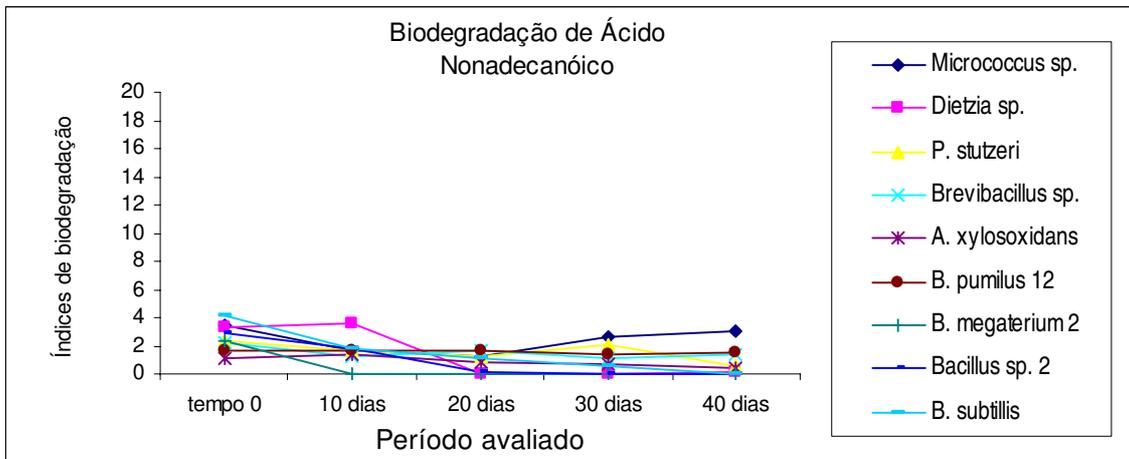


Figura 31. Perfis de biodegradação do **ácido nonadecanóico** por bactérias aeróbias.

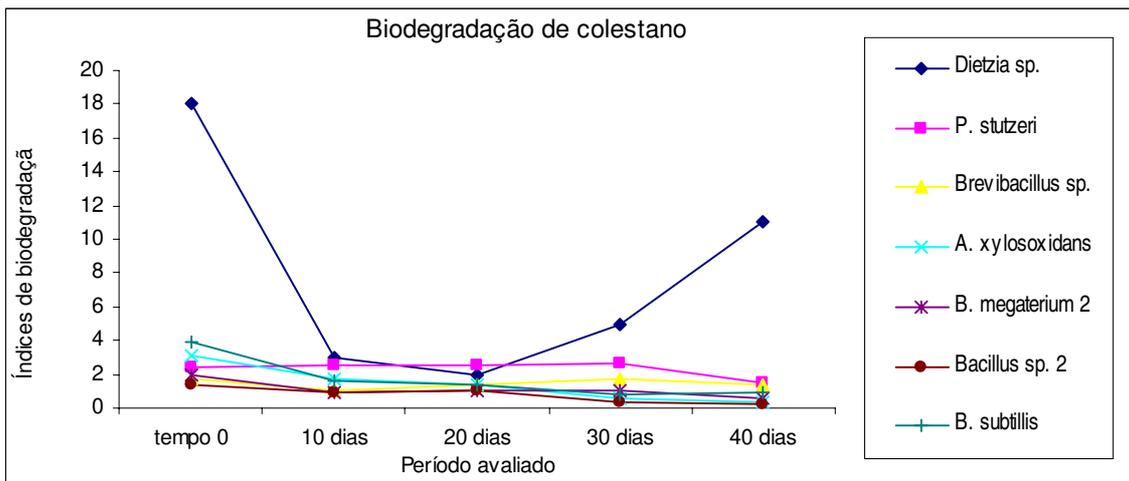


Figura 32. Perfis de biodegradação do **5 α -colestano** por bactérias aeróbias.

Comparando-se as Figuras 29 a 32, pode-se verificar a grande oscilação entre as curvas de degradação microbiana do ácido nonadecanóico, em relação aos demais biomarcadores avaliados. Isto ocorre pelo fato de que as bactérias são capazes tanto de biotransformar o ácido graxo a outros ácidos de cadeias menores, maiores e/ou ramificadas, assim como produzi-lo a partir da

biotransformação dos hidrocarbonetos, também adicionados ao meio reacional.

A Tabela 6 apresenta os valores de biodegradação obtidos após 40 dias de avaliação dos biomarcadores frente às bactérias representantes da microbiota aeróbia do campo Pampo.

Tabela 6. Taxas de biodegradação dos biomarcadores pelas linhagens aeróbias

Linhagens	Biomarcadores (taxas de biodegradação*)			
	Diidrofenantreno	Fitano	Ácido Nonadecanóico	5 α -Colestano
<i>Micrococcus</i> sp.	68%	68%	14%	ND
<i>Dietzia</i> sp.	78%	60%	97%	39%
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	ND	ND	75%	38%
<i>Brevibacillus</i> sp.	10%	38%	38%	17%
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	ND	76%	67%	89%
<i>Pseudomonas</i> sp.	ND	ND	ND	ND
<i>Bacillus pumilus</i> 12	17%	40%	13%	ND
<i>Bacillus megaterium</i> 2	57%	33%	100%	70%
<i>Bacillus</i> sp. 2	70%	85%	100%	87%
<i>Bacillus subtilis</i>	92%	92%	100%	76%

*: taxas de biodegradação calculadas aplicando-se as equações 1 e 2, já descritas (Tabela 5).

ND: Valores de biodegradação não detectados.

Valores em negrito: melhores taxas de biodegradação de cada biomarcador.

As lacunas apresentadas como ND, referem-se a microrganismos que não foram hábeis a biodegradar os compostos em questão, ou seja, não diminuíram a concentração final dos mesmos, durante o período avaliado. Entretanto, no caso da *Pseudomonas* sp., isto não significa que a bactéria não foi hábil a biotransformar estes biomarcadores no decorrer dos experimentos,

uma vez que investigando-se os cromatogramas durante o período avaliado, observou-se a presença de ácidos carboxílicos de cadeia longa (Figura 33), no meio reacional. Acredita-se que tenha havido períodos alternados de biotransformação dos compostos adicionados ao meio e produção de ácidos graxos. Seria como um mecanismo de defesa microbiana, ou seja, a bactéria incorpora compostos que lhe são tóxicos, com o intuito de biotransformá-los a compostos passíveis de serem metabolizados. Bactérias do gênero *Pseudomonas* sp., são conhecidas pela capacidade de emulsificar óleos, o que torna os hidrocarbonetos e demais compostos presentes no petróleo, acessíveis à biodegradação por outras linhagens^{49,50,65,125}, fato este que poderia justificar também a excreção de ácidos carboxílicos de cadeia longa ao meio reacional e incorporação dos hidrocarbonetos investigados. Todas as alíquotas extraídas dos experimentos para a avaliação por CG-EM, foram previamente metiladas (item 5.2.3, Parte Experimental), motivo pelo qual os ácidos são descritos como metil ésteres, nos cromatogramas.

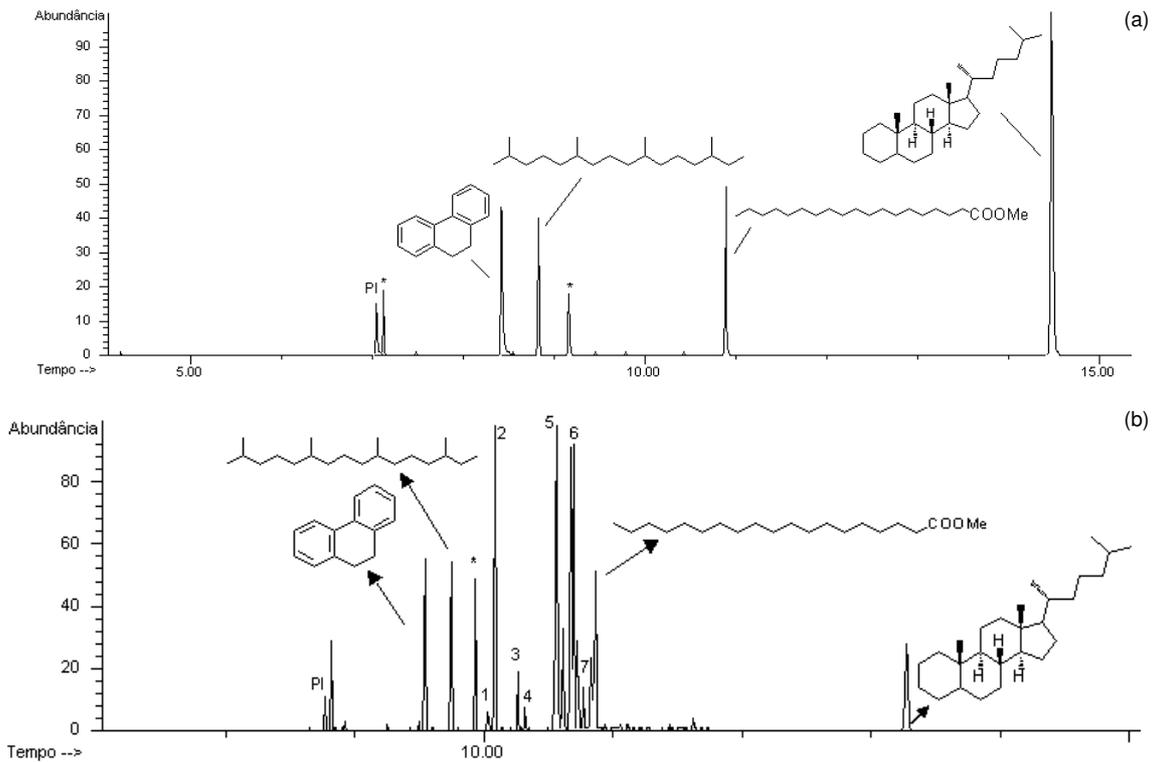


Figura 33. (a) Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, em tempo 0. PI= padrão interno (pentadecano). * = contaminantes ou compostos não identificados. (b) Cromatograma de íons totais dos biomarcadores, após 35 dias da inoculação de *Pseudomonas sp.* Ácidos carboxílicos de cadeia longa detectados como ésteres metílicos: 1= 9-hexadecenoato de metila; 2= hexadecanoato de metila; 3= 2-metil, hexadecanoato de metila; 4= 2 hexil, ciclopropanooctanoato de metila; 5= 9-octadecenoato de metila; 6= 9,12-octadecadienoato de metila; 7= 2-metil, 9,12-octadienoato de metila

Os valores de degradação de diidrofenantreno e fitano não foram determinados para *Pseudomonas stutzeri*, quando utilizou-se o coquetel II de biomarcadores do petróleo, fato este que confirma os resultados obtidos por análises preliminares realizadas, onde a adição de ácido de cadeia longa ao meio reacional, gerava tendência à mesma bactéria, a não biotransformação dos hidrocarbonetos, fitano e diidrofenantreno. Assim, uma série de ácidos graxos, foram detectados como produtos do metabolismo do ácido nonadecanóico (Figura 34). Entretanto, *Pseudomonas stutzeri* demonstrou habilidade à biotransformação do 5 α -colestano à um composto de m/z 386,

com fragmentação bastante semelhante à 5α -colestano-2-ona (Carreira *et al.* 2001)¹⁵⁹, o qual foi detectado no período em que determinou-se a queda de abundância do esterano no meio reacional (Figuras 34 e 35). A confirmação deverá ser realizada futuramente, através da injeção e comparação com padrões da cetona.

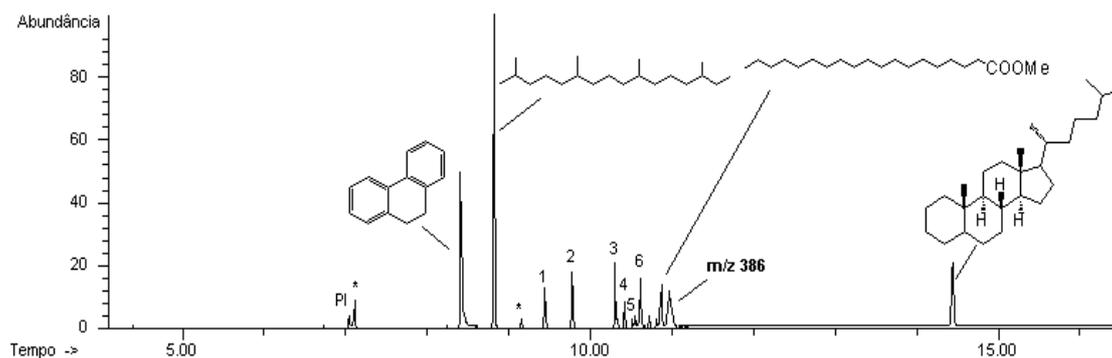


Figura 34. Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 40 dias da inoculação da *Pseudomonas stutzeri*. PI= padrão interno (pentadecano). * = contaminantes ou compostos não identificados. Ácidos carboxílicos de cadeia longa detectados como ésteres metílicos: 1= hexadecanoato de metila; 2= 2-metil, hexadecanoato de metila; 3= 9-octadecenoato de metila; 4= octadecanoato de metila; 5= 9,12 octadecadienoato de metila; 6= 2-metil, octadecanoato de metila.

¹⁵⁹ Carreira, R., Wagener, A. L. R., Fileman, T., Readman, J. W.; *Quím. Nova* **2001**, 24(1), 37-42.

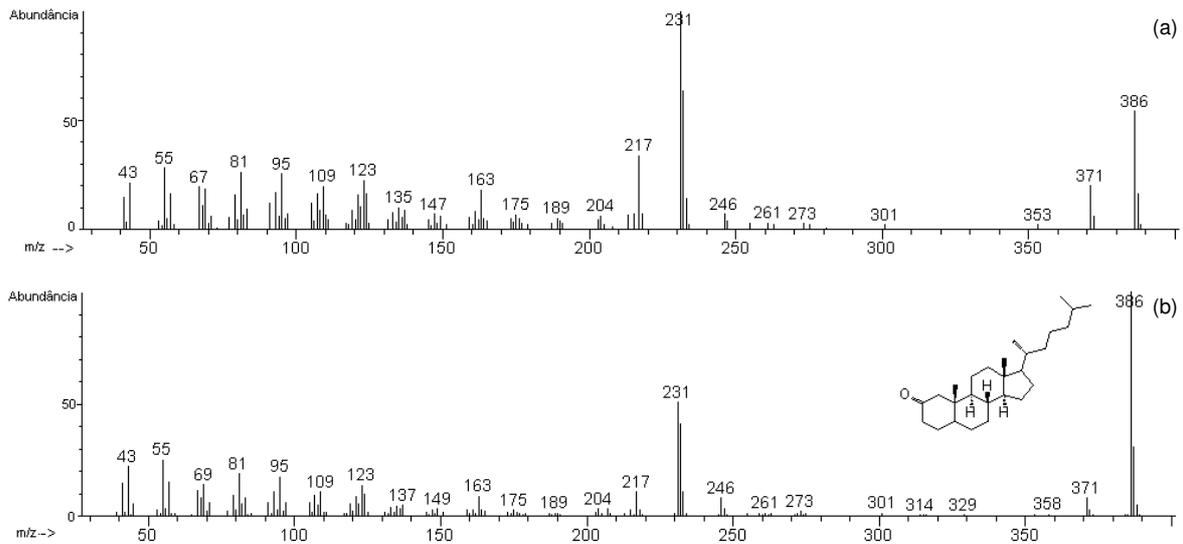


Figura 35. (a) Espectro de massas do metabólito (m/z 386) produzido por *Dietzia sp* e *Pseudomonas stutzeri*. (b) Espectro de massas da 5α -colestano-2-ona descrito pela biblioteca Wiley 275.

O mesmo composto, 5α -colestano-2-ona, também foi detectado como, produto da biotransformação do 5α -colestano por *Dietzia sp*. (Figura 36), ao décimo dia de incubação do coquetel de biomarcadores junto à bactéria. A detecção de 5α -colestano-2-ona nos cromatogramas de *Dietzia sp*. também foi precedida pela diminuição da abundância relativa do esterano no meio reacional. É conhecido pela literatura que alguns organismos procariotos são hábeis a produzirem esteróis⁹³. A oxidação de esteranos poderá gerar uma explicação à formação de alquil esteranos em reservatórios, indo de encontro às teorias sobre a origem biológica de tais compostos.

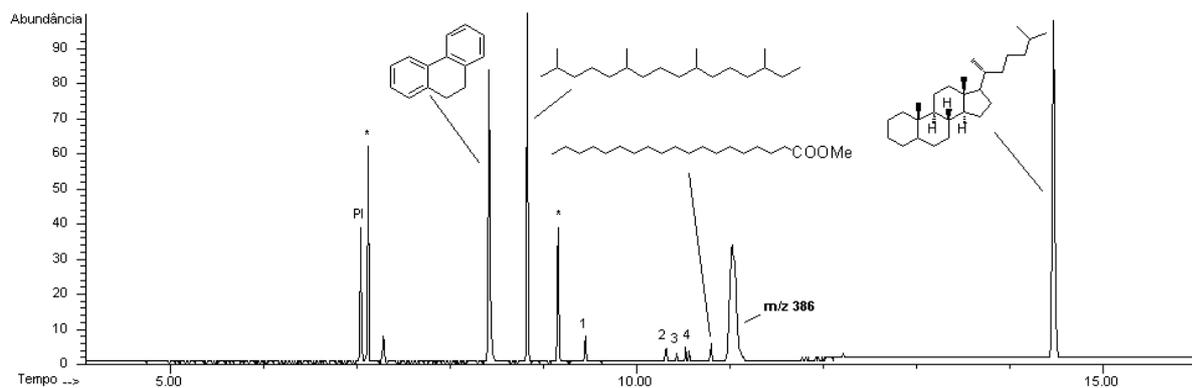


Figura 36. Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 10 dias da inoculação da *Dietzia sp.* PI= padrão interno (pentadecano). * = contaminantes. Ácidos carboxílicos de cadeia longa detectados como ésteres metílicos : 1= hexadecanoato de metila; 2= 9-octadecenoato de metila; 3= octadecanoato de metila; 4= 9,12 octadecadienoato de metila.

A bactéria *Dietzia sp.* degradou não somente o colestano (39%), mas também o diidrofenantreno, o fitano e o ácido nonadecanóico, em níveis acima de 50%. Foi detectada uma série de ácidos carboxílicos de cadeia longa, como produtos do metabolismo microbiano destes biomarcadores.

Bacillus pumilus 12, por sua vez, apresentou índices de degradação baixos se comparados aos demais microrganismos avaliados, sendo que o colestano não foi biodegradado pela bactéria. No entanto, após 35 dias de monitoramento por análises de CG-EM, o composto de m/z 382, semelhante ao padrão de fragmentação do acetato de 24-cetocolesterila, foi detectado em quantidades traço. Novamente, ácidos de cadeia longa apresentaram-se como produtos majoritários de degradação dos demais biomarcadores avaliados (Figura 37).

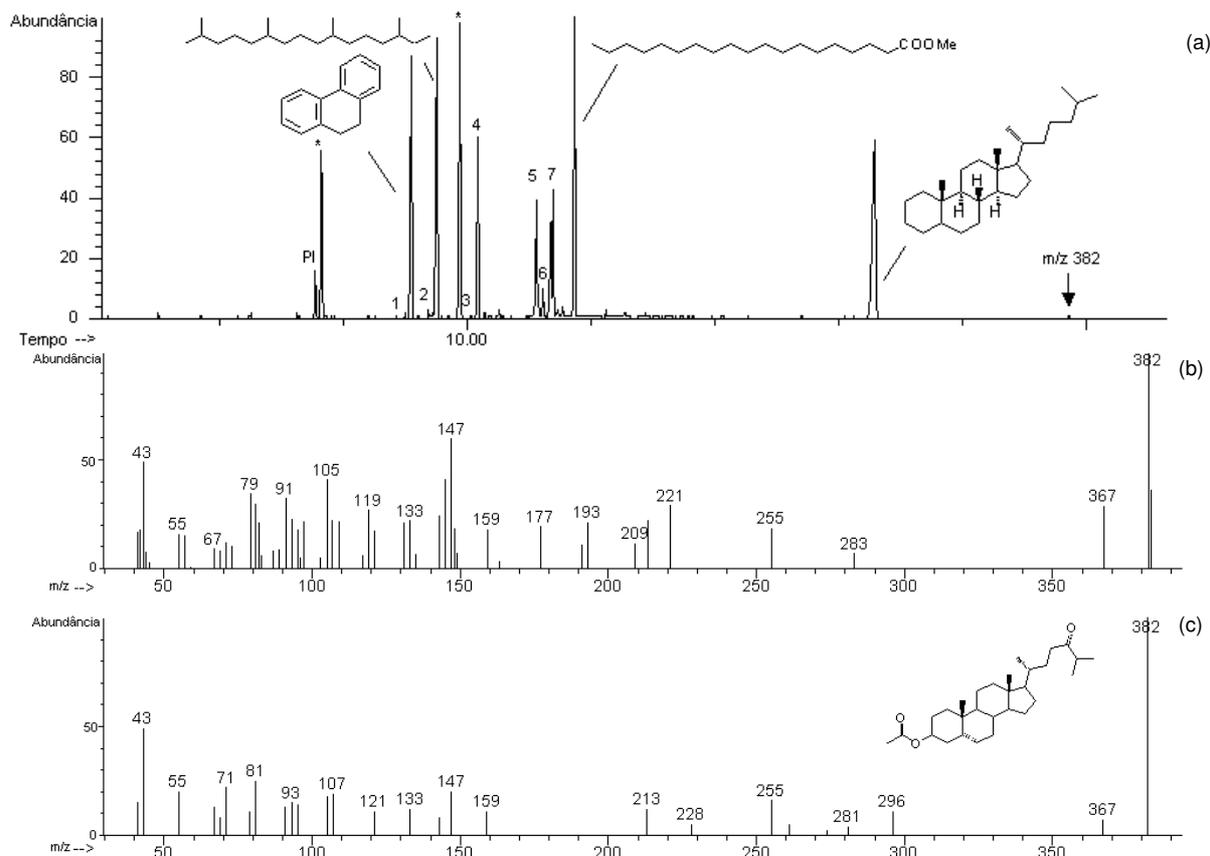


Figura 37. (a) Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 35 dias da inoculação de *Bacillus pumilus* 12. PI= padrão interno (pentadecano). * = contaminantes. Ácidos carboxílicos de cadeia longa detectados como ésteres metílicos: 1= ácido tetradecanóico metil éster; 2= pentadecanoato de metila; 3= 12- metil, tetradecanoato de metila; 4= hexadecanoato de metila; 5= 9-octadecenoato de metila; 6= octadecanoato de metila; 7= 9,12-octadecadienoato de metila. (b) Espectro de massas do composto de m/z 382. (c) Espectro de massas do acetato de 24-cetocolesterila descrito pela biblioteca Wiley 275.

Achromobacter xylosoxidans, não degradou diidrofenantreno, entretanto, apresentou o melhor índice de biodegradação do colestano (89%). É importante ressaltar que esteróis, tais como colesterois e fitoesteróis, são bem documentados pela literatura como passíveis de biodegradação por uma grande gama de microrganismos (Yan *et al.*, 2000)¹⁶⁰, no entanto, esteranos não têm sido descritos como substratos de escolha microbiana. Fitano e ácido

¹⁶⁰ Yan, J-L., Lee, S-S., Wang, k. C. *Steroids* **2000**, *65*, 863-870.

nonadecanóico também foram degradados e biotransformados pela linhagem, novamente detectando-se ácidos carboxílicos de cadeia longa como produtos do metabolismo microbiano, após 35 dias de monitoramento (Figura 38). Os resultados obtidos, no decorrer de todo o estudo, indicam que o metabolismo microbiano de hidrocarbonetos ocorre por reações que envolvam oxidações, quebras de ligações carbono-carbono e formação de novas ligações (ácidos ramificados), ou ainda, pela simples incorporação dos hidrocarbonetos nas paredes celulares microbianas.

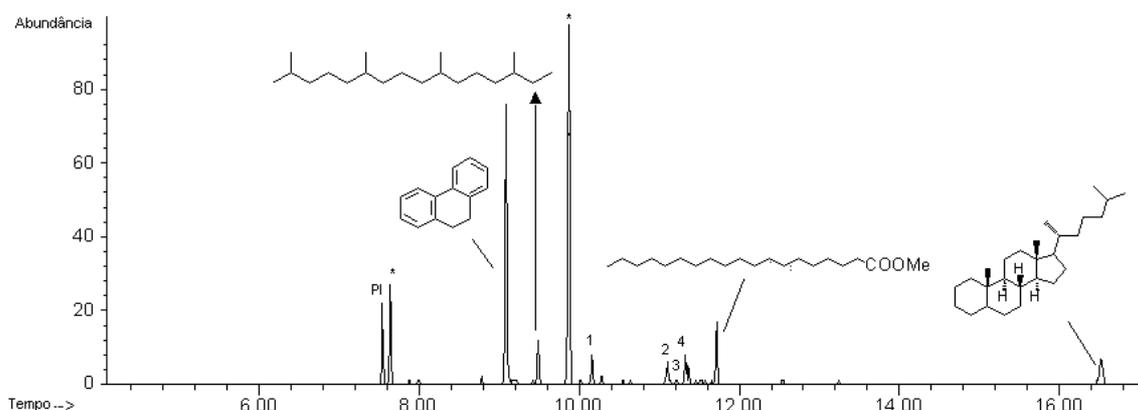


Figura 38. Cromatograma de corrente iônica total da mistura de biomarcadores, após 35 dias da inoculação de *Achromobacter xylosoxidans*. PI= padrão interno (pentadecano). * = contaminantes. Ácidos carboxílicos de cadeia longa detectados como ésteres metílicos: 1= hexadecanoato de metila; 2= 9-octadecenoato de metila; 3= octadecanoato de metila; 4= 9,12 octadecadienoato de metila.

Diidrofenantreno e fitano foram os substratos de escolha da bactéria *Micrococcus* sp., a qual degradou ambos os biomarcadores nas mesmas taxas (68%) (Figura 39). Entretanto, *Micrococcus* sp. não degradou colestano, tendo sido observado aumento da concentração do mesmo no meio reacional. Este aumento foi atribuído à síntese de novo do mesmo a partir da degradação dos demais hidrocarbonetos presentes no meio. Em ensaios preliminares realizados para a avaliação de outras linhagens também isoladas de águas de formação, determinou-se que a presença de ácido nonadecanóico no coquetel

poderia favorecer uma preferência bacteriana a adotá-lo como substrato. No entanto, pôde-se verificar que tanto a linhagem de *Bacillus pumilus*, quanto a de *Micrococcus* sp., avaliadas, apresentaram as menores taxas de biodegradação do ácido carboxílico de cadeia longa. Torna-se importante ressaltar que tanto *Bacillus pumilus*, quanto *Micrococcus* sp., são bactérias descritas pela literatura como presentes em ambientes contendo hidrocarbonetos, ou em locais acometidos por derramamentos de petróleo, sendo que tais linhagens são conhecidas pela sua formação de biofilmes e emulsificação de hidrocarbonetos, tornando-os mais acessíveis à biodegradação^{52,53,69}. Estes relatos, aliados aos resultados que obtivemos com relação à produção de bioemulsificantes por tais bactérias, serão melhor discutidos no Capítulo 3, deste trabalho.

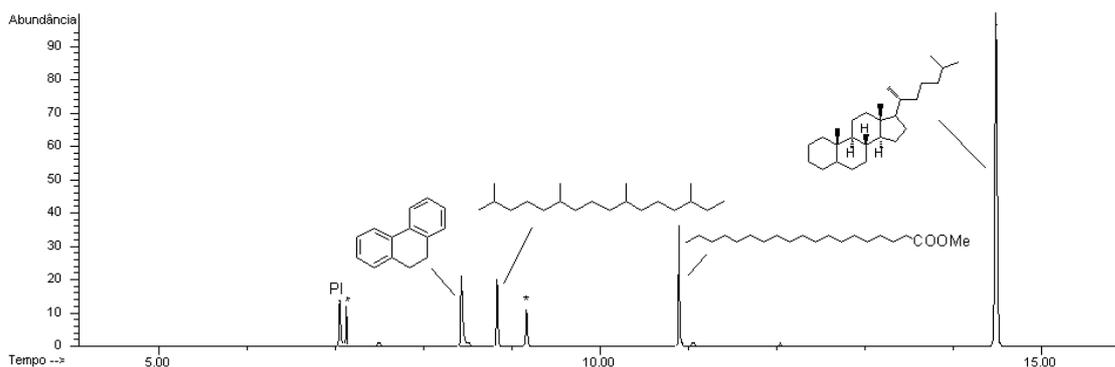


Figura 39. Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 20 dias da inoculação da *Micrococcus* sp. PI= padrão interno (pentadecano). * = contaminantes.

A bactéria *Brevibacillus* sp apresentou as menores taxas de degradação para todos os hidrocarbonetos avaliados, selecionando ácido nonadecanóico como substrato de escolha. Detectou-se traços de colestano m/z 386, após 15 dias de monitoramento, que podem ser indícios de biodegradação do colestano (Figura 40). Ácidos carboxílicos de cadeia longa, novamente, prevaleceram como produtos do metabolismo microbiano. Mesmo tendo sido uma linhagem recuperada a partir de amostra de óleo biodegradado,

a bactéria *Brevibacillus* sp., não degradou os hidrocarbonetos avaliados, podendo corresponder às espécies, descritas pela literatura, como tolerantes a tais compostos, mas não metabolizadoras dos mesmos, podendo sobreviver à custa dos metabólitos produzidos por outros microrganismos, quando em consórcio¹²⁴.

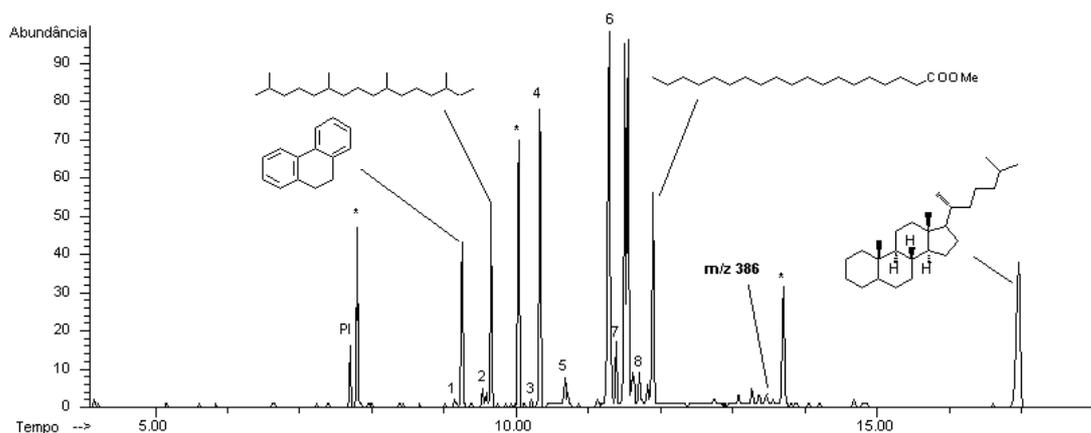


Figura 40. Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 30 dias da inoculação de *Brevibacillus* sp. PI= padrão interno (pentadecano). * = contaminantes ou compostos não identificados. Ácidos carboxílicos de cadeia longa detectados como ésteres metílicos: 1= tetradecanoato de metila; 2= pentadecanoato de metila; 3= 9-hexadecenoato de metila; 4= hexadecanoato de metila; 5= 2-metil, hexadecanoato de metila; 6= 9-octadecenoato de metila; 7= octadecanoato de metila éster; 8= 9,12-octadecadienoato de metila.

Bacillus sp. 2, *Bacillus megaterium* 2 e *Bacillus subtilis* apresentaram excelentes índices de biodegradação do ácido nonadecanóico (100%). O mesmo ocorreu para os hidrocarbonetos, sendo que *Bacillus subtilis* sobressaiu-se tanto no metabolismo de diidrofenantreno, quanto de fitano.

O colestano foi biodegradado em 76% por *Bacillus subtilis*, mas os produtos formados não foram detectados. Até mesmo, ácidos graxos formados foram metabolizados pela linhagem após 35 dias de monitoramento (Figura 41).

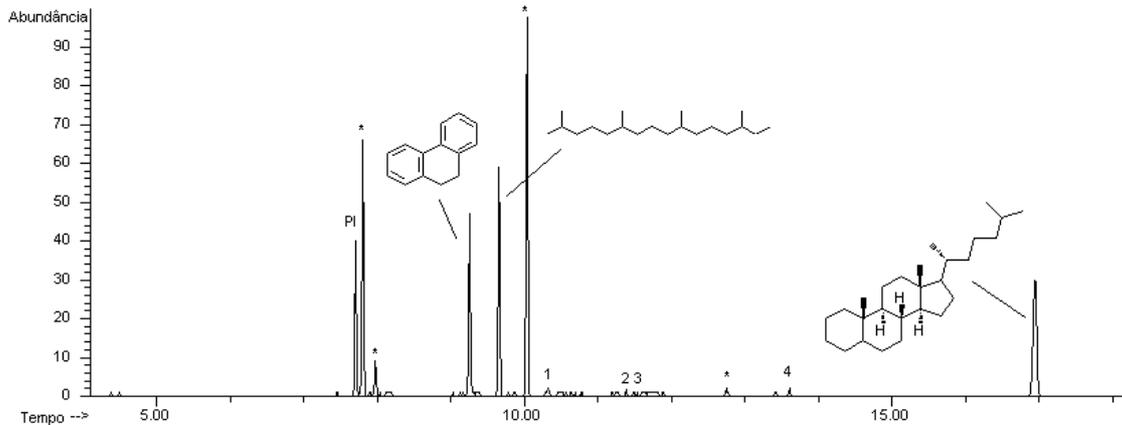


Figura 41. Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 25 dias da inoculação de *Bacillus subtilis*. PI= padrão interno (pentadecano). * = contaminantes. Ácidos carboxílicos de cadeia longa detectados como ésteres metílicos: 1= hexadecanoato de metila; 2= 9-octadecenoato de metila; 3= octadecanoato de metila; 4= docosanoato de metila.

Bacillus sp. 2, apresentou taxas acima de 80% de biodegradação de colestano e fitano, enquanto diidrofenantreno foi depletado em 70%, índices estes que podem apresentar a linhagem como degradadora de hidrocarbonetos pertencentes às três classes avaliadas, isoprenos, esteranos e aromáticos (Figura 42).

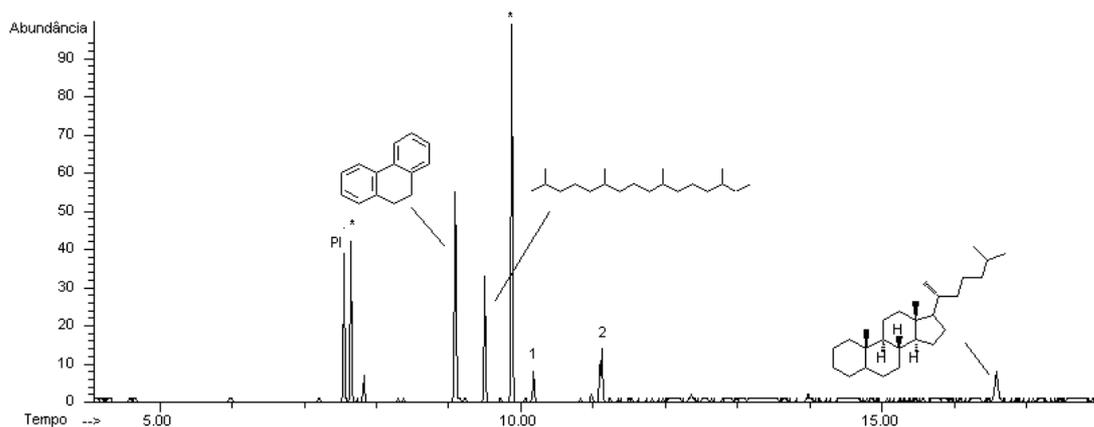


Figura 42. Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 35 dias da inoculação de *Bacillus* sp. PI= padrão interno (pentadecano). * = contaminantes. Ácidos carboxílicos de cadeia longa: 1= hexadecanoato de metila; 2= 9,12 octadecadienoato de metila.

Bacillus megaterium 2, se comparado à *Bacillus* sp. 2 e *Bacillus subtilis*, apresentou valores mais moderados de degradação dos hidrocarbonetos, no entanto, seu potencial biotransformador não deve ser ignorado, uma vez que, além dos ácidos carboxílicos de cadeia longa, também detectou-se a presença de 5 α -colestano-2-ona (m/z 386), a qual pode ser proveniente da oxidação do colestano pela linhagem (Figura 43). A oxidação de metilenos não ativados de esteranos é bastante conhecida, sendo realizada por oxidases do tipo P-450 de diversos organismos, incluindo bactérias do gênero *Bacillus* (Urlacher *et al.*, 2004)¹⁶¹.

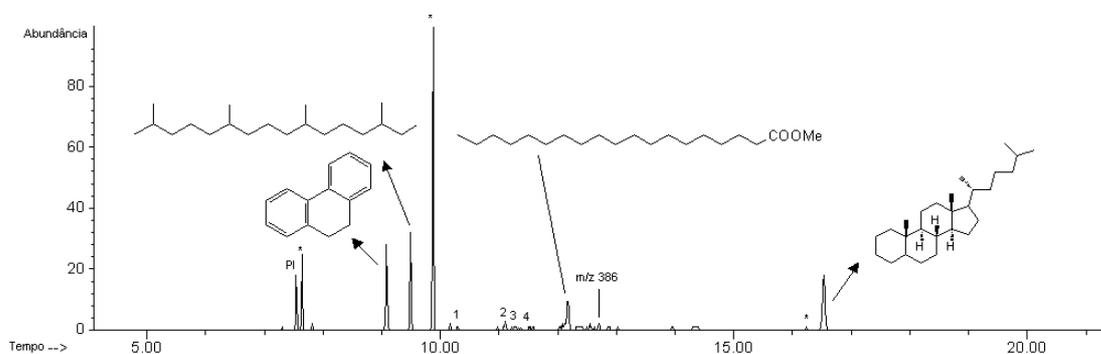


Figura 43. (a) Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 30 dias da inoculação de *Bacillus megaterium* 2. PI= padrão interno (pentadecano). * = contaminantes. Ácidos carboxílicos de cadeia longa detectados como ésteres metílicos: 1= hexadecanoato de metila; 2= 9-octadecenoato de metila; 3= octadecanoato de metila; 4= 9,12 octadecadienoato de metila.

Como característica comum dos cromatogramas obtidos a partir da degradação microbiana dos biomarcadores avaliados pôde-se verificar a presença majoritária de ácidos carboxílicos de cadeia longa, como produtos do metabolismo das linhagens avaliadas, com exceção de *Micrococcus* sp. Estes ácidos foram identificados pela comparação de seus espectros de massas aos sugeridos pela biblioteca Wiley 275, verificando-se alta similaridade (acima de 95%) com compostos da base de dados. Dados da literatura sobre a

¹⁶¹Urlacher, V.B.; Lutz-Wahl, S.; Schmid, R.D.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64*, 317-325.

biodegradação aeróbia de hidrocarbonetos indicam que a mesma é ocorre basicamente por reações de oxidação de biomarcadores do petróleo gerando ácidos carboxílicos, como produtos da atividade microbiana^{41,42,43}, fatos estes constatados através dos resultados obtidos em nosso estudo.

3.2.2.2. ABORDAGEM 2

Cientes que a biodegradação de uma classe de compostos pode depender da presença de outras classes, no caso os ácidos carboxílicos de cadeia longa, reavaliou-se a atividade biotransformadora de linhagens puras, isoladas do campo Pampo, analisando-se 8 cepas, as quais foram selecionadas de acordo com os resultados obtidos nos experimentos realizados sob a abordagem 1. Assim, as bactérias que tiveram mais afinidade, ou atividade biodegradadora sobre um determinado biomarcador dentro das misturas avaliadas (Coquetéis I e II), foram investigadas individualmente, frente a tais compostos:

- *Bacillus subtilis* e *Methylobacterium* sp. frente a diidrofenantreno;
- *Bacillus subtilis* e *Micrococcus* sp. frente a fitano;
- *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Achromobacter xylooxidans*, *Dietzia* sp. e *Pseudomonas stutzeri* frente a colestano.

- ***Bacillus subtilis* + Diidrofenantreno e *Methylobacterium* sp. + Diidrofenantreno**

Após 35 dias de monitoramento por análises cromatográficas, não se observou quaisquer alterações em termos de concentração, ou

biotransformação do diidrofenantreno, frente às linhagens de *Bacillus subtilis* e *Methylobacterium* sp. A linhagem de *Bacillus subtilis*, quando avaliada quanto a biodegradação do coquetel II, apresentou taxa de 92% de degradação do diidrofenantreno, enquanto *Methylobacterium* sp. frente à mistura dos hidrocarbonetos diidrofenantreno e fitano (coquetel II), apresentou índice de 65% de degradação do aromático, entretanto, quando aplicou-se o mesmo composto como única fonte de carbonos no meio reacional, ambas as linhagens não repetiram os mesmos resultados. Isto pode ter se dado ao fato de que as bactérias podem ter utilizado os demais compostos presentes em ambos os coquetéis (fitano no coquetel I; fitano, ácido nonadecanóico e colestano, no coquetel II) como fontes iniciais de carbono e energia para seu crescimento e produção de bioemulsificantes que tornariam o aromático mais disponível ao seu metabolismo, fornecendo assim condições à biodegradação do mesmo pela linhagem.

No entanto, estas são suposições baseadas em relatos da literatura no que se refere à produção de tensoativos microbianos e aumento da capacidade de degradação microbiana de hidrocarbonetos ^{49,53,63,64}. De forma a constatar sobre a capacidade destas linhagens à produção de exopolímeros (EPS) com atividade bioemulsificante e justificar resultados conflitantes quanto a presença de ácido nonadecanóico potencializar a biodisponibilidade de hidrocarbonetos, realizou-se experimentos para a determinar a capacidade da produção microbiana de EPS, resultados estes que serão melhor discutidos no Capítulo 3 deste trabalho de tese.

- *Bacillus subtilis* + Fitano e *Micrococcus* sp. + Fitano

A linhagem de *Bacillus subtilis* quando avaliada frente ao fitano, não apresentou qualquer atividade biodegradadora sobre o biomarcador, durante o período avaliado (35 dias). Novamente, os resultados obtidos quando a mesma linhagem foi analisada frente à uma mistura de biomarcadores, não se repetiram, ou seja, *Bacillus subtilis* degradou 92% do fitano presente no coquetel II (Abordagem 1), entretanto, não foi capaz de utilizar o isopreno como fonte única de carbono, no presente experimento.

Em contrapartida, *Micrococcus* sp., quando avaliado frente ao mesmo substrato, fitano, apresentou excelentes resultados quanto à biotransformação do mesmo, degradando-o em 82%, após 35 dias de monitoramento (Figuras 44 e 45).

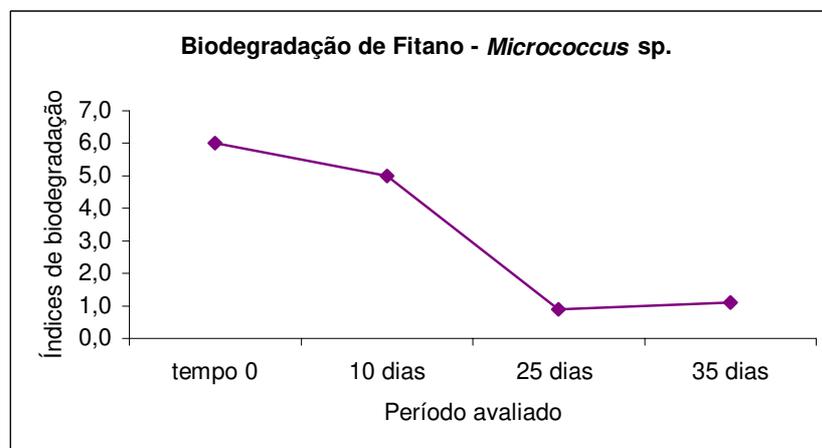


Figura 44. Perfil de biodegradação do **fitano** por *Micrococcus* sp.

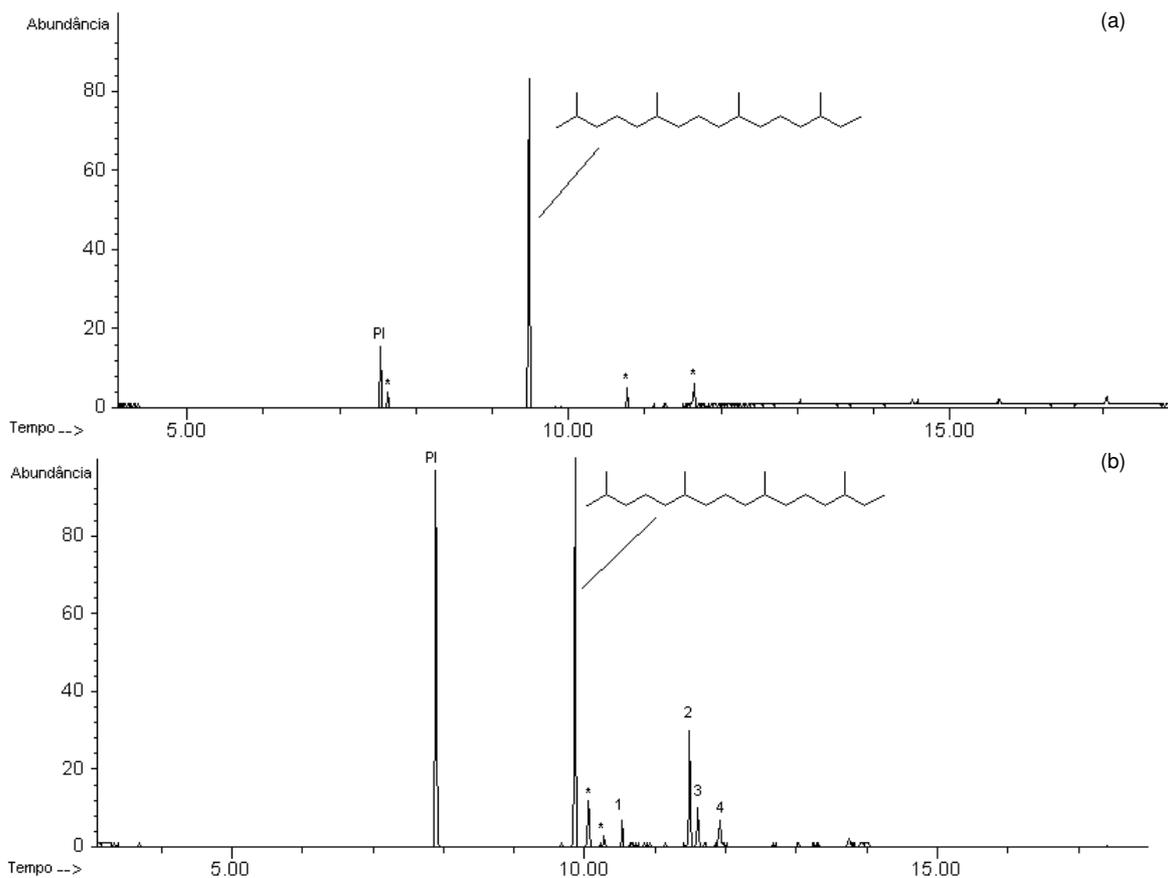


Figura 45. (a) Cromatograma de corrente iônica total do fitano frente à *Micrococcus* sp., tempo 0. (b) Cromatograma de corrente iônica total do fitano frente à *Micrococcus* sp., após 35 dias. PI= padrão interno (pentadecano). * = contaminantes. Ácidos derivados do metabolismo microbiano de fitano, detectados como ésteres metílicos: 1= hexadecanoato de metila; 2= 9-octadecenoato de metila; 3= octadecanoato de metila; 4= 9,12 octadecadienoato de metila.

É importante ressaltar que transcorridos apenas 6 dias da inoculação inicial do microrganismo junto ao isopreno, observou-se a presença de uma série homóloga de ácidos carboxílicos, derivados de reações de abstração de carbonos e carboxilação do fitano, os quais podem ser visualizados através das Figuras 46 à 52. Fitol e uma pentadecanona trimetilada também foram detectados como produtos da oxidação de fitano por *Micrococcus* sp., sob as condições avaliadas.

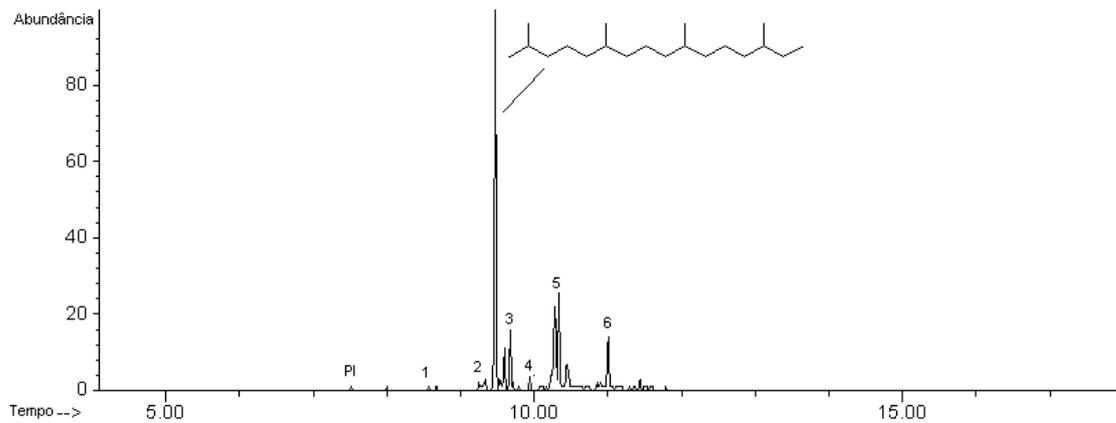


Figura 46. Cromatograma de corrente iônica total do fitano e metabólitos formados a partir de sua biotransformação por *Micrococcus* sp., após 6 dias da inoculação junto à bactéria. PI= padrão interno (pentadecano). Produtos do metabolismo do fitano por *Micrococcus* sp: 1= 3,7,11-trimetil, dodecanoato de metila; 2= 4,8,12-trimetil, tridecanoato de metila; 3= 6,10,14-trimetil, 2-pentadecanona; 4= 5,9,13-trimetil, tetradecanoato de metila; 5= 3,7,11,15-tetrametil, 1-hexadecenol (fitol); 6= 3,7,11,15-tetrametil, hexadecanoato de metila (ácido fitânico).

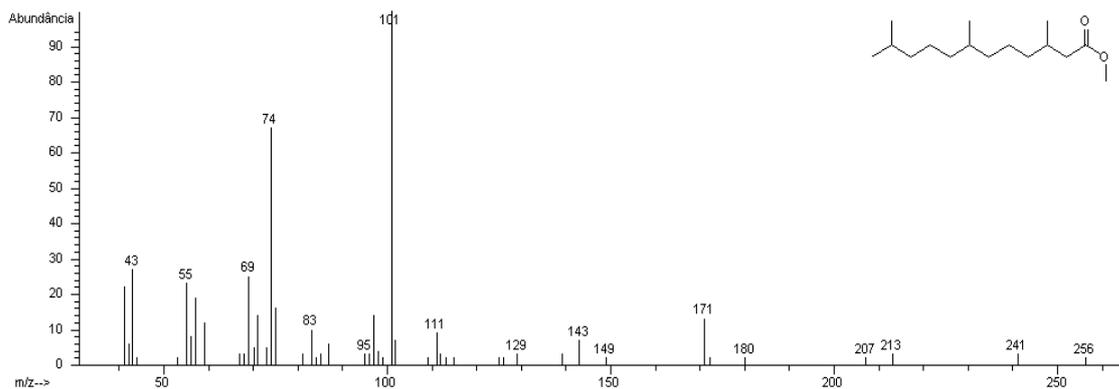


Figura 47. Espectro de massas do 3,7,11-trimetil, dodecanoato de metila (1).

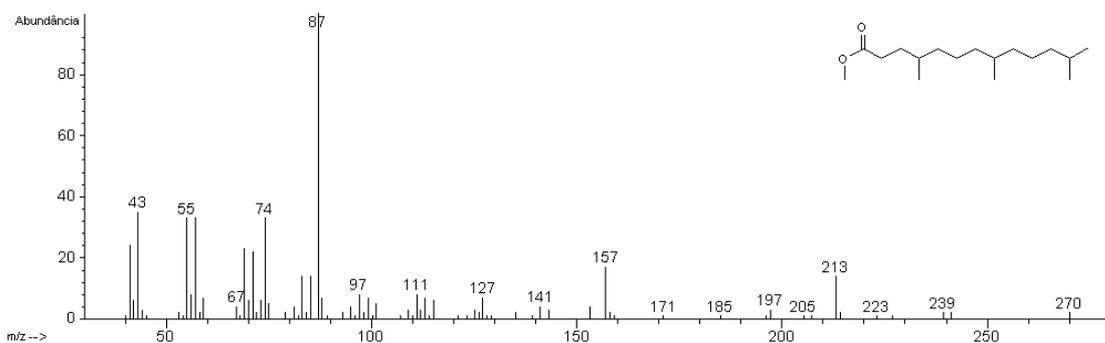


Figura 48. Espectro de massas do 4,8,12-trimetil, tridecanoato de metila (2).

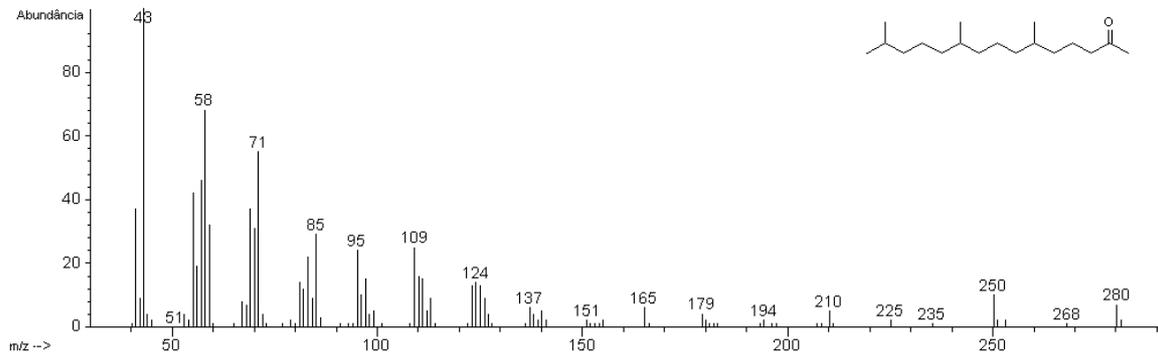


Figura 49. Espectro de massas de 6,10,14-trimetil, 2-pentadecanona (3).

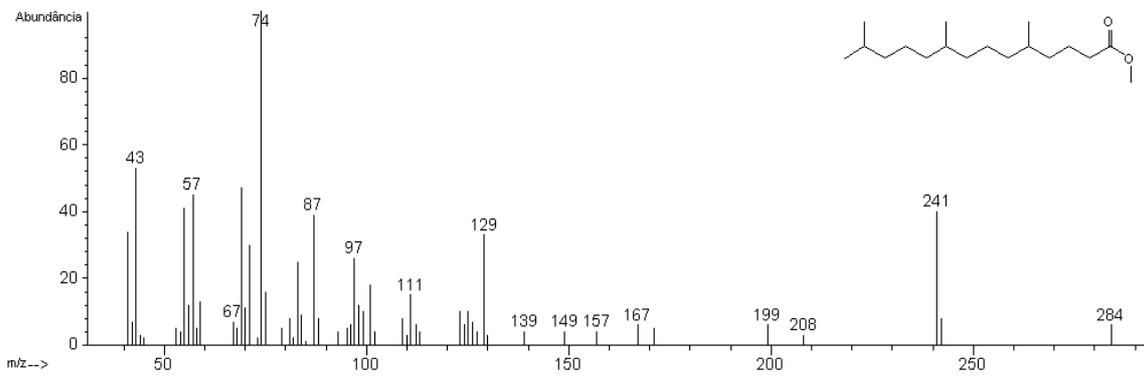


Figura 50. Espectro de massas do 5,9,13-trimetil, tetradecanoato de metila (4).

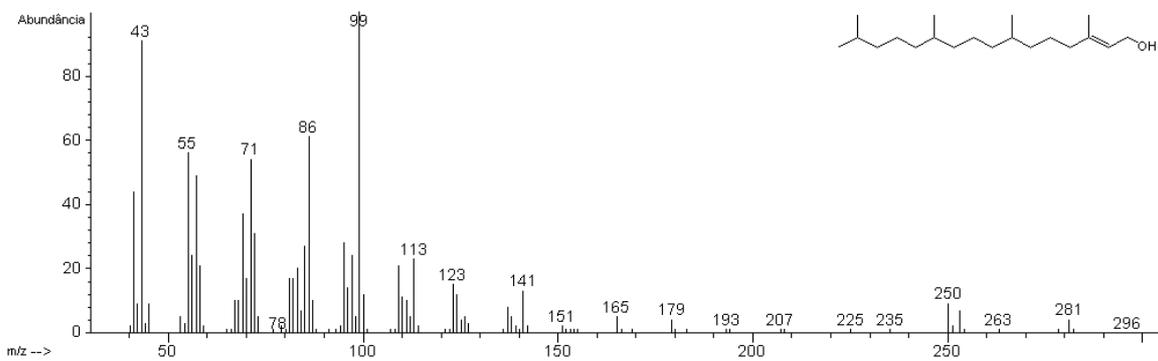


Figura 51. Espectro de massas do 3,7,11,15-tetrametil, 1-hexadecenol (fitol) (5).

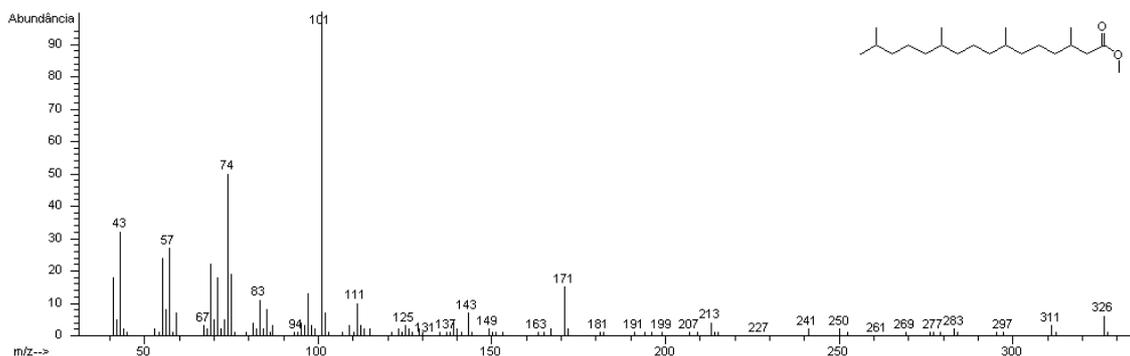


Figura 52. Espectro de massas do 3,7,11,15-tetrametil, hexadecanoato de metila (ácido fitânico) (6).

Os produtos majoritários da biotransformação do fitano pela linhagem de *Micrococcus* sp., foram identificados através da Biblioteca Wiley 275, com níveis acima de 90% de similaridade a compostos de referência.

Ácidos fitânicos (C_{18} – C_{21}) somente haviam sido descritos, até o momento, como produtos da degradação de derivados de fitol por bactérias redutoras de sulfato, algas e cianobactérias (Russell *et al.*, 1997)¹⁶², não tendo sido descrito até o momento como produto da degradação de fitano por bactérias aeróbias, provenientes de reservatórios de petróleo. Os ácidos dodecanóico, tridecanóico e tetradecanóico, trimetilados e ainda uma cetona, ou seja, a pentadecanona 6,10,14 trimetil, também foram identificadas, pioneiramente como produtos da biotransformação de fitano por *Micrococcus* sp, provenientes de reações de oxidação. Este também trata-se do primeiro relato da formação de fitol, como um produto da biotransformação aeróbia de fitano, por *Micrococcus* sp.

Assim, *Micrococcus* sp apresenta-se a partir dos resultados obtidos por nosso estudo como um excelente biotransformador de isoprenos, podendo ser considerado como potencial constituinte da microbiota aeróbia de

¹⁶² Russell, M.; Grimalt, J.O.; Hartgers, W.A.; Taberner, C.; Rouchy, J.M. *Org. Geochem.* **1996**, 26(9), 605-625.

reservatórios de petróleo biodegradados, uma vez que poderia estar envolvido nos mecanismos de biodegradação dos hidrocarbonetos ramificados, contribuindo para a classificação do nível 2 de biodegradação de óleos, segundo escala de Peters e Moldowan (1993)⁵.

• *Bacillus megaterium* + colestano; *Bacillus pumilus* + colestano; *Achromobacter xylooxidans* + colestano; *Dietzia* sp. + colestano e *Pseudomonas stutzeri* + colestano

Nenhuma das linhagens avaliadas foi capaz de degradar o colestano, quando o mesmo foi adicionado ao meio reacional, como única fonte de carbono. Entretanto, após 30 dias de monitoramento cromatográfico dos experimentos (item 5.2.3, Parte Experimental), detectou-se uma grande variedade de ácidos carboxílicos de cadeia longa, como metabólitos de ambas as linhagens do gênero *Bacillus* avaliadas, ou seja, *Bacillus megaterium* e *Bacillus pumilus* (Figuras 53 e 54).

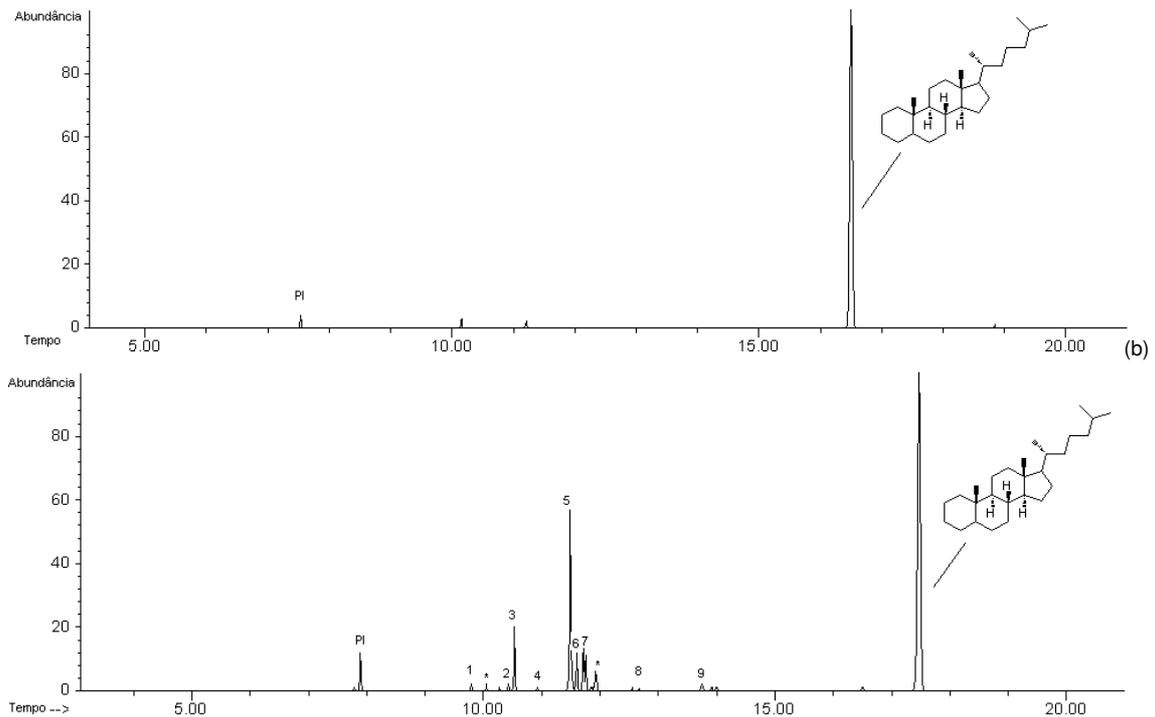


Figura 53. (a) Cromatograma de corrente iônica total do colestano frente a *Bacillus megaterium*, tempo 0. (b) Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 30 dias da inoculação de *Bacillus megaterium*. PI= padrão interno (pentadecano). * = contaminantes. Ácidos carboxílicos de cadeia longa detectados como ésteres metílicos: 1= tetradecanoato de metila; 2= 9-hexadecenoato de metila; 3= hexadecanoato de metila; 4= heptadecanoato de metila; 5= 9-octadecenoato de metila; 6= octadecanoato de metila; 7= 9,12-octadecadienoato de metila; 8= ácido eicosanóico metil éster; 9= ácido docosanóico metil éster.

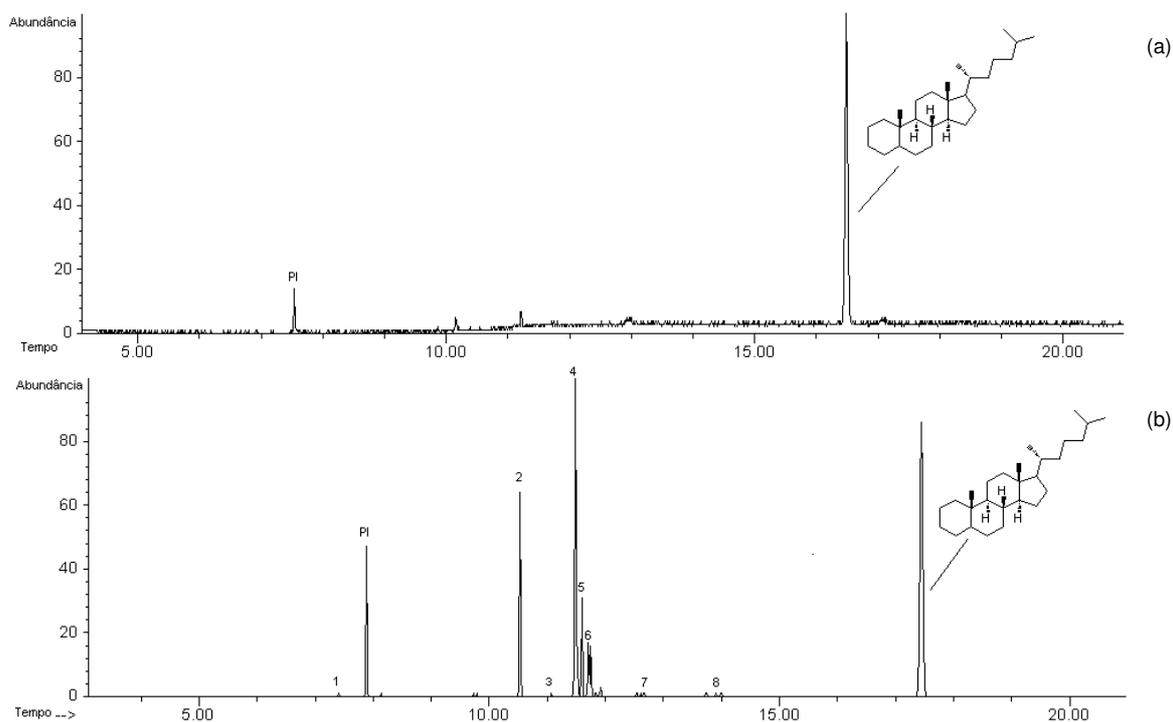


Figura 54. (a) Cromatograma de corrente iônica total do colestano frente a *Bacillus pumilus*, tempo 0. (b) Cromatograma de corrente iônica total do colestano, após 30 dias da inoculação de *Bacillus pumilus*. PI= padrão interno (pentadecano). * = contaminantes. Ácidos carboxílicos de cadeia longa detectados como ésteres metílicos: 1= 8-metil, octadecanoato de metila; 2= hexadecanoato de metila; 3= heptadecanoato de metila; 4= 9-octadecenoato de metila; 5= octadecanoato de metila; 6= 9,12-octadecadienoato de metila; 7= eicosanoato de metila; 8= docosanoato de metila.

Como já descrito anteriormente^{59,120,122,123}, linhagens de *Bacillus* são tidas como excelentes produtoras de bioemulsificantes, onde a detecção de ácidos carboxílicos de cadeia longa nos experimentos realizados pode indicar a tentativa de ambas as linhagens avaliadas à produção ou liberação (ácidos provindos das paredes celulares microbianas) de moléculas, que pudessem tornar o esterano mais acessível ao metabolismo microbiano^{63,49}.

Torna-se importante ressaltar que as linhagens avaliadas foram selecionadas de acordo com as atividades biodegradadoras ou biotransformadoras apresentadas nos experimentos realizados anteriormente (Abordagem 1). Entretanto, novamente, constatou-se que algumas bactérias

somente terão ação biodegradadora de determinados hidrocarbonetos do petróleo, quando lhes forem fornecidas misturas de substratos que lhes propiciem iniciar seu crescimento microbiano ou produção de metabólitos que facilitem o acesso a compostos menos favoráveis à biodegradação.

Estes resultados podem comprovar relatos de Ron e Rosenberg (2001)⁴⁷, que tratam da preferência microbiana a hidrocarbonetos mais facilmente degradáveis, quando existe a produção de exopolímeros microbianos.

3.2.2.3. ABORDAGEM 3

A existência entre um sinergismo entre a microbiota aeróbia e anaeróbia provenientes do campo Pampo, foi avaliada tendo-se como critério a verificação da atividade biodegradadora de ambas sobre uma mistura de biomarcadores do petróleo (diidrofenantreno, fitano, ácido nonadecanóico e diidrocolesterol).

Todos os microrganismos aeróbios identificados a partir das amostras de águas de formação e óleos do campo Pampo foram pré-cultivados em Caldo Nutriente (Difco), segundo descrito no item 5.2.3 (Parte Experimental), obtendo-se um consórcio de bactérias representantes da microbiota aeróbia. A microbiota anaeróbia constituiu-se da mistura entre os consórcios anaeróbios provenientes das coletas 1 e 2, realizadas na Plataforma Pampo.

Assim, inoculou-se a mistura dos biomarcadores, sob condições aeróbias, junto às microbiotas, tanto aeróbia, quanto anaeróbia, entretanto, utilizando-se meio mineral Zinder adicionado de resazurina, de forma a verificar-se a oxidação ou redução do meio reacional.

Os frascos foram vedados com batoques de borracha de butila, selados com lacres de alumínio (item 5.2.2, Parte Experimental). Manteve-se os meios incubados durante 20 dias à temperatura basal de 30 °C, de forma a potencializar a atividade das bactérias aeróbias, mesofílicas presentes. Após este período, adicionou-se solução de Na₂S 5% (item 5.2.2, Parte Experimental) aos frascos reacionais, de forma a promover a redução do meio. Verificou-se assim que já não havia mais oxigênio nos frascos, uma vez que os meios haviam se tornado incolor.

Desta forma, buscou-se verificar sobre a hipótese de que a microbiota anaeróbia pudesse sobreviver à custa dos produtos da biotransformação aeróbia de compostos do petróleo.

Após 120 dias de monitoramento por análises cromatográficas, observou-se a degradação de 77% do ácido nonadecanóico. Dentre os hidrocarbonetos avaliados, diidrofenantreno foi o composto de escolha ao metabolismo microbiano, detectando-se a biodegradação de 25% do mesmo. Fitano, por sua vez, não foi biodegradado durante o período avaliado frente às microbiotas aeróbias e anaeróbias (Figura 55). Diidrocolesterol não se manteve estável nas condições reacionais avaliadas, degradando-se espontaneamente até mesmo nos frascos controles não adicionados dos consórcios microbianos.

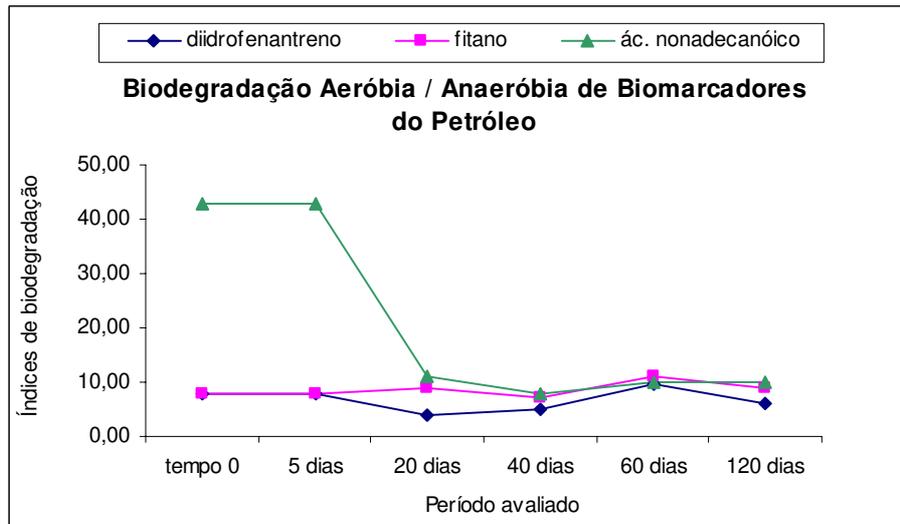


Figura 55. Perfis de biodegradação dos biomarcadores avaliados frente ao consórcio entre as microbiotas aeróbias e anaeróbias do petróleo.

Uma grande variedade de ácidos carboxílicos de cadeia longa foi detectada, desde o início do experimento (Figuras 56 a 59).

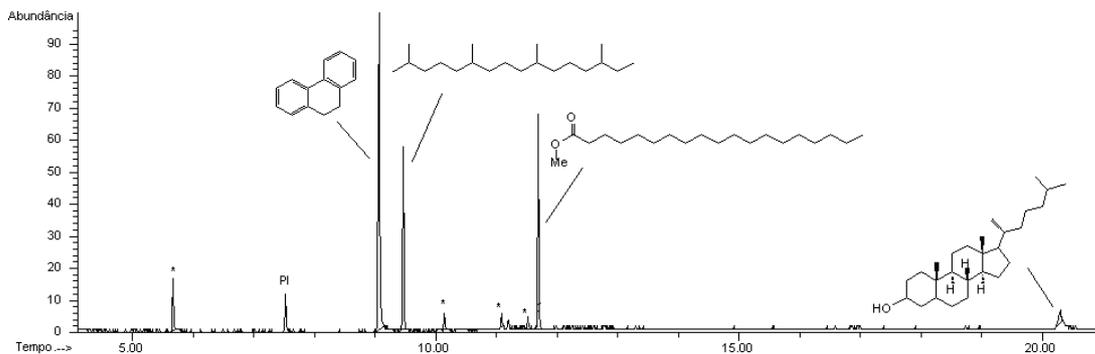


Figura 56. Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, frente às microbiotas, aeróbias e anaeróbias, tempo 0. PI= padrão interno de quantificação (pentadecano). *= contaminantes.

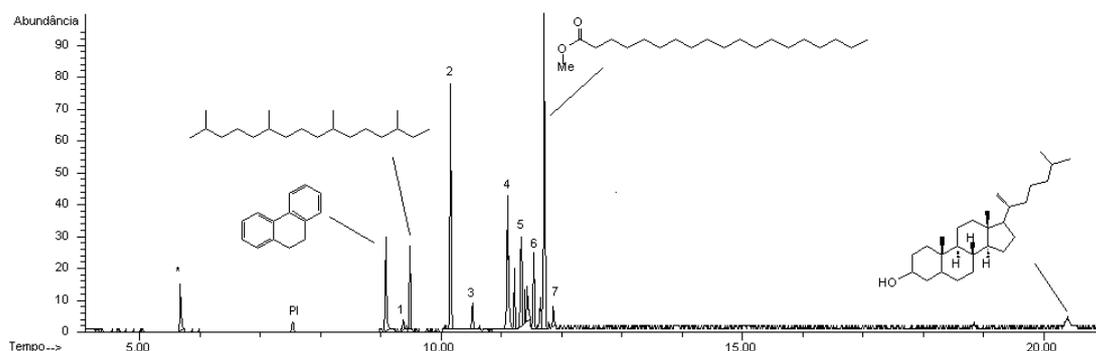


Figura 57. Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 5 dias de incubação junto às microbiotas. PI= padrão interno de quantificação (pentadecano). *= contaminantes ou compostos não identificados. Ácidos carboxílicos de cadeia longa detectados como ésteres metílicos: 1= pentadecanoato de metila; 2= hexadecanoato de metila; 3= 2-metil, hexadecanoato de metila; 4= 9-octadecenoato de metila; 5= octadecanoato de metila; 6= 9,12-octadecadienoato de metila; 7= 2,9-metil, octadecanoato de metila.

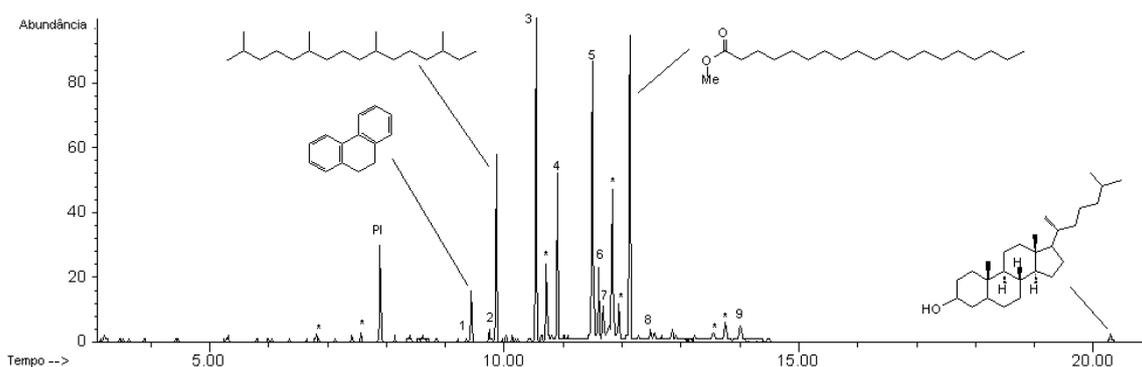


Figura 58. Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 20 dias de incubação junto às microbiotas. PI= padrão interno de quantificação (pentadecano). *= contaminantes ou compostos não identificados. Ácidos carboxílicos de cadeia longa detectados como ésteres metílicos: 1= tetradecanoato de metila; 2= pentadecanoato de metila; 3= hexadecanoato de metila; 4= 2-metil, hexadecanoato de metil; 5= 9-octadecenoato de metila; 6= octadecanoato de metila; 7= 9,12-octadecadienoato de metila; 8= eicosanoato de metila; 9= dosocanoato de metila.

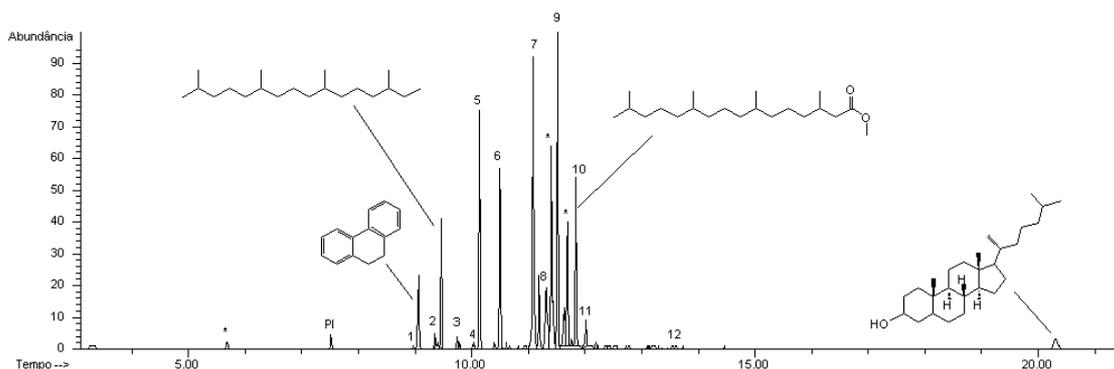


Figura 59. Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores, após 120 dias de incubação junto às microbiotas. PI= padrão interno de quantificação (pentadecano). *= contaminantes. Ácidos carboxílicos de cadeia longa detectados como ésteres metílicos: 1= tetradecanoato de metila; 2= pentadecanoato de metila; 3= 9-hexadecanoato de metila; 4= 2-metil, pentadecanoato de metila; 5= hexadecanoato de metila; 6= 2-metil, hexadecanoato de metila; 7= 9-octadecenoato de metila; 8= octadecanoato de metila; 9= 9,12-octadecadienoato de metila; 10= 2-metil, octadecanoato de metila; 11= eicosanoato de metila; 12= docosanoato de metila.

Os resultados obtidos comprovam a preferência da microbiota anaeróbia à biotransformação de compostos oxigenados, tais como ácidos carboxílicos de cadeia longa. Os cromatogramas apresentados através das Figuras 57 à 59 demonstram o aumento da intensidade e variedade de ácidos carboxílicos de cadeia longa, além da formação dos ácidos eicosanóico (C_{20}) e docosanóico (C_{22}), confirmando a rota de biotransformação anaeróbia proposta por So *et al.* (2003)³⁵, onde os autores relatam que o metabolismo microbiano anaeróbio ocorre através da formação e alongação de ácidos carboxílicos. Como avaliou-se consórcios microbianos, tanto aeróbios, quanto anaeróbios, deve-se levar em consideração a existência de competição entre as cepas presentes e maior dificuldade de adaptação às condições do meio, ou seja, rápida escassez de oxigênio, fontes de carbono restritas e temperaturas variáveis, o que pode ter ocasionado um retardamento no metabolismo de hidrocarbonetos pela microbiota aeróbia.

Torna-se, novamente, importante ressaltar que a maioria dos microrganismos participantes da microbiota aeróbia avaliada são linhagens descritas como produtoras de bioemulsificantes ou excelentes biodegradadoras de hidrocarbonetos. Certamente, se os experimentos fossem monitorados por longos períodos de tempo, superiores a 120 dias, poderíamos observar a diminuição da concentração dos ácidos observados nos cromatogramas descritos (Figuras 56 a 59) e conseqüente início da biodegradação dos hidrocarbonetos presentes pela microbiota anaeróbia.

3.2.I. CONCLUSÕES PARCIAIS – CAPÍTULO 2

- I) Através dos experimentos de biodegradação anaeróbia realizados, observou-se uma tendência da microbiota avaliada a selecionar compostos oxigenados (ácido nonadecanóico, β -amirina) como fontes de carbono e energia, propondo-se que pudesse haver um cometabolismo entre bactérias aeróbias e anaeróbias nos poços, onde as primeiras seriam responsáveis pela oxidação de hidrocarbonetos ou geração de ácidos carboxílicos de cadeia longa ao meio. Sob anaerobiose, por sua vez, ocorreria a efetiva degradação dos biomarcadores do petróleo;
- II) Dentro da Abordagem 1, *Bacillus subtilis* apresentou os melhores resultados quanto à degradação dos hidrocarbonetos diidrofenantreno e fitano. *Bacillus megaterium* 2, *Bacillus* sp. 2 e *Bacillus subtilis*, apresentaram 100% de degradação do ácido nonadecanóico. Torna-se importante ressaltar sobre *Micrococcus* sp., a qual apresentou baixa taxa (14%) de biodegradação do ácido nonadecanóico, mantendo sempre a preferência ao metabolismo de hidrocarbonetos, diidrofenantreno e fitano, com fontes de carbono;
- III) Avaliando-se a atividade de determinadas linhagens sobre biomarcadores, os quais as mesmas haviam apresentado bons resultados de degradação, em experimentos preliminares, obteve-se que somente *Micrococcus* sp., manteve e confirmou sua habilidade à biodegradação do fitano. Identificou-se ácidos carboxílicos isoprenóides derivados do metabolismo microbiano do biomarcador,

trazendo resultados inéditos no que se refere à atuação da bactéria *Micrococcus* sp. Adicionalmente, conseguiu-se verificar que a microbiota anaeróbia pode sobreviver às custas de ácidos formados ou derivados de microrganismos aeróbios, em reservatórios de petróleo, biotransformando-os à ácidos maiores, onde os microrganismos anaeróbios somente iniciarão a degradação de hidrocarbonetos após o cessamento das reservas destes ácidos no meio. A existência desta interação já era sugerida por Rozanova *et al.* (1997)²², onde os autores propuseram que bactérias aeróbias, degradadoras de hidrocarbonetos, excretavam produtos polares da oxidação, por exemplo, ácidos graxos, os quais eram subsequenteiramente metabolizados pela microbiota anaeróbia. Os resultados apresentados pelo presente trabalho indicam esta hipótese é válida.

3.3. CAPÍTULO 3 – PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXOPOLÍMEROS DE BACTÉRIAS DO PETRÓLEO BRASILEIRO

Estas investigações foram realizadas através de trabalho de colaboração entre o grupo de pesquisas da Profa. Dra. Anita J. Marsaioli (Instituto de Química, Unicamp, Brasil) e o Prof. Dr. Walter Michaelis (Instituto de Biogeoquímica, Universidade de Hamburgo, Alemanha), por convênio CAPES-DAAD.

3.3.1. PRODUÇÃO DE EPS E CRESCIMENTO BACTERIANO

A abordagem geral do estudo foi avaliar a produção de EPS por 10 linhagens bacterianas aeróbias, representantes de espécies que foram recuperadas a partir do campo Pampo, na presença de diferentes fontes de carbono. Estas cepas foram cultivadas em meio mineral Zinder “modificado” (item 5.1.5, Parte Experimental), suplementado por diferentes substratos: (1) glicose, (2) fenantreno, (3) octadecano e uma (4) mistura entre ambos os hidrocarbonetos. Como descrito na Parte Experimental (item 5.3.3), todos os substratos empregados, foram utilizados à concentração de 0,02 mg/mL⁶⁹, por constituir doses não tóxicas ao desenvolvimento microbiano.

As seguintes cepas bacterianas representantes da diversidade de espécies recuperadas a partir das amostras de águas de formação e óleo do petróleo da Bacia de Campos foram avaliadas: *Microbacterium* sp., *Dietzia*

sp., *Bacillus subtilis*, *Micrococcus* sp., *Halomonas* sp., *Brevibacillus* sp., *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp.

As bactérias foram mantidas incubadas durante quatro dias a 30 °C, de forma a obter-se o máximo de biomassa e confirmar sobre teorias vigentes a respeito da maior produção de EPS, em função do aumento da densidade celular⁴⁸.

Exopolímeros microbianos, ou EPS, correspondem a compostos que os microrganismos produzem, como forma de solubilizar fontes de nutrientes à sua sobrevivência, ou para a promoção de sua aderência à superfícies, permitindo-lhes biodegradar ou biotransformar substratos que lhes são necessários^{64,65}. Carboidratos, ácidos urônicos, proteínas, ácidos graxos, compostos acetilados e de enxôfre, podem ser constituintes de EPS microbianos⁶⁵. Ao investigar a produção de EPS por linhagens microbianas, empregou-se metodologias bastante simples, descritas por Quesada *et al.* (1993)¹²⁵, adicionando-se açúcares ou hidrocarbonetos como únicas fontes de carbono ao crescimento bacteriano.

A Tabela 7 sumariza os resultados obtidos pelo presente estudo, quanto à produção de EPS total, ou seja, não designando a composição dos exopolímeros, mas sim o rendimento em miligramas de EPS produzido, por gramas de células, frente aos diferentes substratos avaliados.

Tabela 7. Produção de EPS por bactérias aeróbias de petróleo brasileiro

Bactérias Avaliadas	Produção de EPS (mg/g células)			
	Fontes de Carbono			
	Glicose	Fenantreno	Octadecano	Fenantreno + Octadecano
<i>Microbacterium sp</i>	17,75	3,10	ND	ND
<i>Dietzia sp</i>	10,17	4,94	1,44	1,71
<i>Bacillus subtilis</i>	4,94	36,5	27,33	11,33
<i>Micrococcus sp</i>	4,43	1,02	1,48	1,78
<i>Halomonas sp</i>	3,81	1,48	13,43	8,00
<i>Brevibacillus sp</i>	3,09	24,57	16,4	32,43
<i>Bacillus pumilus</i>	2,56	3,03	19,20	10,00
<i>Pseudomonas sp</i>	1,65	0,15	0,14	0,26
<i>Bacillus megaterium</i>	0,14	19,2	6,29	69,33
<i>Bacillus sp</i>	0,08	1,39	1,25	3,32

Lacunas em verde correspondem aos melhores resultados obtidos, frente às diferentes fontes de carbono avaliadas.

ND: valores de produção de EPS não determinados.

A Tabela 8 apresenta a relação entre a quantidade de EPS produzido, em relação à massa celular seca, ou seja, o quanto a produção de EPS correspondeu à produção de biomassa pela bactéria. Os valores foram expressos em porcentagem (%).

Tabela 8. Produção de EPS (%) em função do aumento da biomassa

Bactérias Avaliadas	Produção de EPS (%)			
	Fontes de Carbono			
	Glicose	Fenantreno	Octadecano	Fenantreno + Octadecano
<i>Microbacterium sp</i>	1,8	0,3	ND	ND
<i>Dietzia sp</i>	1	0,5	0,1	0,2
<i>Bacillus subtilis</i>	0,5	3,7	2,7	1,1
<i>Micrococcus sp</i>	0,4	0,1	0,1	0,2
<i>Halomonas sp</i>	0,4	0,1	1,3	0,8
<i>Brevibacillus sp</i>	0,3	2,5	1,6	3,2
<i>Bacillus pumilus</i>	0,3	0,3	1,9	1,0
<i>Pseudomonas sp</i>	0,2	0,01	0,01	0,02
<i>Bacillus megaterium</i>	0,1	1,9	0,6	6,9
<i>Bacillus sp</i>	0,1	0,1	0,1	0,3

Lacunas em amarelo correspondem aos melhores resultados obtidos, frente às diferentes fontes de carbono avaliadas.

ND: valores não determinados.

O aumento da densidade celular das bactérias na presença de hidrocarbonetos foi monitorado a cada 48 horas durante 4 dias, através de medidas espectrofotométricas da absorbância relativa dos meios reacionais no comprimento de onda de 450 nm (Johnsen *et al.*, 2002)¹⁶³ (Parte Experimental, ítem 5.3.5). O aumento da turbidez, e conseqüente aumento dos valores de absorbância foram indicativos do incremento da biomassa celular nos meios. As Figuras 60 à 62, apresentam as curvas de crescimento microbiano das bactérias, frente aos hidrocarbonetos (octadecano e fenantreno), no decorrer do período avaliado.

¹⁶³ Johnsen, A.R.; Bendixen, K.; Karlson, U. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, 68(6), 2683-2689.

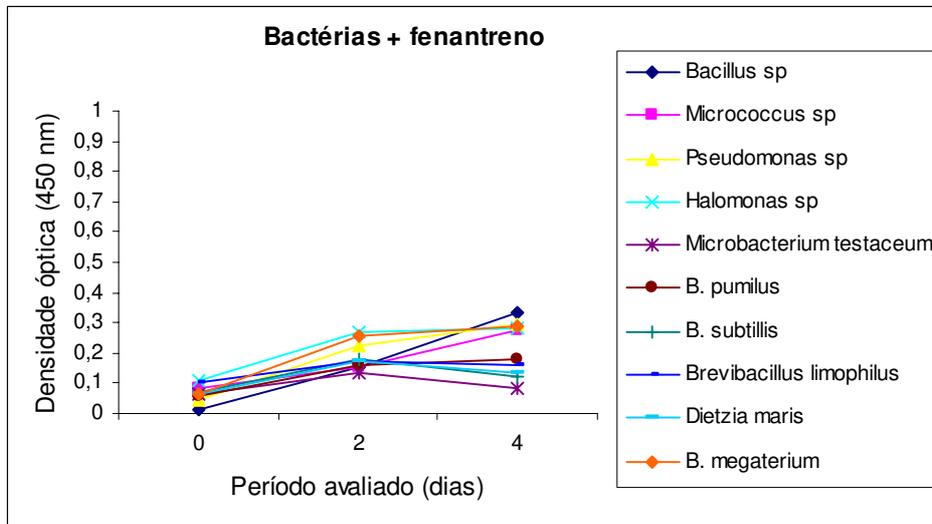


Figura 60. Curvas de crescimento microbiano de bactérias do petróleo, tendo fenantreno como substrato.

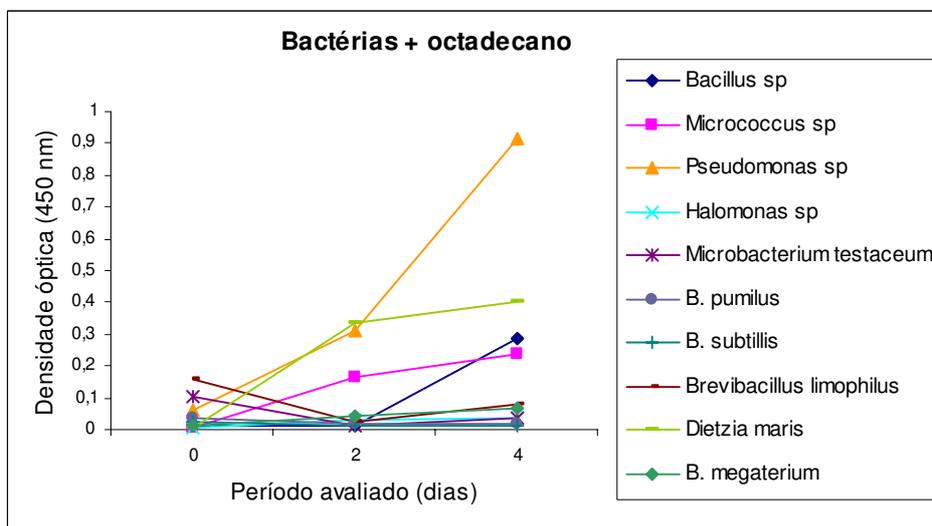


Figura 61. Curvas de crescimento microbiano de bactérias do petróleo, tendo octadecano como substrato.

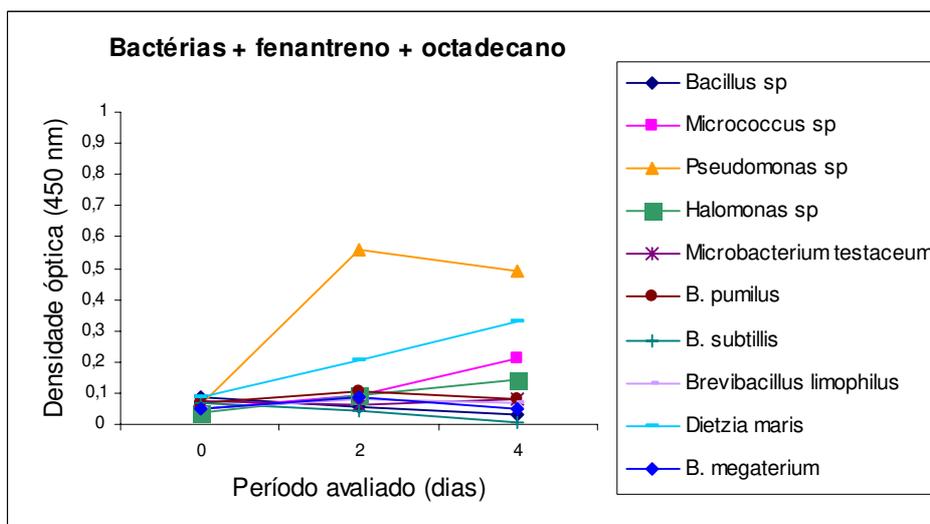


Figura 62. Curvas de crescimento microbiano de bactérias do petróleo, tendo fenantreno + octadecano como substratos.

Os hidrocarbonetos, *n*-octadecano e fenantreno, foram selecionados como substratos aos experimentos realizados, por se tratarem de compostos representantes de duas classes distintas, ou seja, *n*-alcanos e aromáticos, presentes no petróleo, as quais são bem descritas pela literatura quanto ao emprego em ensaios que envolvam a verificação do metabolismo microbiano^{41,43,44} e produção de EPS^{49, 50}.

Microbacterium sp. apresentou o melhor rendimento em termos de produção de EPS, gerando 17,75 mg de EPS / g de células, quando glicose foi empregada como substrato.

Correlacionando-se os valores obtidos quanto à produção de EPS (Tabelas 7 e 8) e as curvas de crescimento das dez linhagens avaliadas frente aos hidrocarbonetos, fenantreno e octadecano, tanto isoladamente quanto em mistura, pôde-se observar que o aumento da densidade celular não está correlacionado à maior produção de EPS. *Bacillus* sp. apresentou os maiores valores de absorvância (450 nm), no decorrer dos 4 dias avaliados, apresentando-se em fase log de crescimento microbiano¹¹⁵, quando utilizou-se

fenantreno como substrato, entretanto, produziu apenas 1,39 mg de EPS, por grama de células bacterianas. *B. subtilis*, por sua vez, quando avaliado frente ao mesmo substrato, apresentou-se em fase estacionária de crescimento microbiano, durante todo o período de tempo avaliado, mas foi a linhagem que demonstrou o maior rendimento em produção de exopolímeros, ou seja, 36,5 mg/g de células.

A mesma situação pôde ser verificada quando se avaliou a produção de EPS e crescimento microbiano das linhagens, frente ao octadecano. *Pseudomonas* sp., apresentou curva de crescimento ascendente (fase log)¹¹⁵, com os maiores valores de absorvância observados, se comparados aos apresentados pelas demais linhagens avaliadas. No entanto, quando se utilizou octadecano como substrato, a mesma linhagem produziu apenas 0,14 mg de EPS / g de células. Novamente, *B. subtilis* apresentou-se como o melhor produtor de EPS frente ao hidrocarboneto avaliado, gerando 27,33 mg/g de células.

Avaliando-se os mesmos parâmetros, frente à mistura dos hidrocarbonetos, fenantreno e octadecano, pudemos confirmar os mesmos perfis, ou seja, o aumento da densidade celular não, necessariamente, corresponde à maior produção de EPS. *Dietzia* sp. e *Pseudomonas* sp. apresentaram os maiores valores de absorvância e conseqüentemente os maiores índices de aumento da densidade celular, frente à mistura de hidrocarbonetos. *Bacillus megaterium*, por sua vez, apresentou-se em fase lag do crescimento bacteriano¹¹⁵, durante todo o período avaliado, entretanto, demonstrou o melhor resultado quanto à produção de EPS, dentre todas as linhagens avaliadas frente à mistura de hidrocarbonetos, gerando 69,33 mg de EPS/g de células. É importante ressaltar sobre tal linhagem e o resultado encontrado quanto à produção de EPS, o qual corresponde a 6,9% do total de

sua biomassa, apresentando-se como uma cepa em potencial para estudos futuros que visem a aplicação dos seus exopolímeros industrialmente, ou ainda, recuperação de petróleo, ou biorremediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos.

3.3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS EXOPOLÍMEROS MICROBIANOS

Foram realizadas análises para a caracterização dos exopolímeros produzidos pelas dez linhagens bacterianas avaliadas frente aos hidrocarbonetos, fenantreno e octadecano. Análises quanto aos teores de carboidratos (Dubois *et al.*, 1956)¹⁶⁴, proteínas (Bradford, 1976)¹⁶⁵ e ácidos urônicos (Blumenkratz e Asboe-Hansen, 1973)¹⁶⁶, foram executadas aplicando-se metodologias colorimétricas, descritas na Parte Experimental (item 5.3.4).

A determinação da concentração de carboidratos foi baseada na comparação dos valores de absorbância obtidos dos EPS microbianos a 490 nm, após reações de quebra dos exopolímeros em açúcares, utilizando-se soluções de fenol e ácido sulfúrico (item 5.3.4, Parte Experimental). As aferições foram realizadas em duplicata. Fenol na presença de ácido sulfúrico pode ser usado para microdeterminação quantitativa de açúcares e seus derivados metilados, oligossacarídeos e polissacarídeos. As pentoses e metil pentoses têm valores de absorção máxima a 480 nm, enquanto hexoses e seus derivados metilados, absorvem em comprimentos de onda entre 485 e 490

¹⁶⁴ Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. *Anal. Chem.* **1956**, 28(3), 350-356.

¹⁶⁵ Bradford, M.M. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.

¹⁶⁶ Blumenkratz, N.; Asboe-Hansen, G. *Anal. Biochem.* **1973**, 54, 484-489.

nm¹⁶⁴. Sob condições ácidas, aldopentoses e cetopentoses são rapidamente desidratadas formando furfural. Dissacarídeos e polissacarídeos podem, primeiramente, ser hidrolisados em meio ácido formando monossacarídeos os quais reagem gerando furfural ou 5-hidroximetilfurfural (Figura 63) (Pavia *et al*, 1982)¹⁶⁷.

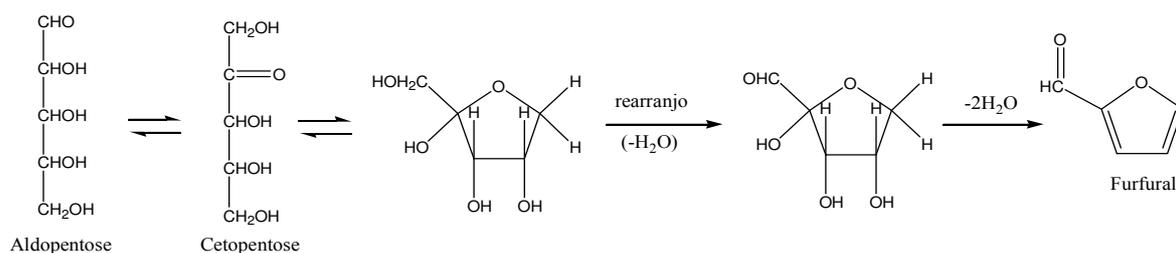


Figura 63. Reação de desidratação de pentoses e aldopentoses em meio ácido¹⁶⁷.

O furfural formado reage com o fenol cujo produto da condensação entre ambos é responsável pela geração de cor alaranjada (Figura 64). As cores e as velocidades de formação destas cores são usualmente aplicadas na diferenciação entre teores de carboidratos presentes em amostras de EPS^{164,167}.

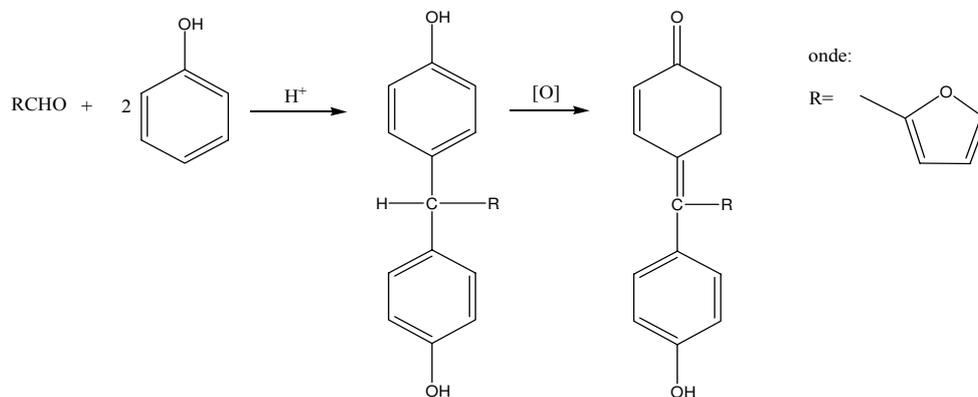


Figura 64. Produto formado a partir da reação entre furfural e fenol¹⁶⁷.

¹⁶⁷ Pavia, R.L.; Lampman, G.M.; Kriz, G.S.Jr.; *Introduction to Organic Laboratory Techniques a Contemporary Approach*, 2th ed., Saunders college Publishing: Washington, 1982.

Tendo-se os valores, em termos de concentração de glicose equivalentes, em mg/mL, determinando-se o teor de carboidratos presentes no total de EPS produzidos pelas linhagens (item 5.3.4, Parte Experimental), frente aos diferentes substratos avaliados (Tabela 9).

Tabela 9. Teor de carboidratos (mg/mL) dos EPS bacterianos produzidos frente aos diferentes substratos avaliados

Bactérias Avaliadas	HIDROCARBONETOS AVALIADOS		
	Fenantreno	Octadecano	Fenantreno + Octadecano
<i>Microbacterium sp.</i>	54,08	13,75	ND
<i>Dietzia sp.</i>	6,52	15,21	12,43
<i>Bacillus subtilis</i>	29,99	36,73	5,99
<i>Micrococcus sp</i>	16,07	15,14	11,44
<i>Halomonas sp</i>	113,5	19,04	163,22
<i>Brevibacillus sp</i>	37,3	27,91	21,07
<i>Bacillus pumilus</i>	34,74	9,36	27,12
<i>Pseudomonas sp</i>	164,15	79,52	13,31
<i>Bacillus megaterium</i>	22,43	14,96	0,41
<i>Bacillus sp</i>	83,95	54,2	0,52

Lacunas em azul correspondem aos melhores resultados obtidos, frente aos diferentes substratos avaliados.

ND: valores não determinados.

Para a determinação do teor de proteínas dos EPS microbianos utilizou-se soluções de albumina de soro bovino (BSA), como padrão para a construção da curva de calibração (item 5.3.4, Parte Experimental). Os mesmos cálculos descritos para determinação do teor de carboidratos, foram também aplicados para a averiguação do teor de proteínas, entretanto, não foi observada a presença das mesmas nos EPS produzidos pelos microrganismos frente aos hidrocarbonetos avaliados.

Os teores de ácidos urônicos foram determinados pelo preparo das amostras de EPS, segundo metodologia descrita por Blumenkratz e Asboe

(1973)¹⁶⁶ (item 5.3.4, Parte Experimental), aferições espectrofotométricas dos valores de absorvância a 520 nm e cálculos para a determinação de tais compostos a partir de curva de calibração utilizando-se ácido galacturônico como padrão nas mesmas concentrações descritas para BSA. Entretanto, determinou-se que os exopolímeros microbianos produzidos, utilizando-se octadecano e/ou fenantreno como fontes de carbono, eram livres de ácidos urônicos, podendo constituir-se basicamente de carboidratos.

Os resultados apresentados na Tabela 9 mostram que os microrganismos tidos como melhores produtores de EPS, segundo demonstrado anteriormente no item 3.3.1, frente aos diferentes substratos adicionados como fontes de carbono, não correspondem às linhagens que apresentaram os maiores valores em termos de concentração de carboidratos, utilizando-se os mesmos substratos. *Bacillus subtilis*, por exemplo, foi o melhor produtor de EPS quando utilizou-se fenantreno ou octadecano, como fontes de carbono, entretanto, quando determinou-se o teor de carboidratos dos exopolímeros microbianos, verificou-se que a linhagem de *Pseudomonas* sp., apresentou os maiores índices de açúcares produzidos. *Halomonas* sp., por sua vez, apresentou os maiores teores de carboidratos nos EPS, produzidos pela linhagem, quando cultivada em meio mineral contendo a mistura entre octadecano e fenantreno como substratos. É interessante ressaltar que bactérias do gênero *Halomonas* são intensamente descritas por grupos de pesquisas em produção microbiana de EPS^{44,70}, como excelentes produtoras de emulsificantes, quando em meio contendo hidrocarbonetos ou mesmo óleo bruto, como fontes de carbono ao crescimento microbiano.

3.3.3. BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS

O crescimento de microrganismos utilizando-se hidrocarbonetos é freqüentemente associado à produção de compostos que podem emulsificar tais compostos hidrofóbicos, tornando-os mais acessíveis ao metabolismo microbiano^{71,73}. Através dos resultados apresentados nos itens 3.3.1 e 3.3.2, pôde-se verificar aspectos sobre a produção de emulsificantes e crescimento microbiano, os quais não se encontram inter-relacionados. Entretanto, buscando-se investigar se a produção de emulsificantes teria alguma correlação com a biodegradação de hidrocarbonetos, realizou-se análises para determinar os perfis cromatográficos ao início e ao término dos experimentos realizados (ítem 5.3.6, Parte Experimental). Avaliou-se as culturas que se apresentaram tanto, como excelentes produtoras de EPS, quanto as linhagens que apresentaram os maiores índices de crescimento microbiano frente aos hidrocarbonetos, *n*-octadecano e fenantreno.

A Tabela 10 apresenta os valores das taxas de biodegradação dos hidrocarbonetos, tanto em mistura, quanto isoladamente, em tempo 0 e após 4 dias de incubação com as linhagens de *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Dietzia* sp. e *Pseudomonas* sp., lembrando-se que ambas as cepas de *Bacillus* foram as melhores produtoras de EPS, nas condições avaliadas, enquanto *Pseudomonas* sp. e *Dietzia* sp. apresentaram os maiores incrementos da densidade celular microbiana no decorrer do período avaliado.

Tabela 10. Taxas de biodegradação dos hidrocarbonetos, tanto isoladamente, quanto em mistura, pelas bactérias que sobressaíram quanto à produção de EPS, ou crescimento microbiano junto aos substratos avaliados

Taxas de biodegradação (%) e Produção de EPS (mg/g células)						
Microrganismos selecionados	Hidrocarbonetos avaliados					
	Fenantreno	EPS	Octadecano	EPS	Fenantreno /Octadecano	EPS
<i>Bacillus subtilis</i>	97	36,5	ND	27,33	ND	11,33
<i>Bacillus megaterium</i>	ND	19,2	ND	6,29	ND	69,33
<i>Dietzia sp.</i>	ND	4,94	99	1,44	98 / 98	1,71
<i>Pseudomonas sp.</i>	ND	0,15	98	0,14	100 / 100	0,26

ND = Taxas de de biodegradação não detectados.

Taxas de biodegradação calculadas segundo as Equações 1 e 2, descritas no ítem 3.2.2.1, Parte Experimental.

As taxas de biodegradação da mistura de hidrocarbonetos (fenantreno e octadecano), foram expressas como valores individuais de degradação de cada um dos compostos.

Bacillus subtilis foi o melhor produtor de EPS com fenantreno como substrato. Avaliando-se a atividade biodegradadora da linhagem frente ao aromático, observou-se que a mesma degradou 97% do composto adicionado como fonte de carbono ao meio mineral onde foi cultivada.

Entretanto, a mesma linhagem não biodegradou o mesmo hidrocarboneto, quando em mistura com octadecano, apresentando assim seletividade ao metabolismo do aromático apenas. Espécies de *Bacillus* foram também descritas por Doddamani e Ninnekar (2000)¹⁶⁸, quanto a capacidade à biodegradação de fenantreno, como única fonte de carbono e energia. Tais

¹⁶⁸ Doddamani, H. P.; Ninnekar, H.Z. *Curr. Microbiol.* **2000**, *41*, 11-14.

bactérias são degradadoras versáteis de compostos aromáticos, a partir da oxidação dos mesmos (Kiyohara e Nagao, 1977¹⁶⁹; Ghosh e Mishra, 1983¹⁷⁰).

Bacillus megaterium, por outro lado, apresentou os melhores índices de produção de EPS, na presença da mistura de fenantreno e octadecano, como fontes de carbono, mas não degradou nenhum destes hidrocarbonetos quando foram fornecidos puros.

Bacillus subtilis e outras linhagens de bactérias do gênero *Bacillus* são bem conhecidas por produzir lipopeptídeos como biossurfactantes. Entretanto, *Bacillus* de diferentes espécies podem produzir bioemulsificantes de composições totalmente distintas entre si, com propriedades completamente diferentes, e com afinidades diversas por substratos, o que poderia justificar o fato de bactérias do mesmo gênero apresentarem perfis distintos de degradação dos hidrocarbonetos avaliados⁶⁹.

Ambas as bactérias, ou seja, *Dietzia* sp. e *Pseudomonas* sp., as quais apresentaram os melhores índices de aumento da densidade celular na presença do octadecano, ou da mistura de fenantreno e octadecano, também demonstraram as maiores taxas de degradação destes substratos.

Dietzia sp. quando avaliada em relação à síntese de EPS, na presença de octadecano ou da mistura de hidrocarbonetos, não demonstrou grande produção de emulsificantes, se comparada à *B. subtilis* ou *B. megaterium*, por exemplo. Entretanto, após as análises cromatográficas, por CG-EM, para a verificação do potencial das linhagens à biodegradação dos hidrocarbonetos, tanto *Dietzia* sp., quanto *Pseudomonas* sp. apresentaram taxas entre 98 e 100% de depleção do conteúdo de octadecano, ou da mistura avaliada

¹⁶⁹ Kiyohara, H.; Nagao, K. *Agric. Biol. Chem.* **1977**, *41*, 705-707.

¹⁷⁰ Ghosh, D.K.; Mishra, A.K. *Curr. Microbiol.* **1983**, *9*, 219-224.

(Tabela 10), confirmando a intensa habilidade degradadora de ambas as linhagens.

Através dos resultados obtidos, pôde-se observar que ambas as bactérias, *Dietzia* sp. e *Pseudomonas* sp., degradaram seletivamente o fenantreno, quando em mistura com o octadecano, o que é um comportamento inverso ao normalmente descrito pela literatura⁵, onde a biodegradação de inicia por compostos lineares.

Os produtos gerados a partir do metabolismo microbiano não foram detectados uma vez que tais análises para a verificação do potencial biodegradador das linhagens já haviam sido realizadas, conforme descrito no Capítulo 2. Entretanto, as metodologias de cultivo dos microrganismos (item 5.3.3, Parte Experimental) e análises cromatográficas foram distintas (Esquema 2, item 5.2.2, Parte Experimental), ou seja, utilizou-se hexano como eluente dos compostos orgânicos presentes no meio reacional, ao início e ao término dos experimentos realizados, extraíndo-se apenas os hidrocarbonetos metabolizados pelas linhagens, mas não os compostos polares (ácidos carboxílicos de cadeia longa; produtos da oxidação do fenantreno; álcoois) resultantes da biotransformação dos mesmos. Assim, embora tenha-se obtido excelentes resultados (acima de 97%) quanto à biodegradação dos hidrocarbonetos avaliados, não se pode afirmar que tenha ocorrido a mineralização dos mesmos, ou seja, a formação de CO₂ e água, uma vez que análises quanto à habilidade das bactérias a assimilar tais hidrocarbonetos como compostos de membrana, não foram realizadas.

3.3.I. CONCLUSÕES PARCIAIS – CAPÍTULO 3

I) Os resultados obtidos estão em conflito com os dados da literatura^{63,64,65}, que definem a maior produção de EPS, como resultado do aumento da densidade celular microbiana. Acredita-se, que a maior produção de EPS seria como um mecanismo de defesa microbiana, ou seja, a bactéria que não consegue degradar os substratos disponíveis, produziria exopolímeros, no intuito de torná-los mais acessíveis ao seu próprio consumo, ou à utilização por outras bactérias, as quais gerariam metabólitos passíveis de serem metabolizados pelas linhagens não degradadoras. Observou-se que bactérias que foram descritas no Capítulo 2, do presente trabalho de tese, como excelentes biodegradadoras, não mostraram bons rendimentos quanto à produção de EPS;

II) A partir dos resultados obtidos, tanto no que se refere à produção de exopolímeros microbianos, quanto no aumento da densidade celular, em função da biodegradação de hidrocarbonetos, pode-se afirmar que a habilidade de degradar estes compostos, pode estar associada tanto ao seu consumo como fonte de carbono e energia, promovendo o crescimento microbiano, assim como à sua aplicação para a produção de bioemulsificantes, os quais tornariam tais hidrocarbonetos, mais acessíveis ao metabolismo microbiano e conseqüente biodegradação dos mesmos;

III) O intuito da realização do presente estudo foi investigar sobre o potencial das linhagens bacterianas isoladas a partir de amostras de reservatório de petróleo brasileiro, à produção de exopolímeros que possam

ser futuramente aplicados na recuperação de petróleo biodegradado, ou biorremediação de locais contaminados, tratando-se assim de uma pesquisa pioneira em termos nacionais, abrindo caminhos para novos trabalhos que ainda serão realizados no Instituto de Química da Unicamp.

3.4. CAPÍTULO 4 – ENSAIOS DE TRIAGEM ENZIMÁTICA DE ALTO DESEMPENHO

Este capítulo refere-se aos resultados obtidos através da execução da etapa 4, descrita como último objetivo específico do presente trabalho.

3.4.1. DETECÇÃO DA ATIVIDADE DE EPÓXIDO HIDROLASES

Em virtude da reatividade intrínseca dos anéis de epóxidos, tais são valiosos intermediários na produção de compostos enantiomericamente puros para a indústria farmacêutica (Vries & Janssen, 2003)¹⁷¹. A utilização de biocatalisadores na conversão enzimática de epóxidos reduz os custos de produção, emissão de efluentes tóxicos e uso de técnicas dispendiosas.

Para a detecção da atividade de epóxido hidrolases nas 29 linhagens bacterianas de petróleo brasileiro, foram utilizadas duas sondas fluorogênicas, denominadas como EP1 e EP2 (Figura 65). Os substratos foram sintetizados e gentilmente cedidos pela Dra. Lu Shi Chen e Dra. Luciana Gonzaga de Oliveira.

¹⁷¹ Vries, E. J., Janssen, D. B. *Curr. Opin. in Biotechnol.* **2003**, *14*, 414-420.

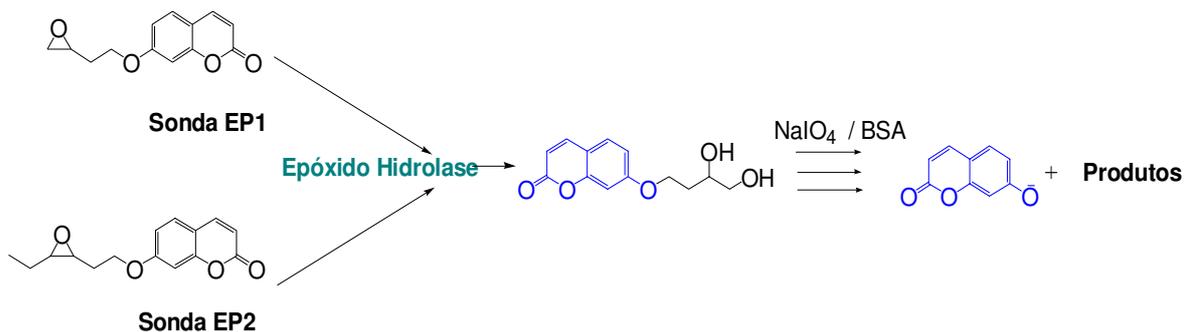


Figura 65. Sondas fluorogênicas avaliadas e reações para a detecção da atividade enzimática microbiana de epóxido hidrolases.

Dentre os 29 microrganismos avaliados (Capítulo 1, Tabela 3), 5 apresentaram-se enzimaticamente ativos sobre as sondas investigadas (Figura 66, Tabela 11). O desempenho enzimático foi classificado em 3 níveis com base nos valores da intensidade de fluorescência emitida, após a liberação de umbeliferona:

Nível 1: valores entre 100 e 200

Nível 2: valores entre 200 e 500

Nível 3: acima de 500.

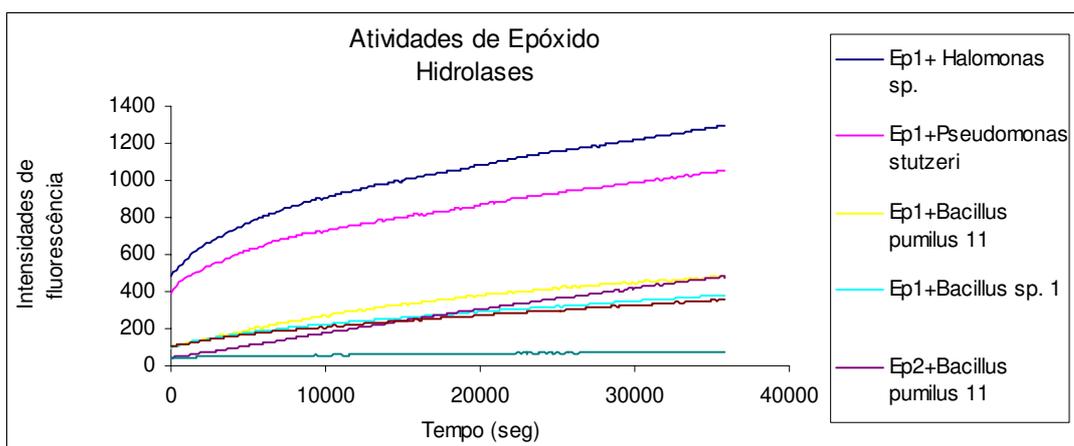


Figura 66. Atividades enzimáticas microbianas de epóxido hidrolases sobre as sondas avaliadas.

É importante ressaltar as excelentes atividades (Nível 3) de epóxido hidrolase, para a sonda Ep1, apresentadas pelas bactérias *Halomonas* sp e *Pseudomonas stutzeri*.

Ambas as linhagens foram isoladas de amostras de águas de formação de reservatórios de petróleo, cujas condições de sobrevivência são ditas como extremas, ou seja, altas pressões e temperaturas, períodos de anóxia, pHs variáveis, alta salinidade, o que pode determinar tais bactérias como extremófilas ¹⁰. É importante ressaltar ainda, que este é o primeiro relato de detecção de atividade enzimática de epóxido hidrolase de bactéria do gênero *Halomonas* sp.

Linhagens do gênero *Pseudomonas* são muito descritas como eficientes biodegradadoras de hidrocarbonetos. Linhagens deste gênero já foram relatadas quanto à capacidade de promover a conversão de epoxisuccinato em ácido tartárico, onde vale ressaltar que succinato constitui metabólito amplamente descrito como metabólito microbiano proveniente da biotransformação de hidrocarbonetos ^{43,91}.

A aplicação de epóxido hidrolases de bactérias provindas de reservatórios de petróleo torna-se industrialmente interessante, pelo fato de que tais enzimas são provindas de microrganismos vindos de condições ambientais tidas como extremas, onde as enzimas produzidas pelos mesmos poderiam, teoricamente, suportar condições reacionais mais drásticas.

3.4.2. DETECÇÃO DAS ATIVIDADES DE ESTERASES E LIPASE

Para a detecção da atividade enzimática de esterases e lipases, presentes nas linhagens aeróbias do petróleo da Bacia de Campos foram utilizadas sondas fluorogênicas, as quais foram denominadas como ES1 e ES2, para a determinação de esterases e LIP1 para lipases. Estes substratos foram sintetizados e gentilmente cedidos pela Dra. Luciana Gonzaga de Oliveira (Figura 67).

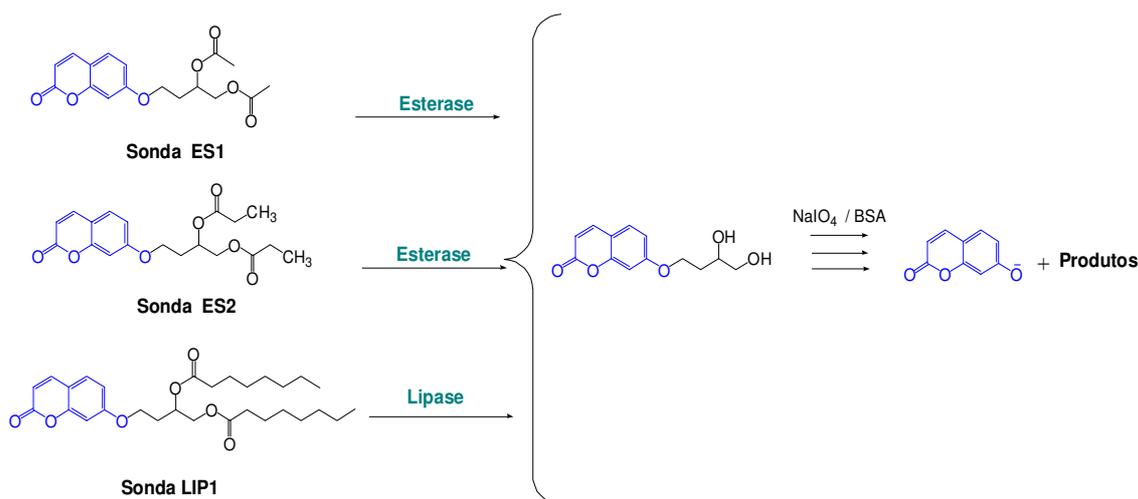


Figura 67. Sondas fluorogênicas avaliadas e reação para a detecção da atividade enzimática microbiana de esterases (ES1 e ES2) e lipase (LIP1).

Dentre os 29 microrganismos investigados, 10 apresentaram atividades de esterases sobre a sonda ES1 e 15 bactérias tiveram melhor desempenho atuando sobre o substrato ES2 (Figura 68, Tabela 11).

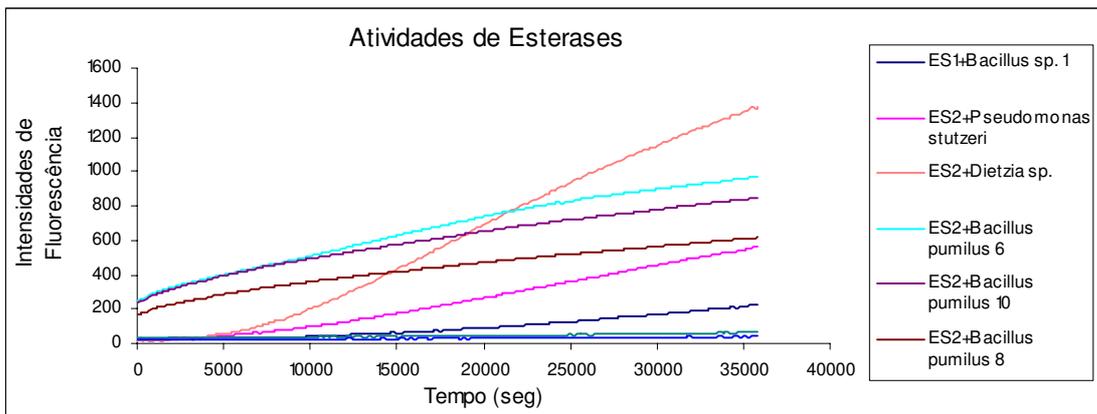


Figura 68. Atividades enzimáticas de esterases das bactérias que apresentaram desempenhos de níveis 2 e 3, sobre as sondas ES1 e ES2.

Com relação à atividade de lipase, 12 bactérias apresentaram-se enzimaticamente ativas sobre o substrato LIP1 (Figura 69, Tabela 11).

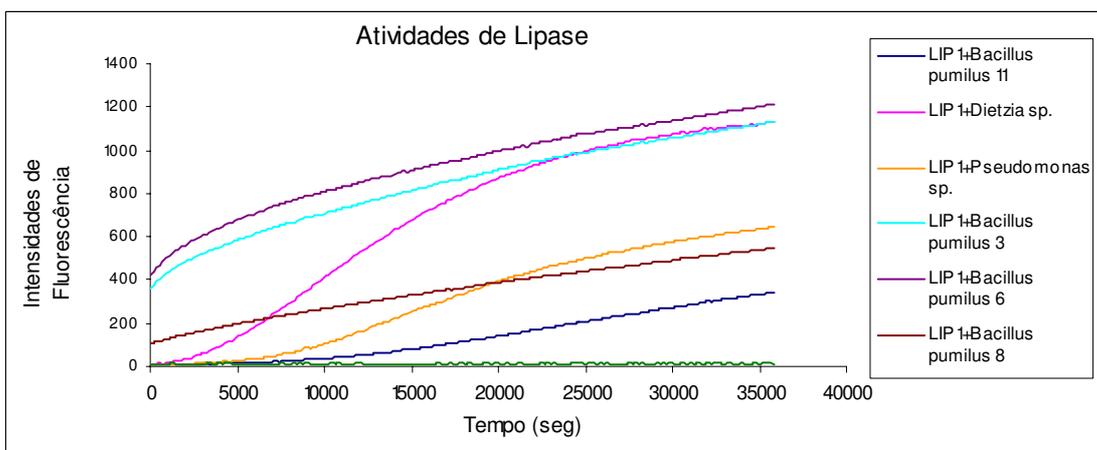


Figura 69. Atividades enzimáticas de lipase das bactérias que apresentaram desempenhos de níveis 2 e 3, sobre a sonda LIP1.

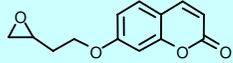
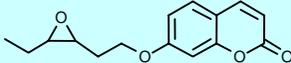
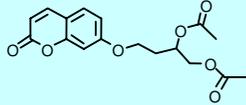
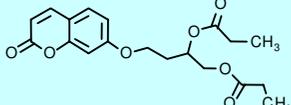
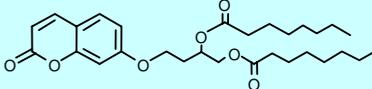
Dietzia sp. sobressaiu-se tanto com relação à atividade de esterase (sonda ES2), quanto lipase (LIP1), demonstrando maior habilidade a catalisar a hidrólise de ésteres com substituintes mais volumosos.

Bacillus sp. 1 apresentou os melhores resultados frente à sonda ES1. Observou-se ainda que a grande maioria dos microrganismos avaliados quanto

à atividade enzimática de esterase, apresentaram, assim como *Dietzia* sp., melhores desempenhos sobre a sonda ES2.

As esterases são enzimas encontradas em vários organismos, catalisando a hidrólise de ésteres aos ácidos carboxílicos e álcoois correspondentes. Devido às extensas aplicações das esterases em hidrólises estereosseletivas, transesterificações e síntese de ésteres, e das lipases, principalmente na catálise de hidrólises de triglicerídeos de cadeia longa, a importância destas enzimas vêm crescendo rapidamente, tanto biotecnológica quanto industrialmente^{95,96}.

Tabela 11. Intensidades relativas de fluorescência das biorreações com os microrganismos que apresentaram atividade enzimáticas de hidrolases.

Bactérias	Substratos				
	EP1 	EP2 	ES1 	ES2 	LIP1 
Controle	357	74	63	39	12
Halomonas sp.	1297	ND	ND	ND	ND
Pseudomonas stutzeri	1055	ND	ND	561	ND
Pseudomonas sp.	ND	ND	ND	ND	643
Dietzia sp.	ND	117	135	1373	1133
Bacillus sp. 1	382	ND	222	98	ND
Bacillus sp. 2	ND	ND	ND	84	ND
Bacillus megaterium 2	ND	ND	ND	106	ND
Bacillus megaterium 3	ND	ND	ND	164	ND
B. pumilus 1	ND	ND	66	82	146
B. pumilus 3	ND	ND	133	224	1133
B. pumilus 4	ND	ND	ND	142	175
B. pumilus 5	ND	ND	ND	57	ND
B. pumilus 6	ND	ND	188	970	1215
B. pumilus 7	ND	ND	73	235	172
B. pumilus 8	ND	ND	104	614	546
B. pumilus 9	ND	ND	83	151	138
B. pumilus 10	ND	ND	124	847	270
B. pumilus 11	477	479	123	ND	344

3.4.3. DETECÇÃO DA ATIVIDADE DE BAEYER-VILLIGER MONOOXIGENASES

Oxidações de Baeyer-Villiger mediadas por enzimas constituem uma grande ferramenta à Química Verde na produção de lactonas quirais. Muitos organismos têm sido descritos como catalisadores destas reações, onde as monooxigenases microbianas vêm ganhando destaque na produção de vários intermediários quirais para a indústria^{87,88}.

No presente trabalho, foram investigadas 4 sondas fluorogênicas, denominadas como S1, S2, S3 e S4 (Figura 70), as quais foram sintetizadas e gentilmente cedidas pelo grupo do Prof. Dr Jean L. Reymond (Universidade de Bern, Suíça).

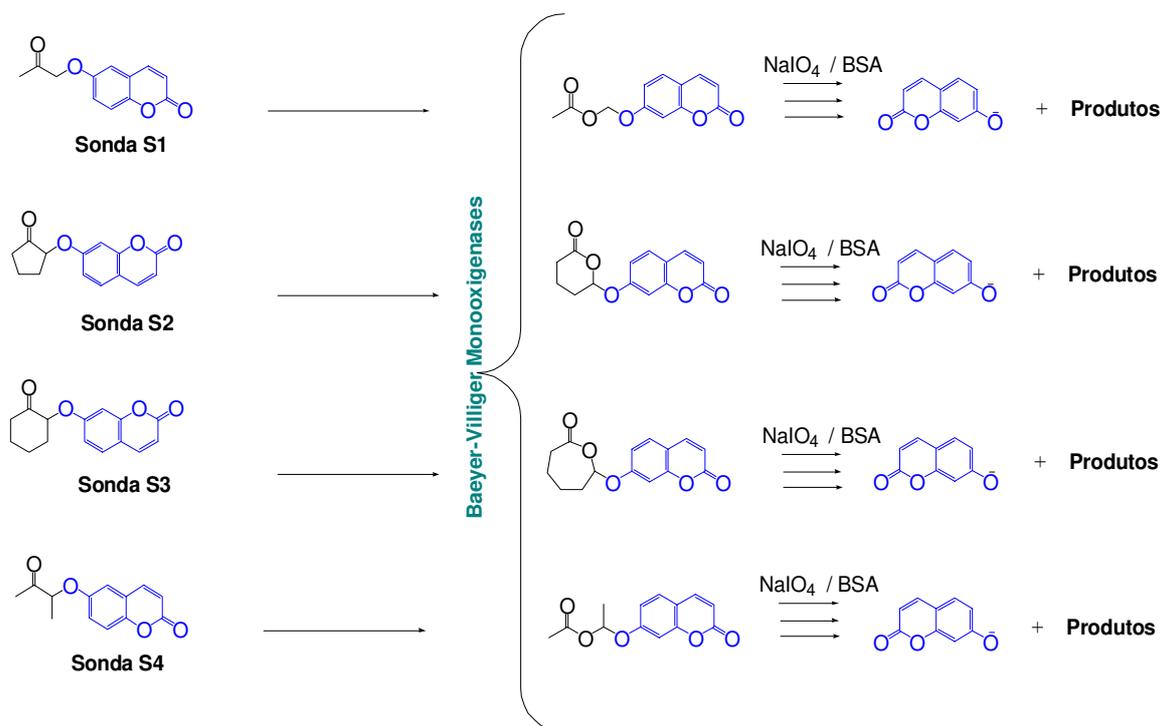


Figura 70. Sondas fluorogênicas avaliadas e reações para a detecção da atividade enzimática microbiana de Baeyer-Villiger monooxigenases.

Dentre os 29 microrganismos avaliados, 19 cepas apresentaram atividades moderadas de monooxigenases sobre as sondas S1, S2 e S4 (Figura 71, Tabela 12).

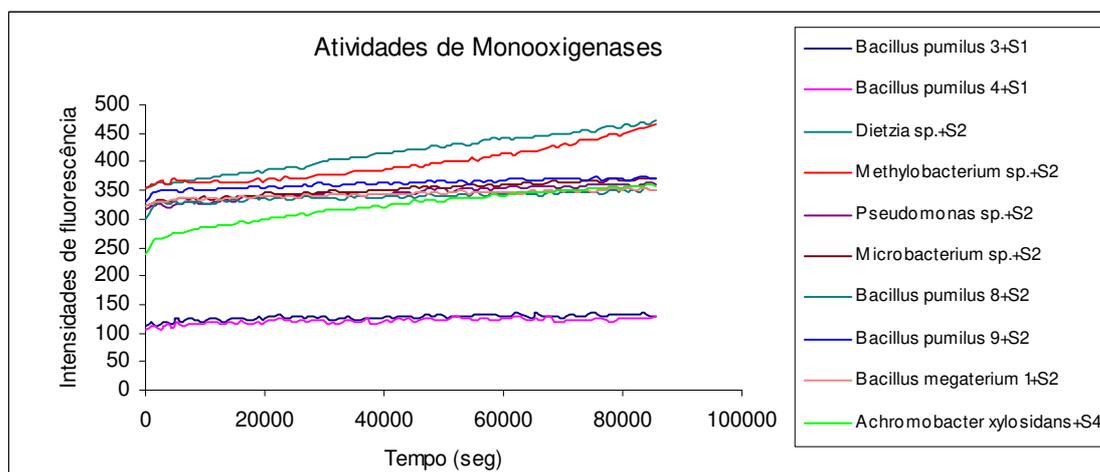


Figura 71. Atividades enzimáticas de Baeyer-Villiger monooxigenases das bactérias que apresentaram desempenhos de níveis 1 e 2, sobre as sondas S1 e S2.

Todos os microrganismos avaliados apresentaram resultados moderados (níveis 1 e 2), ou até mesmo nulos, sobre as sondas para a detecção das atividades de monooxigenases. Dentre as linhagens que apresentaram desempenhos moderados, *Dietzia sp.* e *Methylobacterium sp.* se sobressaíram, tendo demonstrado as maiores atividades enzimáticas detectadas frente à sonda S2.

Torna-se importante ressaltar que a bactéria *Dietzia sp.* apresentou atividade biodegradadora sobre as diferentes classes de biomarcadores avaliados nos experimentos descritos, anteriormente, no Capítulo 2. A mesma bactéria apresentou boa atividade enzimática para esterases, lipases e monooxigenases. Desta forma, *Dietzia sp.*, uma bactéria provinda de amostra de óleo biodegradado da Plataforma Pampo, pode constituir morfotipo intimamente envolvido nos processos de biodegradação do petróleo deste

reservatório brasileiro. A sonda S3 não foi o substrato de escolha de nenhum dos microrganismos avaliados, provavelmente devido a fatores termodinâmicos, ou seja, para que ocorra a formação de uma lactona de 7 membros, a energia de ativação necessária é bem maior se comparada às demais lactonas formadas pelos demais substratos avaliados (S1, S2 e S4).

Tabela 12. Intensidades relativas de fluorescência das biorreações com os microrganismos que apresentaram atividades enzimáticas de monooxigenases.

Bactérias				
	S1	S2	S3	S4
Controles	109	250	95	325
<i>Brevibacillus</i> sp.	ND	ND	ND	341
<i>B. subtilis</i>	ND	ND	ND	327
<i>B. pumilus</i> 3	131	ND	ND	ND
<i>B. pumilus</i> 4	130	ND	ND	ND
<i>B. pumilus</i> 5	113	ND	ND	ND
<i>B. pumilus</i> 7	ND	331	ND	ND
<i>B. pumilus</i> 8	ND	350	ND	ND
<i>B. pumilus</i> 9	ND	372	ND	ND
<i>B. pumilus</i> 10	ND	351	ND	ND
<i>B. pumilus</i> 11	ND	338	ND	ND
<i>B. pumilus</i> 12	ND	314	ND	ND
<i>B. megaterium</i> 1	119	352	ND	ND
<i>B. megaterium</i> 2	120	295	ND	ND
<i>B. megaterium</i> 3	125	308	ND	ND
<i>Bacillus</i> sp. 3	133	308	ND	ND
<i>Dietzia</i> sp.	170	473	ND	ND
<i>Methylobacterium</i> sp.	ND	468	ND	ND
<i>Pseudomonas</i> sp.	ND	362	ND	ND
<i>Microbacterium</i> sp.	ND	371	ND	ND

3.4.I. CONCLUSÕES PARCIAIS – CAPÍTULO 4

- I) ES2 foi o substrato de escolha para a grande maioria das bactérias avaliadas, quanto à atividade enzimática de esterases. *Dietzia* sp. apresentou-se enzimaticamente ativa, demonstrando excelentes resultados tanto sobre a sonda ES2 quanto sobre LIP1;
- II) *Pseudomonas stutzeri* e *Halomonas* sp. apresentaram os melhores resultados frente à sonda EP1, para a detecção de epóxido hidrolases, onde EP2, constituída por um epóxido dissustituído não foi o substrato de escolha para 4, dentre os 5 microrganismos enzimaticamente ativos. *Dietzia* sp., novamente se sobressaiu quanto à atividade de Baeyer-Villiger monooxigenases, sobre a sonda S2. Este fato é consistente com o ambiente do qual a bactéria foi isolada, ou seja, amostra de óleo biodegradado, indicando que monooxigenases estão realmente associadas aos mecanismos de biodegradação do petróleo. Dentre os 29 microrganismos investigados, 10 apresentaram atividades moderadas de monooxigenases, sendo que a sonda S3 não foi o substrato de escolha para nenhuma das linhagens.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Este estudo possibilitou o isolamento de 92 morfotipos bacterianos aeróbios (29 bactérias, Coleta 1; 63 linhagens, Coleta 2) provindos de poços de petróleo do campo Pampo, da Bacia de Campos. Identificou-se, através de análises do DNAr 16S, 29 cepas, estabelecendo-se assim um perfil microbiológico das comunidades aeróbias cultiváveis predominantes neste reservatório.

A partir dos cultivos realizados para o enriquecimento da microbiota anaeróbia presente nas amostragens realizadas, verificou-se a predominância do gênero *Petrotoga*, uma bactéria anaeróbia estrita, comumente descrita em reservatórios de petróleo. Perfis de restrição de bactérias oxidantes de metano também foram recuperados, entretanto não foi possível a identificação das mesmas quanto ao gênero bacteriano.

Verificou-se a predominância de bactérias do gênero *Bacillus* na população microbiana do reservatório investigado, o que nos levou à realização de experimentos (antibiogramas e MIC) para análises sobre a produção de metabólitos secundários microbianos que atuassem como “venenos naturais” nos poços de petróleo, inibindo o crescimento de outras espécies bacterianas. Através dos resultados obtidos, determinou-se que linhagens do gênero *Bacillus* realmente produziam compostos com atividade antibiótica.

Avaliando-se atividade biodegradadora das 29 linhagens aeróbias identificadas, detectou-se perfis distintos de atividade biotransformadora dos compostos investigados, onde observou-se que de modo geral, quando adicionava-se ácido nonadecanóico como um dos substratos ao metabolismo microbiano, tal iniciava-se pela biotransformação do ácido à outros compostos

também oxigenados (álcoois, ácidos, cetonas), promovendo a síntese de paredes celulares microbianas ou a produção de exopolímeros, como tentativa de dar início aos mecanismos de biodegradação dos hidrocarbonetos, também adicionados ao meio reacional. Entretanto, verificou-se que também havia exceções, ou seja, linhagem de *Micrococcus* sp. degradou hidrocarbonetos, preferencialmente fitano, mesmo em presença de ácido nonadecanóico, podendo constituir morfotipo aeróbio de grande atuação na biodegradação de hidrocarbonetos em reservatórios de petróleo.

Em experimentos para análises da biodegradação anaeróbia de biomarcadores do petróleo, observou-se uma preferência da microbiota avaliada pelos compostos oxigenados, em relação aos hidrocarbonetos, estabelecendo-se evidências à hipótese em estudo, ou seja, a microbiota aeróbia inicializaria os processos de biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo, produzindo ácidos e demais compostos oxigenados os quais seriam então metabolizados pela microbiota anaeróbia, havendo períodos de aerobiose e anaerobiose nos reservatórios.

De forma a constatar sobre a existência destas interações realizou-se também experimentos de biodegradação envolvendo períodos de aerobiose e anaerobiose, avaliando-se os produtos da biotransformação de uma mistura de biomarcadores, frente às microbiotas aeróbias e anaeróbias recuperadas a partir do campo Pampo. Os resultados obtidos comprovaram tal hipótese, onde somente observou-se a biodegradação efetiva (77%) do ácido nonadecanóico, enquanto diidrofenantreno, um dos hidrocarbonetos avaliados na mistura, somente foi biodegradado (25%) durante o período em que os meios reacionais encontravam-se em aerobiose.

A determinação da produção de exopolímeros por linhagens representativas da microbiota aeróbia do campo Pampo, confrontada a

resultados de análises para a verificação da atividade biodegradadora de hidrocarbonetos das mesmas cepas, trouxe resultados inovadores a conceitos pré-estabelecidos pela literatura de referência, ou seja, constatamos que linhagens tidas como ótimas produtoras de emulsificantes, não necessariamente são biodegradadoras de hidrocarbonetos, entretanto, ambas as atividades estão correlacionadas à biodegradação de petróleo, pois acreditamos que em condições de reservatório, a atividade degradadora de determinadas bactérias inicia-se após a emulsificação dos óleos por bactérias produtoras de bioemulsificantes.

A aplicação de ensaios de HTS permitiu a triagem rápida, precisa e eficiente das atividades enzimáticas de lipases, esterases, epóxido hidrolases e monooxigenases, das 29 culturas bacterianas isoladas a partir de amostras do petróleo do campo Pampo. Através dos excelentes resultados obtidos quanto às atividades de esterases, lipases e epóxido hidrolases detectadas para alguns dos microrganismos avaliados, abriu-se-se novas perspectivas a futuros estudos que visem a aplicação destas enzimas tanto para uso industrial ou ambiental.

A interdisciplinaridade do trabalho realizado, aliando conhecimentos em Química, Biogeoquímica e Microbiologia, abriu caminhos para novos estudos a serem realizados no Instituto de Química, Unicamp, trazendo maiores esclarecimentos sobre os mecanismos atuantes na biodegradação do petróleo, incluindo tanto a atividade enzimática dos microrganismos envolvidos, assim como preferências microbianas a determinados biomarcadores do petróleo, linhagens produtoras de “venenos biológicos” e ainda, sobre a produção de bioemulsificantes que possam atuar tanto na biorremediação, quanto na recuperação de petróleo biodegradado.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5. PARTE EXPERIMENTAL

PROCEDIMENTOS GERAIS ADOTADOS NO LABORATÓRIO DE BIOCATÁLISE (LABIOSIN – IQ, UNICAMP)

Os reagentes e solventes utilizados foram analiticamente puros e/ou indicados pelos fabricantes para o uso em laboratório. A vidraria foi lavada e seca, sendo então envolvida em papel Kraft ou alumínio, seguindo-se à esterilização em autoclave a 121 °C, 1 atm, por 30 minutos, ou em estufa de esterilização, durante 2 horas a 180 °C. Todos os materiais utilizados com microrganismos e, portanto contaminados, foram primeiramente imersos em solução de hipoclorito de sódio 5% durante duas horas, seguindo-se à esterilização em autoclave a 121 °C, 1 atm, por 40 minutos.

Todos os meios de cultura e soluções foram autoclavados a 121 °C, 1 atm, durante 20 minutos. No caso dos frascos de centrífuga, tais foram submetidos à imersão em solução de hipoclorito de sódio 5%, durante 30 minutos, enxágüe em água corrente seguido por água destilada, sendo submetidos à radiação UV, durante 30 minutos, imediatamente antes de seu uso.

As soluções de álcool 70% e hipoclorito de sódio 5% foram utilizadas para a desinfecção de bancadas de trabalho e câmaras de fluxo laminar. Todas as manipulações, sob aerobiose, foram realizadas em câmaras de fluxo laminar, enquanto os procedimentos que exigiam anaerobiose foram realizados sob fluxo positivo de N₂ (1L/min), utilizando-se bico de Bunsen para manutenção de zona estéril de trabalho.

5.1. CAPÍTULO 1 – ENRIQUECIMENTOS E CARACTERIZAÇÕES DE LINHAGENS MICROBIANAS AERÓBIAS E ANAERÓBIAS

5.1.1. ÁREA DE ESTUDO E COLETA DAS AMOSTRAS

Na Bacia de Campos, o petróleo foi gerado a partir de sedimentos do período pós-Neocomiano, representados por folhelhos argilosos calcáreos, depositados em um sistema lacustre fechado com água salina alcalina. As condições anóxicas extremas do ambiente lacustre resultaram no depósito de rochas orgânicas ligeiramente laminadas, compostas por matéria orgânica de alta qualidade, principalmente querogênio Tipo I derivado de algas ricas em lipídeos e materiais bacterianos (Bertani e Carozzi, 1985¹⁷²; Mello *et al.*, 1988¹⁷³).

Amostras de águas de formação de petróleo e óleos brutos, sob diferentes estágios de biodegradação e profundidades, foram coletadas em maio de 2002 (Coleta 1) e, posteriormente, em julho de 2005 (Coleta 2), na Plataforma Pampo, Bacia de Campos, RJ (Figura 72).

¹⁷² Bertani, R.T.; Carozzi, A.V. J.; *Petrol. Geol.* **1985**, 8, 37-58, 199-220.

¹⁷³ Mello, M.R.; Gaglianone, P.C.; Brassell, S.C.; Maxwell, J.R.; *Mar. Petrol. Geol.* **1988**, 5, 205-223.



Figura 72. Coleta das amostras na Plataforma Pampo.

Esta plataforma foi selecionada dentre as plataformas de produção da Petrobrás por concentrar diversos poços em atividade, com propriedades distintas de interesse para a proposta do projeto, incluindo: poços profundos com óleo não-biodegradado, poços com óleo altamente biodegradado e poços com grau de biodegradação intermediário.

Em maio de 2002, 3 amostras de óleos, sob diferentes estágios de biodegradação, foram coletadas (Tabela 13).

Tabela 13. Detalhes sobre os poços amostrados na Plataforma Pampo (Coleta 1)

Poços Amostrados	Temperatura (°C)	Profundidade (metros)	Grau de biodegradação
P1	85	3.070-3.240	não biodegradado
P2	71	2.006-2.015	moderadamente biodegradado
P3	62	1.885-1.903	altamente biodegradado

Na coleta de 2002, as amostras de águas de formação de petróleo foram coletadas de dois tanques de separação água/óleo/gás, onde há mistura de óleos de diferentes poços, denominados SEP A e SEP B, e também do Poço 1.

Em julho de 2005, 5 amostras foram coletadas. A Tabela 14 descreve algumas características destas amostras:

Tabela 14. Detalhes sobre os poços amostrados na Plataforma Pampo (Coleta 2)

Poços Amostrados	Temperatura (°C)	Profundidade (metros)	Grau de biodegradação
P1 a	82	2405-2588	Não biodegradado
P2 a	71	1988-2222	Moderadamente biodegradado
P3 a	62	3023	Não biodegradado
P4 a	62	2066	Moderadamente biodegradado
P5 a	85	3070-3286	Não biodegradado

As amostras de águas de formação do petróleo do reservatório foram coletadas a partir de tanque de separação à temperatura de 50 °C. Todas as amostras foram coletadas sob condições de assepsia e armazenadas à temperatura ambiente.

5.1.2. ENRIQUECIMENTOS MICROBIANOS ANAERÓBIOS

Foram realizados com o intuito de recuperar a microbiota anaeróbia cultivável presente em amostras de águas de formação de petróleo e óleos, coletadas na Plataforma Pampo.

5.1.2.1. ENRIQUECIMENTOS DE ARQUÉIAS METANOGÊNICAS

A partir das amostras provenientes das coletas 1 e 2, foram realizados ensaios para o enriquecimento e recuperação da microbiota anaeróbia, utilizando-se o meio Zinder¹¹⁴ (Tabela 15) para o cultivo de arqueias metanogênicas (Domingues, 2001)¹⁷⁴. Os enriquecimentos foram realizados em frascos de penicilina de 50 mL, contendo 30 mL de meio mineral Zinder.

Tabela 15. Composição do meio basal Zinder¹¹⁴

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000 mL de água ultra purificada
NH ₄ Cl	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,05 g
Resazurina 1%	1 mL
Sol. Traço de Metais	10 mL

A solução de metais traço foi preparada pela dissolução de Tritriplex III em água ultra purificada. O pH da solução foi ajustado para 7,0 utilizando-se solução de KOH 10N. Posteriormente, os demais sais foram acrescentados à

¹⁷⁴ Domingues, M.R. *Tese de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2001.

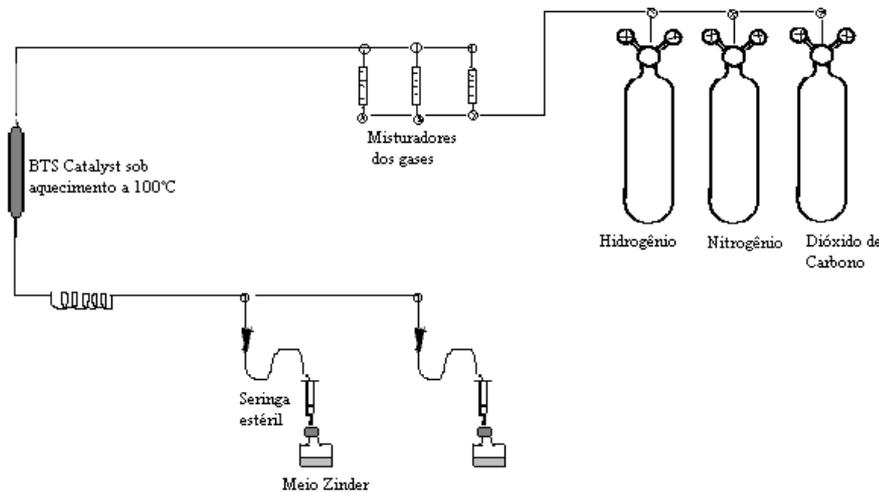
solução, de acordo com a ordem apresentada na Tabela 16. Esta solução foi armazenada no escuro, sob refrigeração (4°C).

Tabela 16. Composição da solução de metais traço¹¹⁴

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000 mL de água ultra purificada
Tritriplex III	4,5 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,5 g
MnSO ₄ . H ₂ O	0,1 g
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,2 g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,2 g
H ₃ BO ₃	0,2 g
NiCl ₂	0,02 g
Na ₂ MoO ₄	0,01 g

A solução aquosa de resazurina 1% foi preparada pela dissolução do reagente em água ultra purificada estéril e armazenamento da mesma em frasco âmbar, sob refrigeração¹¹¹. Resazurina foi utilizada como indicadora do potencial de oxi-redução do meio de cultivo, a qual quando em pH neutro possui cor rósea, indicando a presença de oxigênio no meio. Entretanto, na ausência completa de oxigênio, a resazurina torna-se incolor, indicando a completa redução do meio de cultura.

Após o preparo do meio Zinder, o mesmo foi submetido à troca de atmosfera por nitrogênio (N₂) (100%), permanecendo sob fluxo deste gás durante 20 minutos. O nitrogênio foi introduzido nos frascos através de um sistema de distribuição simultânea de gases, passando por coluna catalítica, utilizando-se BTS[®]. Este é um catalisador que, sob aquecimento a 100°C, é capaz de reter traços de oxigênio, geralmente presentes nas linhas de condução e nos cilindros estoque dos gases comerciais. O sistema descrito pelo Esquema 1 representa o aparato empregado para obtenção de condições anaeróbias no meio de cultura.



Esquema 1. Sistema para implementação de atmosfera anaeróbia em meios de cultura e soluções.

Após a troca da atmosfera aeróbia por N_2 , os frascos foram vedados com tampas de borracha de butila e selados por lacres de alumínio, estabelecendo-se assim condições anaeróbias ao meio. A esterilização foi realizada em autoclave a $121^\circ C$, durante 20 minutos, seguindo-se à estocagem à temperatura ambiente, em ausência de luz.

No momento da inoculação microbiana ao meio, realizou-se nova troca de atmosfera, utilizando-se o mesmo sistema descrito anteriormente (Esquema 1). O frasco foi purgado 5 vezes, através de seringa acoplada à bomba de vácuo, alternando cada purga com a injeção de N_2/CO_2 (70:30) ao meio.

Soluções estoque de bicarbonato de sódio 10% (para a manutenção do pH do meio), vitaminas e substratos orgânicos foram adicionadas ao meio basal, como fontes de carbono. Tais soluções foram inoculadas de acordo com a ordem apresentada pela Tabela 17.

Tabela 17. Composição nutricional do meio de enriquecimento da microbiota metanogênica de águas de formação e óleos da Bacia de Campos¹⁷⁴

Componentes	Volume (mL)
Meio basal Zinder	30
Bicarbonato de sódio	0,3
Solução de vitaminas	0,3
Acetato de sódio (2721,6mg/L)	0,3
Glicose (1801,6mg/L)	0,3
Butirato de sódio (1100,9mg/L)	0,3
Lactato de sódio (2241,6mg/L)	0,3
Metanol (640,8mg/L)	0,3
Extrato de levedura (0,01%)	0,3
Solução redutora de sulfeto de sódio	0,3
Inóculo (água de formação ou óleo)	6

A solução de vitaminas (Tabela 18)^{111,174} foi utilizada com o objetivo de favorecer o crescimento dos microrganismos anaeróbios. Esta solução foi preparada pela dissolução dos seus componentes em água Ultra purificada, previamente fervida e resfriada a 30°C, sob fluxo de N₂. A solução foi esterilizada por filtração rápida em membrana 0,22 µm e distribuída em frascos de penicilina, envoltos em papel alumínio, fechados com tampas de borracha de butila e selados por lacres de alumínio, sendo armazenados em local escuro, sob refrigeração (4°C).

Tabela 18. Composição da solução de vitaminas^{111,174}

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000mL de água ultra purificada
Biotina	0,002g
Ácido fólico	0,002g
Tiamina.HCl	0,005g
Riboflavina	0,005g
Ácido nicotínico	0,005g
Pantotenato de cálcio	0,005g
Piridoxina.HCl	0,010g
Vitamina B ₁₂	0,0001g
Ácido lipóico	0,005g

A solução de bicarbonato de sódio (10%) foi preparada pela dissolução do respectivo sal em água ultra purificada, previamente fervida e resfriada a 50 °C, sob atmosfera de N₂ (100%). Com o auxílio de uma pipeta invertida esterilizada, a solução permaneceu sob fluxo deste gás durante 10 minutos. A solução foi esterilizada por filtração rápida em membrana 0,22 µm e distribuída em frascos de penicilina de 50mL, sob fluxo de N₂ (100%) e condições de assepsia, sendo armazenada à temperatura ambiente e ausência de luz. A redução do meio de enriquecimento microbiano foi promovida pela adição de solução de sulfeto de sódio 5%, a qual foi preparada seguindo as mesmas condições descritas para solução de bicarbonato de sódio, porém com uma etapa prévia de desidratação do sal. Assim, o sulfeto de sódio foi mantido sobre papel de filtro Whatman em dessecador durante 48 horas, antes de sua pesagem e preparo da solução.

A composição das soluções estoque, utilizadas como fontes de carbono ao enriquecimento da microbiota de amostras de águas de formação petróleo e óleos do campo Pampo, está descrita abaixo:

A. Solução Estoque de Extrato de Levedura 2%

Foi preparada pela dissolução de Extrato de Levedura (Difco) em água ultra purificada sob fluxo de N₂ (100%) por 20 minutos. Aliquotas de 20 mL foram distribuídas em frascos de penicilina (50 mL), sob fluxo do mesmo gás. Os frascos foram vedados com tampas de borracha de butila, selados por lacres de alumínio, autoclavados a 120°C durante 20 minutos, e armazenados à temperatura ambiente em ausência de luz.

B. Solução Estoque de Substratos Orgânicos

Foram preparadas soluções estoque dos seguintes substratos orgânicos: acetato de sódio (2721,6 mg/L), propionato de sódio (1921,2 mg/L), glicose (1801,6 mg/L), lactato de sódio (2241,6 mg/L) e metanol (640,8 mg/L). As soluções de acetato de sódio, propionato de sódio e glicose foram obtidas pela dissolução dos respectivos compostos orgânicos em água ultra purificada. A solução de lactato de sódio, por sua vez, foi preparada através da reação de neutralização entre as soluções de ácido láctico 4 M e hidróxido de sódio 4 M. O pH da solução final foi ajustado a 9,8 utilizando-se a solução de hidróxido de sódio 4 M. As mesmas condições de distribuição, esterilização e armazenamento, descritas no item A, foram aplicadas às soluções estoque de substratos orgânicos.

A solução de metanol foi preparada pela solubilização de metanol (0,8 mL) em água ultra purificada (9,2 mL). No entanto, o álcool e a água foram autoclavados separadamente, a 120°C por 20 minutos. Após resfriamento, o metanol foi adicionado à água através do uso de seringa esterilizada, “lavada” 5 vezes com gás N₂ (100%). Os frascos contendo a solução de metanol (640,8 mg/L) foram armazenados à temperatura ambiente em ausência de luz.

Após a adição das soluções descritas acima, o meio basal foi acrescido dos inóculos microbianos, os quais constituíram-se de:

- 1) mistura entre as águas de formação amostradas em maio de 2002 (coleta 1);
- 2) águas de formação coletadas em julho de 2005 (coleta 2);
- 3) óleos P1, P2 e P3, coleta 1, individualmente;
- 4) óleos P1a, P2a, P3a e P4a, coleta 2, individualmente. A amostra P5a, não foi analisada pelo fato da mesma constituir-se de amostra de óleo não biodegradado, assim como P1a e P3a.

Os frascos foram incubados em agitador rotacional 150 rpm, a 55°C por 20 a 30 dias. Os ensaios de enriquecimento foram monitorados por análises cromatográficas e exames microscópicos, para acompanhamento da produção de gás metano e alterações da diversidade microbiana presente na biomassa em suspensão, respectivamente.

Os exames microscópicos das amostras coletadas dos meios de enriquecimento foram realizados utilizando-se microscopia óptica de luz comum em microscópio LEICA, modelo DMEP, cujo uso foi disponibilizado pelo CPQBA - Unicamp, e ainda, análises sob contraste de fase e fluorescência, fazendo-se uso de microscópio invertido LEICA, modelo DM IRB (IQ – Unicamp).

Amostras de gás metano (10 µL), produzidas pela microbiota, foram coletadas através de seringa “gas tight”, com trava para gases, acoplada à agulha 25,0 x 7,0 mm, lavada com N₂. As análises foram realizadas em CG-FID, utilizando-se cromatógrafo HP5890II acoplado à coluna quiral (Chrompack), injetor tipo splitless, gás de arraste H₂, fluxo de 1mL/min. O forno foi operado à temperatura inicial de 40 °C, por 5 minutos, aumentando-se 10 °C/min até a temperatura de 180 °C (10 min). O injetor foi utilizado à temperatura de 50 °C. Os dados foram adquiridos utilizando-se o modo SCAN e os valores de massas variaram entre 15 e 50 u.m.a. Utilizou-se metano comercial White Martins, como padrão para determinar o tempo de retenção do gás.

5.1.2.2. ENRIQUECIMENTOS DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO (BRS)

As amostras de águas de formação e óleos, descritas pela Tabela 13, referentes à coleta 2, foram avaliadas também quanto à presença de bactérias redutoras de sulfato. Estes enriquecimentos microbianos foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller, no Instituto de Ciências Biomédicas, USP – São Paulo.

Foram avaliadas duas condições de cultivo com o intuito de obter-se a recuperação de BRS a partir das amostras:

Condição 1: bicarbonato de sódio 10 % (0,3 mL); solução de vitaminas BRS (0,3 mL); lactato de sódio (0,3 mL); sulfato de sódio (0,3 mL); cisteína 2,5 % (0,3 mL); inóculo (3 mL).

Condição 2: bicarbonato de sódio 10 % (0,3 mL); solução de vitaminas BRS (0,3 mL); acetato de sódio (0,3 mL); sulfato de sódio (0,3 mL); cisteína 2,5 % (0,3 mL); inóculo (3 mL).

As soluções bicarbonato de sódio 10% e lactato de sódio foram preparadas de acordo com os procedimentos já descritos no item 5.1.2.1. A solução estoque de sulfato de sódio (1420,0 mg/L) foi utilizada como fonte de enxôfre para o crescimento das bactérias redutoras do íon sulfato e ainda, como acceptor final de elétrons, uma vez que os experimentos foram realizados em anaerobiose. A solução foi preparada pela dissolução do respectivo sal em água ultra purificada, sendo que alíquotas de 20 mL foram distribuídas em frascos de penicilina de 50 mL, sob atmosfera de N₂ (100%), seguindo-se à esterilização em autoclave a 121 °C por 20 minutos e armazenamento à temperatura ambiente em ausência de luz.

A solução aquosa de cisteína hidrocloreada (Cys HCl) a 2,5% foi utilizada como agente redutor do meio mineral (Fukushima *et al.*, 2003)¹⁷⁵, em substituição ao sulfeto de sódio, o qual poderia gerar a precipitação de enxôfre e conseqüentes resultados falso-positivos a respeito do crescimento de BRS. A solução de cisteína foi esterilizada por filtração rápida, utilizando-se membranas Millipore 0,2 µm, sob fluxo de N₂ e condições assépticas.

A Tabela 19 descreve a composição da solução de vitaminas BRS, destinada à recuperação de bactérias redutoras de sulfato, especificamente.

Tabela 19. Composição da solução de vitaminas BRS¹⁷⁴

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000 mL de água Ultra purificada
Biotina	0,002 g
Ácido fólico	0,002 g
Tiamina.HCl.2H ₂ O	0,005 g
Piridoxina.HCl	0,010 g
Riboflavina	0,005 g
Ácido nicotínico	0,005 g
Pantotenato de cálcio	0,0001 g
Vitamina B ₁₂	0,0001 g
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	0,005 g
Ácido lipóico	0,005 g

Após a adição das soluções descritas e inoculação das amostras de água e óleo, os frascos foram incubados em estufa DBO à 55°C por 90 dias. Meios de cultura que apresentaram turbidez e precipitado negro ao fundo do frasco foram encaminhados para identificação das espécies microbianas presentes, através de técnicas moleculares independentes-de-cultivo.

¹⁷⁵ Fukushima, R.S.; Weimer, P.J.; Kunz, D.A. *Braz. J. Microbiol.* **2003**, *34*, 22-26.

5.1.3. ISOLAMENTO DE CULTURAS ANAERÓBIAS

Com o intuito de isolar culturas anaeróbias puras a partir dos consórcios microbianos obtidos, foram aplicadas duas técnicas de manipulação anaeróbia, descritas por Holland *et al.* (1987)⁹⁸. Estas técnicas permitem o isolamento colônias anaeróbias estritas, como as arqueias metanogênicas, como também cepas anaeróbias facultativas.

Para o isolamento de anaeróbias estritas, aplicou-se a técnica denominada como “Roll Tube”. Assim, alíquotas de 10 mL do meio mineral Zinder, contendo 1,5% de ágar, foram distribuídas em frascos de penicilina (50 mL), sob atmosfera de N₂. Os frascos foram fechados com tampas de borracha de butila, selados com lacres de alumínio e autoclavados por 20 minutos a 120°C. Os frascos foram então resfriados à temperatura ambiente e inoculados com 1 mL do consórcio anaeróbio, previamente enriquecido a partir de amostras de águas de formação, provenientes da Coleta 1 (item 5.1.2.1). Empregando-se uma bandeja plástica contendo água com gelo, os frascos foram rolados com as mãos, de forma a obter-se um filme de ágar nas paredes internas dos mesmos (Figura 73). Os frascos foram incubados em estufa DBO, a 55 °C, até o surgimento de colônias visíveis nas paredes do frasco.



Figura 73. Técnica de “Roll Tube” para o isolamento de colônias microbianas anaeróbias estritas.

A câmara de anaerobiose (Figura 74) foi utilizada com o intuito de se isolar culturas de bactérias anaeróbias facultativas presentes nos consórcios microbianos anaeróbios obtidos tanto das amostras de óleos quanto de águas de formação da Plataforma Pampo. Anteriormente à sua utilização a câmara foi exposta à radiação UV, durante 30 minutos. Após este período acondicionou-se em seu interior placas de Petri estéreis e meio Zinder adicionado de 2% de ágar, previamente preparado segundo procedimentos já descritos, entretanto, acrescentando-se ágar à sua composição. O meio Zinder ágar, como foi denominado, após sua esterilização em autoclave e resfriamento à temperatura ambiente, foi acrescentado das soluções de bicarbonato de sódio, vitaminas e demais soluções de substratos orgânicos, descritas no item 5.1.2.1, à concentração de 1% (v/v). O meio foi mantido em banho-maria à temperatura média de 40 °C. A câmara foi então fechada por tampa de vidro e selada por filme PVC. A atmosfera anaeróbia foi promovida pela purga da câmara de anaerobiose, a qual foi promovida através de vácuo intercalado por injeções de 1L/min dos gases N₂:CO₂ (70:30), obtendo-se assim condições ideais à manipulação de bactérias anaeróbias e anaeróbias facultativas. Os inóculos (1 mL), previamente enriquecidos, foram adicionados às placas de Petri estéreis, em duplicata, sendo recobertos por 20

mL do meio Zinder ágar. As placas já inoculadas foram dispostas no interior da jarra de anaerobiose, a qual teve sua atmosfera anaeróbia mantida pelo uso do kit comercial Anaerobac[®]. A jarra de anaerobiose foi incubada à 55 °C durante 30 dias.

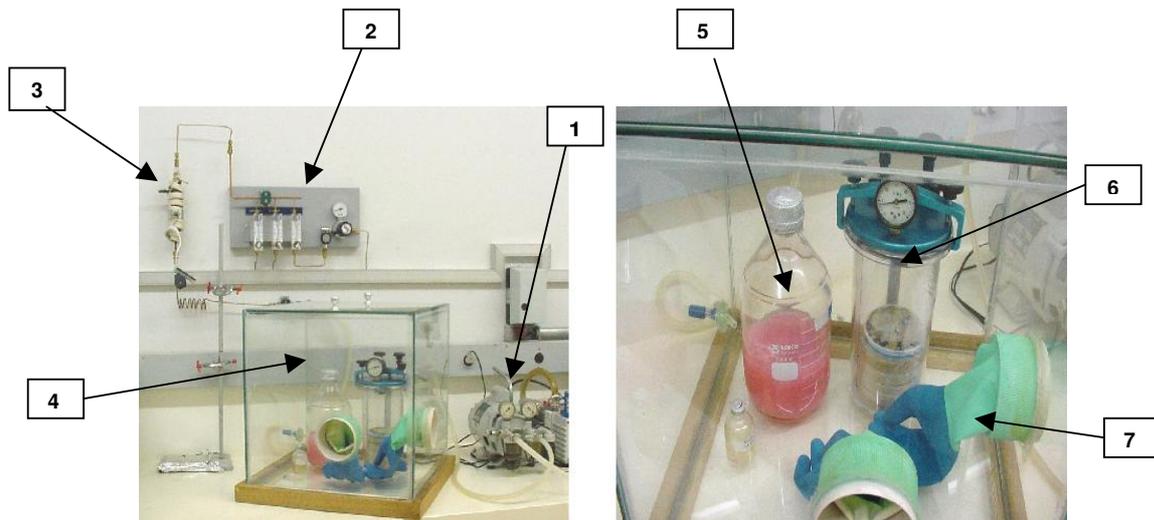


Figura 74. Sistema para promoção de atmosfera anaeróbia (N₂:CO₂) acoplado à câmara anaeróbia para a manipulação, plaqueamento e isolamento de culturas anaeróbias.

- 1- Bomba de vácuo:** utilizada para eliminação da atmosfera presente no interior da câmara de anaerobiose;
- 2- Misturadores de gases:** utilizados para a mistura entre os gases N₂:CO₂ (70:30), a ser injetada no interior da câmara;
- 3- Coluna catalítica:** coluna de vidro preenchida pelo catalisador comercial BTS[®] (Aldrich), o qual tem a propriedade de eliminar traços de O₂, quando aquecido à 100° C;
- 4- Câmara de anaerobiose:** receptáculo sujeito à pressão positiva da mistura dos gases N₂:CO₂ (70:30), para a manipulação e inoculação de microrganismos anaeróbios;
- 5- Meio sólido:** meio Zinder acrescido de 2% de agar, preparado sob condições anaeróbias, utilizado para o plaqueamento e isolamento de colônias microbianas.
- 6- Jarra de anaerobiose:** recipiente utilizado para manutenção da atmosfera anaeróbia às placas de Petri inoculadas pelos microrganismos anaeróbios que se deseja isolar;
- 7- Luvas de borracha impermeável:** utilizadas para a manipulação dos materiais internos à câmara.

5.1.4. CARACTERIZAÇÃO DOS CONSÓRCIOS MICROBIANOS ANAERÓBIOS – ANÁLISES INDEPENDENTES-DE-CULTIVO

Alíquotas de cerca de 90 mL dos inóculos previamente enriquecidos segundo metodologias descritas anteriormente (ítems 5.1.2.1 e 5.1.2.2), foram enviadas ao CPQBA -Unicamp, para a caracterização do consórcio microbiano presente no enriquecimento, através do emprego de técnicas moleculares independentes-de-cultivo. As análises foram realizadas sob a coordenação da Dra. Valéria Maia de Oliveira (Divisão de Recursos Microbianos, CPQBA – Unicamp), co-orientadora do presente estudo.

As seguintes técnicas foram empregadas:

Extração de DNA e amplificação por PCR. A metodologia consistiu na extração direta do DNA genômico total a partir do cultivo enriquecido, utilizando o método da proteinase K (Young e Blakesley, 1991)¹⁷⁶. Cerca de 50-100 ng de DNA total extraído foram utilizados em reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para amplificação do DNA ribossomal 16S. O par de *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizado para a reação de PCR foram p27f (Chun e Goodfellow, 1995)¹⁷⁷ e p915r (Lane, 1991)¹⁷⁸, homólogos às extremidades conservadas do gene RNAr 16S de bactérias e arqueias.

Banco de DNAr 16S. Cerca de 200 ng dos produtos de PCR (2 a 3 µL da reação de amplificação) foram utilizados diretamente, sem purificação prévia, em reações de ligação com o vetor plasmidial pGEM-T (Kit *pGEM-T Vector*

¹⁷⁶ Young, A.; Blakesley, R. *Focus* **1991**, *13*, 13.

¹⁷⁷ Chun, J.; Goodfellow, M. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1995**, *45*(2), 240-245.

¹⁷⁸ Lane, D.J. Em *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*; Stackebrandt, E.; Goodfellow, M., eds; John Willey & Sons, Chichester, 1991.

System, Promega), segundo especificações do fabricante. A seguir, procedeu-se à transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5 α , previamente preparadas e estocadas a -80°C. Os transformantes positivos (colônias brancas) foram repicados em placas de Petri contendo LB / ampicilina e estocados a 4°C.

Análises por ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*).

Cerca de 50 clones foram analisados empregando a metodologia de ARDRA a fim de se detectar os perfis representativos de grupos taxonômicos diferentes, antes de proceder ao sequenciamento do DNAr 16S e inferência filogenética. Para isso, o DNA plasmidial foi isolado dos clones utilizando o método de lise alcalina (Protocols and Applications Guide)¹⁷⁹. Aliquotas de 1 μ L do DNA plasmidial foram utilizadas em reações de PCR com os *primers* M13 *forward* (5'- CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC - 3') e *reverse* (5'-TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC - 3'). Cerca de 5 μ L do produto de amplificação foram utilizados em reações independentes de restrição enzimática com 2 enzimas, *Hha* I e *Msp* I, a 37°C por 2 horas¹⁰⁰.

Sequenciamento. Os clones que apresentaram perfis de restrição distintos foram purificados utilizando mini-colunas (*GFX PCR DNA and gel band purification kit*, GE Health Care) e submetidos ao sequenciamento em sequenciador automático (ALF Express II, GE Health Care). *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP* (GE Health Care), utilizando *primers* marcados com fluorescência (Cy5), segundo especificações do fabricante.

Análise filogenética. As sequências parciais de DNAr 16S obtidas com cada *primer* foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os

¹⁷⁹ *Protocols and Applications Guide*, 3. Ed., p.47, 1996, Promega Corporation.

diferentes fragmentos obtidos) com ajuda do software BioEdit (Hall, T.A, 1999)¹⁸⁰ e comparadas com as sequências de DNAr 16S de organismos representados nas bases de dados RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, USA)¹⁸¹, e Genbank¹¹⁸. Foram então selecionadas diversas sequências de cepas relacionadas à sequência do organismo desconhecido para a realização das análises filogenéticas. As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo de Kimura (1980)¹⁰⁵ e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* utilizando o software PAUP¹⁰⁷.

5.1.5. ENRIQUECIMENTOS MICROBIANOS AERÓBIOS

5.1.5.1. ÁGUAS DE FORMAÇÃO DE PETRÓLEO

a) Coleta 1:

Um total de 7 de amostras de águas de formação coletadas na Plataforma Pampo da Bacia de Campos, RJ, foram cedidas pela Petrobras, em 18 de julho de 2003, foram inicialmente avaliadas quanto à microbiota aeróbia presente. Alíquotas de 0,5 mL de cada amostra, totalizando 3,5 mL de inóculo, foram adicionadas em erlenmeyers contendo 30 mL de meio de cultura. Foram utilizados três meios de cultura distintos, com o intuito de se recuperar diferentes morfotipos cultiváveis presentes nas amostras.

¹⁸⁰ Hall, T.A.; *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1999**, *41*, 95-98.

¹⁸¹ <http://www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html> (acessada em julho de 2004).

Caldo Nutriente (Difco) foi utilizado como meio de cultura não seletivo, rico em nutrientes, segundo recomendações do fabricante.

O meio mineral Zinder, descrito no ítem 5.1.2.1, foi também utilizado para o enriquecimento da microbiota aeróbia de águas de formação. No entanto, não foi adicionado resazurina, uma vez que os experimentos foram realizados em condições de aerobiose. Aliquotas de 30 mL do meio Zinder “modificado”, como foi denominado, foram distribuídas em erlenmeyers de 125mL, os quais foram esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 20 minutos. Solução de vitaminas; soluções estoque de glicose, extrato de levedura, lactato de sódio, metanol e propionato de sódio foram adicionadas ao meio Zinder “modificado”, como substratos ao crescimento microbiano. Solução aquosa de bicarbonato de sódio 10% também foi adicionada ao meio mineral, para a manutenção do pH do meio. O meio mineral Zinder “modificado” foi utilizado como forma de recuperar bactérias tidas como fastidiosas, que dependem de fontes específicas de carbono e energia para seu crescimento¹¹⁵.

As mesmas amostras de águas de formação de petróleo também foram inoculadas em meio BAT¹¹³, o qual é descrito como meio seletivo para o cultivo de bactérias do gênero *Alicyclobacillus* sp (Tabelas 20 e 21). Estes ensaios foram realizados visando confirmar a hipótese de que compostos aliciclos presentes em petróleo seriam provenientes das membranas celulares de bactérias do gênero *Alicyclobacillus*³⁸.

Tabela 20. Composição do meio BAT¹¹³

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000 mL de água ultra purificada
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,2 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Glicose	5,0 g
Solução de Elementos Traço	1,0 mL

Tabela 21. Composição da Solução de Elementos Traço, adicionada ao meio BAT (Farrand *et al.*, 1983)¹⁸²

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000 mL de água ultra purificada
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,00066 g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,00018 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,00016 g
MnSO ₄ . 4H ₂ O	0,00015 g
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,00015 g
H ₃ BO ₃	0,00010 g
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,00030 g

O meio mineral e solução de elementos traço foram preparados pela diluição dos sais descritos nas Tabelas 20 e 21, em água ultra purificada. A solução de elementos traço foi acondicionada em frasco Schott (Duran) (1L), com tampa plástica, envolto em papel alumínio e armazenada em refrigerador a 4°C.

O pH final do meio BAT foi ajustado para 4,0 utilizando-se soluções de H₂SO₄ 1 M e NaOH 1 M. Erlenmeyers de 100 mL, contendo 30 mL de meio BAT, foram autoclavados a 121 °C, durante 20 minutos.

Os enriquecimentos microbianos, nos meios Zinder “modificado”, Caldo Nutriente e meio BAT, foram incubados em agitador rotacional (150

¹⁸² Farrand, S.G.; Linton, J.D.; Stephenson, R.J.; MacCarthy, W.V. *Arch. Microbiol.* **1983**, *135*, 272-275.

rpm), às temperaturas de 28 e 55° C, durante 20 dias. Os experimentos foram realizados em duplicata.

b) Coleta 2:

As amostras de águas de formação, coletadas em julho de 2005 (Coleta 2), também foram inoculadas em diferentes meios de cultura: Caldo Nutriente (NB) e Nutriente Ágar (NA, Difco), Marine Ágar (Difco) e meio Zinder “modificado”. Caldo Nutriente adicionado de 3% de NaCl foi empregado com o intuito de potencializar a recuperação de culturas bacterianas halofílicas moderadas¹¹³. Erlenmeyers de 500mL contendo 360 mL de meio de cultura, foram inoculados com 40 mL de água de formação. Novamente, o meio Zinder modificado foi suplementado com substratos, conforme descrito anteriormente, para o enriquecimento das amostras provenientes da Coleta 1.

Os enriquecimentos em meios líquidos (NB, Zinder “modificado” e NB + NaCl 3%), foram incubados em agitador rotacional (150 rpm), às mesmas temperaturas (28 e 55 °C), durante 15 dias.

As águas de formação também foram plaqueadas (0,1 e 1,0 mL de amostra) diretamente em placas de Petri contendo 20 mL de Nutriente Ágar e Marine Ágar, respectivamente, de forma a obter-se a contagem total de unidades formadoras de colônias das bactérias presentes nas amostras, sem prévio enriquecimento microbiano das mesmas. As placas foram incubadas em estufa DBO, a duas temperaturas, 28 e 55 °C, durante 4 dias. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

5.1.5.2. ÓLEOS BRUTOS

a) Coleta 1:

Os enriquecimentos seletivos para a recuperação de espécies de bactérias a partir das amostras de óleos (Coleta 1) foram realizados em colaboração com a graduanda Lucía Jimena Dussan (Universidade Javeriana da Colômbia).

As amostras dos óleos foram mantidas em banho-maria a 80°C por 30 minutos, sendo que, após este período, alíquotas de 50 mL foram acondicionadas em tubo Falcon, sob fluxo de N₂. Volumes de 20 mL de Tween 80 foram adicionados, seguindo-se a homogeneização em vortex, sob velocidade baixa. As amostras foram mantidas em banho-maria a 40°C, durante 20 minutos.

Os óleos foram inoculados em diferentes meios de cultura, com o propósito de recuperar a microbiota aeróbia cultivável presente nas amostras (Figura 75). Caldo Nutriente NB (Oxoid) e Caldo Trypticase Soja (TSB, Difco), foram empregados como meios não seletivos ricos em nutrientes favorecendo o crescimento de bactérias de diferentes espécies; Extrato de Malte e Glicose (GYM, Difco) e Caldo Dextrose e Batata (PDB, Difco), foram utilizados para favorecer o crescimento de fungos filamentosos. Caldo Marine (MB, Difco), é descrito como meio ideal para a recuperação de bactérias de ambientes marinhos (Stabili *et al.*, 2005)¹⁸³. Caldo Bushnell Hass (BHM; Difco), por se tratar de um meio mineral, foi empregado para o enriquecimento de bactérias que utilizassem os hidrocarbonetos, constituintes dos óleos, como fontes de carbono e energia.

¹⁸³ Stabili, L.; Acquaviva, M. I.; Cavallo, R. A.; *Water Res.* **2005**, *39*, 469-477.

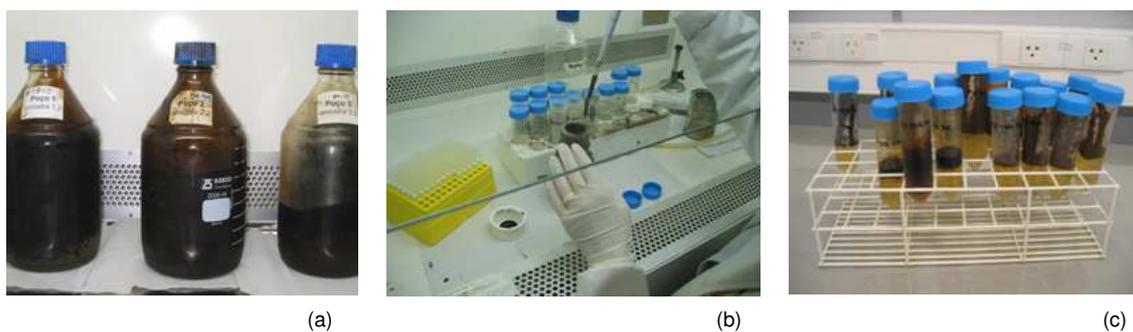


Figura 75. (a) Frascos contendo as amostras de óleos (Coleta 1). (b) Inoculação das amostras em diferentes meios de cultivo. (c) Amostras inoculadas e com crescimento microbiano.

Experimentos paralelos de caracterização das comunidades de bactérias presentes nas mesmas amostras de óleos, empregando DNA de comunidade e construção de bancos de DNAr 16S (Sette *et al.*, no prelo)¹⁸⁴, realizados no CPQBA/Unicamp sob coordenação da Dra. Valéria Maia de Oliveira, demonstraram a presença de bactérias do gênero *Acinetobacter* sp. nos reservatórios de petróleo. Assim, o Caldo *Acinetobacter* (Difco®) foi também utilizado nos ensaios de enriquecimentos microbianos aeróbios, com o intuito de recuperar representantes bacterianos deste gênero.

Adicionalmente, o meio BAT foi empregado como meio seletivo ao crescimento de bactérias do gênero *Alicyclobacillus* sp. Assim, para o enriquecimento e recuperação de bactérias deste gênero, as amostras de óleos, foram submetidas a tratamento térmico, 80 °C por 10 minutos, como forma de ativar esporos dormentes (Pinhatti *et al.*, 1998)¹⁸⁵. Os enriquecimentos foram incubados em agitador rotacional, 150 rpm, durante 15 dias à 50 °C.

Volumes de 15 mL de cada meio de cultura foram distribuídos em tubos Falcon de 50 mL. Aliquotas de 2,5 mL dos óleos foram inoculadas, seguindo-

¹⁸⁴ Sette, L.D.; Simioni, K.C.; Vasconcellos, S.P.; Dussan, L.J.; Santos Neto, E.V.; Oliveira, V.M. *Antonie van Leeuwenhoek*, **2006**, no prelo.

¹⁸⁵ Pinhatti, M.E.M.C.; Variane, S.; Eguchi, S.Y.; Manfio, G.P.; *Fruit Processing* **1997**, *9*, 350-353.

se à homogeneização em vortex e incubação em agitador rotacional (150 rpm) em diferentes temperaturas, 28° e 55 °C, durante 15 dias. Cada amostra de óleo foi inoculada individualmente nos diversos meios de cultura descritos, sendo que cada cultivo foi realizado em duplicata.

A avaliação do crescimento microbiano, nas diferentes condições empregadas, foi realizada através de análises de coloração de Gram¹¹², utilizando-se microscopia óptica de luz comum, em microscópio LEICA, modelo DMEP, disponibilizado pelo CPQBA – Unicamp.

b) Coleta 2:

As amostras de óleos foram inoculadas nos mesmos meios de cultura e condições empregadas para as amostras de águas de formação, também provenientes da Coleta 2. No entanto, os óleos tiveram de ser submetidos a tratamento prévio, como descrito abaixo.

Os óleos foram aquecidos, em banho-maria a 50 °C, durante 20 minutos, como forma de solubilizar e homogeneizar as amostras. Tween 80 foi adicionado na proporção de 1:1 (v/v) às amostras de óleos, as quais, após agitação manual, permaneceram por mais 20 minutos à temperatura de 50 °C. Após este pré-preparo das amostras de óleo, estas foram inoculadas conforme descrito anteriormente (item 5.1.5.1, b).

5.1.6. ISOLAMENTO DAS CULTURAS MICROBIANAS AERÓBIAS

a) Coleta 1:

Alíquotas de 100 μ L dos enriquecimentos microbianos de águas de formação, foram plaqueadas nos meios sólidos, Ágar Nutriente (NA Difco) e BAT. O mesmo volume (100 μ L) dos enriquecimentos provindos das amostras de óleos foi adicionalmente plaqueados em Ágar Tripticase Soja (TSA Difco) e Ágar Marine (Difco), além dos meios de cultura descritos (NA e BAT).

As placas foram inoculadas em duplicata e incubadas a 28 °C e 50 °C, em estufa DBO, durante 10 dias. O crescimento das colônias foi monitorado a cada 2 dias.

A purificação das linhagens aeróbias obtidas foi realizada através de estrias em ágar, utilizando a técnica de esgotamento¹¹⁵. A pureza das culturas bacterianas foi confirmada por caracteres macroscópicos (cor, brilho), microscópicos e coloração de Gram¹¹⁵ (Figura 76).

As culturas puras foram transferidas para placas de Petri e slants contendo os meios de cultura adequados ao crescimento microbiano (NA, TSA ou Ágar Marine), sendo encaminhadas ao CPQBA – Unicamp para sua identificação molecular.

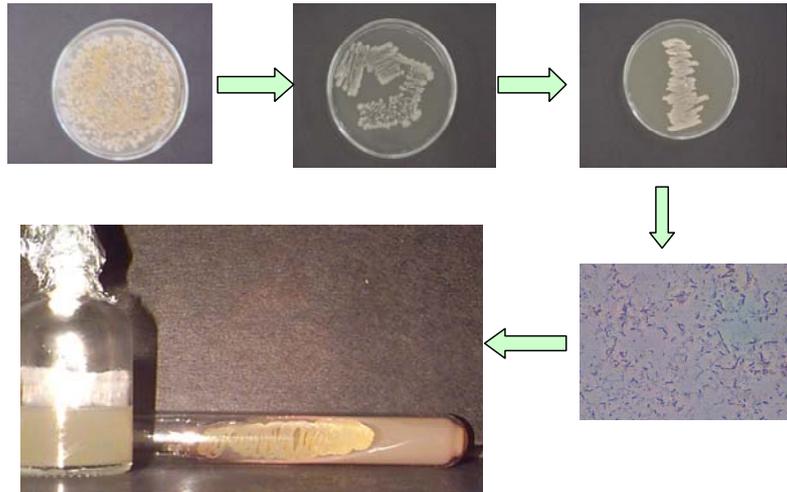


Figura 76. Resumo esquemático do procedimento para isolamento das linhagens aeróbias obtidas.

b) Coleta 2:

Alíquotas (100 μL e 1000 μL) dos enriquecimentos microbianos de águas de formação e óleos, foram plaqueadas nos meios sólidos, Ágar Nutriente (NA Difco), Ágar Nutriente adicionado de 3% de NaCl e Ágar Marine (Difco). As mesmas condições de incubação e monitoramento das culturas microbianas descritas, anteriormente (item 5.1.6, a), foram empregadas para isolamento de bactérias a partir dos enriquecimentos provindos da Coleta 2.

5.1.7. IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS AERÓBIAS OBTIDAS

Todas as linhagens recuperadas das amostras de águas de formação de petróleo e de óleos, provindas da Coleta 1, foram identificadas por técnicas moleculares baseadas no sequenciamento e análise filogenética de sequências

do gene RNAr 16S. Estas análises foram realizadas sob a supervisão da Dra. Valéria Maia de Oliveira, no CPQBA – Unicamp.

Após o cultivo das bactérias em meio sólido, o DNA genômico de cada cultura foi extraído utilizando protocolo descrito por Young e Blakesley (1991)¹⁷⁶. A seguir, o DNAr 16S foi amplificado através da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). A amplificação dos fragmentos de DNAr 16S, assim como o sequenciamento direto, foi realizado como descrito por Rainey *et al.* (1996)¹⁸⁶, utilizando um sequenciador automático Sistema Mega Bace 500 (GE Health Care).

A identificação das linhagens foi obtida através da comparação das seqüências obtidas com dados de seqüências de RNAr 16S de linhagens tipo disponíveis nas bases de dados públicas Genbank¹¹⁸ e RDP (Ribosomal Database Project)¹⁸¹. As seqüências foram alinhadas usando o programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1994)¹⁸⁷ e analisadas usando PAUP (versão 4.0 beta 10)¹⁰⁷. As distâncias evolutivas foram obtidas a partir das dissimilaridades de pares de seqüências calculadas com o pacote PAUP, usando o modelo de substituição de DNA de Kimura¹⁰⁵. A reconstrução filogenética foi realizada utilizando o algoritmo de neighbor-joining (NJ), com valores de bootstrap calculados a partir de 1000 replicatas, usando as rotinas implementadas no software PAUP¹⁰⁷.

¹⁸⁶ Rainey, F.A.; Ward-Reiney, N.; Kroppenstedt, R.M.; Stackebrandt, E. *J. Syst. Bacteriol.* **1996**, *46*, 1088-1092.

¹⁸⁷ Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J.; *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4673-4680.

5.1.8. ENSAIOS DE ANTIBIOGRAMA E MIC (CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA)

a) Antibiogramas

Com o intuito de investigar a atividade bacteriostática ou bactericida das linhagens microbianas isoladas das amostras de águas de formação e óleos coletados na Bacia de Campos, foram realizados ensaios baseados em metodologias empregadas em antibiogramas hospitalares^{138,139}.

Os experimentos consistiram na avaliação da sobreposição do crescimento de culturas puras frente ao consórcio do qual foram isoladas. A microbiota foi reinoculada em meio zinder “modificado”, suplementado por vitaminas e soluções já descritas anteriormente, seguindo-se à incubação em agitador rotacional (150 rpm), a 28 °C, durante 10 dias. As linhagens puras foram cultivadas em tubos slant (ágar inclinado), utilizando-se Ágar Nutriente (Oxoid) como meio de cultura, sendo incubadas durante 24 horas, a 28° C. Após o crescimento microbiano, foram realizadas suspensões aquosas (turbidez 10⁸, segundo escala de Mac Farland) das linhagens bacterianas.

Foram preparadas placas de Petri contendo 20 mL de Ágar Nutriente esterilizado, as quais, após a solidificação do meio de cultura, foram inoculadas com 0,2 mL da microbiota previamente enriquecida. A microbiota foi espalhada sobre o ágar utilizando alça de Drilgalski. Discos de papel de filtro esterilizados foram imersos nas suspensões celulares das linhagens puras, individualmente, e sobrepostos ao ágar já inoculado pela microbiota. Controles negativos foram realizados utilizando-se discos de papel de filtro esterilizados imersos em água destilada, previamente autoclavada. As placas foram incubadas em estufa DBO, a 28 °C, durante 48 horas.

Os resultados foram avaliados através da aferição com régua milimetrada, dos halos de crescimento das culturas puras sobre a microbiota em ágar.

b) Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Com o intuito de investigar a atividade antimicrobiana das linhagens microbianas que apresentaram bons resultados (halos de crescimento acima de 1 cm) nos antibiogramas, foram realizadas análises quanto à concentração inibitória mínima (MIC) de extratos orgânicos de tais microrganismos.

Estas bactérias foram inoculadas em 500 mL de Caldo Nutriente (Biobras) e incubadas durante 48 horas à 28° C, em agitador rotacional (150 rpm). Os meios de cultura foram centrifugados a 15 °C, 5000 rpm, durante 20 minutos, em centrífuga Harrier (modelo 18/80). Os sobrenadantes (caldo de cultivo) foram extraídos (5 vezes) em funil de separação, utilizando-se acetato de etila bidestilado, como solvente orgânico. Os precipitados também foram submetidos ao mesmo procedimento, com o mesmo solvente orgânico, de forma a extrair quaisquer metabólitos microbianos aderidos às paredes celulares. Os extratos orgânicos obtidos foram secos com sulfato de sódio anidro por 20 minutos, seguindo-se à filtração em funil com algodão tratado. O solvente foi eliminado em rotaevaporador.

Os extratos foram diluídos em água / DMSO (80:20), à concentração de 1 mg/mL, ou seja, 1000 ppm. Soluções de padrões comerciais dos antimicrobianos Cloranfenicol[®] e Loprox[®] foram preparadas, na mesma concentração, como controles negativos. As atividades antibióticas e antifúngicas dos extratos foram avaliadas frente às seguintes cepas de referência: *Escherichia coli* CCT 5050 (bactéria Gram negativa);

Staphylococcus aureus CCT 4295 (bactéria Gram positiva); *Aspergillus niger* CCT 1435 (fungo filamentoso); *Candida albicans* CCT 0776 (levedura).

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 cavidades, segundo metodologia descrita por Bicalho *et al.* (2003)¹⁴¹. As microplacas foram incubadas a 28 °C por 24 horas, no caso das bactérias e leveduras, e 72 horas para a determinação da atividade antimicrobiana sobre o fungo filamentoso.

O crescimento microbiano foi verificado através da adição de 100 µL de solução (solução estoque de 0,025 mg/mL) do revelador MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazol brometo] (Merck), à cada cavidade da microplaca. A presença de células vivas é indicada pela emissão de cor roxa pelo revelador, permitindo verificar se os extratos apresentaram atividade antimicrobiana ou não. Os extratos foram avaliados em duplicata e os resultados foram expressos como concentração ativa (em ppm) sobre cada patógeno avaliado.

5.2. CAPÍTULO 2 – BIOTRANSFORMAÇÕES AERÓBIAS E ANAERÓBIAS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DO PETRÓLEO

Todos os solventes utilizados como eluentes ou agentes extratores nos experimentos a serem descritos foram previamente destilados. A vidraria utilizada foi lavada com água destilada, seguida por etanol comercial e secagem em estufa. No caso das reações para o preparo de substratos à transformação microbiana, a vidraria foi lavada com acetona e seca sob alta temperatura. Os experimentos de biotransformação dos biomarcadores avaliados foram monitorados, semanalmente, por análises microscópicas (microscopia óptica comum), para a verificação da morfologia celular e Gram das cepas e consórcios avaliados.

5.2.1. PREPARO DE SUBSTRATOS AOS EXPERIMENTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO

Os compostos obtidos foram analisados, quanto à sua pureza, através de CG-EM, RMN de ^{13}C , DEPT 90 e 135°.

CG-EM: as análises de espectrometria de massas foram realizadas em espectrofotômetro de massas acoplado a um cromatógrafo gasoso (CG) modelo Hewlet Packard 5973, empregando-se a técnica de ionização por elétrons, com 70 eV de voltagem de ionização. A coluna capilar de sílica empregada foi HP5-MS – Crosslinked 5% fenilmetilsiloxano (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 μm de espessura do filme). O gás de arraste foi o hélio, sob fluxo de 1,0 mL/min⁻¹ (modo split 10).

A programação utilizada na maioria dos casos foi: temperatura inicial (60 °C), velocidade de aquecimento (10 °C ou 20 °C/ min⁻¹), temperatura final (290 °C), temperatura do injetor (240 °C), temperatura do detector (280 °C), temperatura na linha de transferência ou interface (280 °C), faixa de massas entre (50 e 700 Da). As amostras foram diluídas às concentrações de 1mg/mL e o volume injetado foi de 1 µL.

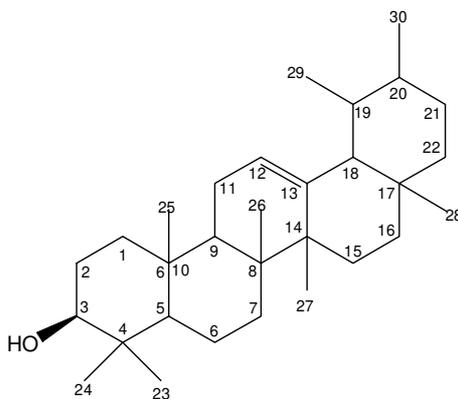
Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN): os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio de ¹³C e DEPT 90 e 135°, foram obtidos nos espectrômetros Varian Gemini 2000 (75 MHz) e Varian INOVA 500 (125 MHz), em solução de CDCl₃, tendo-se TMS como referência interna.

β-AMIRINA

Partindo do material denominado vulgarmente como “breu branco” (uma espécie de resina coletada na Floresta Amazônica, e gentilmente cedida pelo Ms Eduardo Mattoso Ramos de Souza), obteve-se a mistura entre os triterpenos α-amirina e β-amirina, através de coluna cromatográfica de sílica. A resina (0,8 g) foi adsorvida em sílica e depositada no topo de uma coluna de sílica (40 g; 20 cm) eluída em hexano. Para a separação dos compostos presentes na resina empregou-se o sistema de solventes hexano:acetato de etila (5 a 20%). Foram coletadas frações de 10 mL, as quais foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD). As CCD foram reveladas pela solução de *p*-anisaldeído (preparada pela mistura de *p*-anisaldeído, ácido sulfúrico, ácido acético e etanol, na proporção de 1:2:1:100 v/v, respectivamente), e subsequente aquecimento com pistola aquecedora (Casey *et al.*, 1990)¹⁸⁸. Foram obtidas 64 frações, sendo que 29 a 34 corresponderam

¹⁸⁸ Casey, M.; Leonard, J.; Lygo, B.; Procter, G.; *Advanced Practical Organic Chemistry*, Chapman 7 Hall: New York, 1990.

ao composto de interesse, ou seja, a β -amirina, o que pôde ser constatado através de análises de CG-EM, RMN de ^{13}C , DEPT 90 e 135 e dados da literatura (Anaya *et al.*, 1989¹⁸⁹, Matsunaga *et al.*, 1988¹⁹⁰). O triterpeno β -amirina apresentou-se como cristais brancos, correspondente à uma mistura de α -amirina e β -amirina, de difícil separação. Alíquotas das frações correspondentes à mistura dos triterpenos, foram evaporadas sob fluxo de N_2 , seguindo-se à nova diluição em 0,2 mL de piridina anidra, e 0,2 mL de bis-(trimetilsilil) trifluoracetamida (Fluka). Após sua sililação, e consequente diminuição da polaridade dos compostos, as frações foram analisadas por CG-EM. O forno foi operado na programação de 100 a 290 °C, com rampa de 5 °C / min, permanecendo à temperatura final durante 20 minutos. O injetor foi utilizado na temperatura de 240 °C.



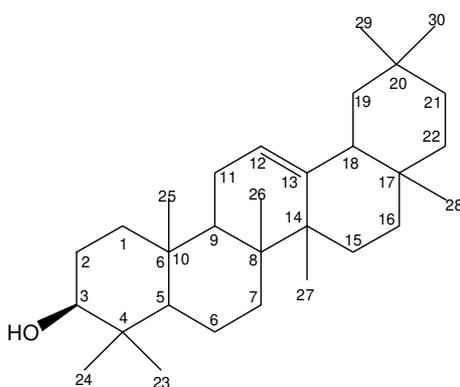
α -amirina

CG-EM, m/z (%): 426 (M^+ , 4), 411 (2), 393 (1), 218 (100), 203 (44), 189 (12), 119 (1), 95 (12), 69 (12)

¹⁸⁹ Anaya, J., Caballero, M.C., Grande, M., Navarro, J.J., Tapia, I., Almeida, J.F. *Phytochem.* 28(8), 1989. p.2206-2208.

¹⁹⁰ Matsunaga, S., Tanaka, R., Akagi, M... *Phytochem.* 27(2), 1988, p.535-537.

-RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3/TMS), δ : 38,68 (C-1), 27,05 (C-2), 77,42 (C-3), 38,68 (C-4), 55,25 (C-5), 18,48 (C-6), 32,77 (C-7), 39,88 (C-8), 47,79 (C-9), 36,99 (C-10), 23,38 (C-11), 124,36 (C-12), 139,49 (C-13), 42,16 (C-14), 28,50 (C-15), 26,73 (C-16), 33,85 (C-17), 59,14 (C-18), 39,69 (C-19), 39,69 (C-20), 31,16 (C-21), 41,61 (C-22), 28,49 (C-23), 15,73 (C-24), 15,79 (C-25), 16,99 (C-26), 23,38 (C-27), 28,21 (C-28), 17,57 (C-29), 21,49 (C-30).^{189,190}



β -amirina

CG-EM, m/z (%): 426 (M^+ , 8), 393 (2), 218 (100), 203 (22), 189 (20), 135 (16), 95 (12), 69 (10).

-RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3/TMS), δ : 38,86 (C-1), 27,39 (C-2), 79,05 (C-3), 38,86 (C-4), 47,72 (C-5), 37,23 (C-6), 32,59 (C-7), 38,69 (C-8), 47,72 (C-9), 38,69 (C-10), 23,48 (C-11), 121,66 (C-12), 145,07 (C-13), 41,62 (C-14), 26,09 (C-15), 27,40 (C-16), 32,59 (C-17), 47,33 (C-18), 46,90 (C-19), 31,16 (C-20), 34,84 (C-21), 37,23 (C-22), 28,21 (C-23), 15,61 (C-24), 15,73 (C-25), 17,57 (C-26), 26,08 (C-27), 28,49 (C-28), 33,41 (C-29), 23,64 (C-30).^{189,190}

FITANO

O material de partida utilizado para a obtenção do fitano foi o fitol (Acros, 99 % de pureza), o qual apresentou-se como um líquido incolor e oleoso. A Figura 77 ilustra as reações realizadas para a preparação do isopreno.

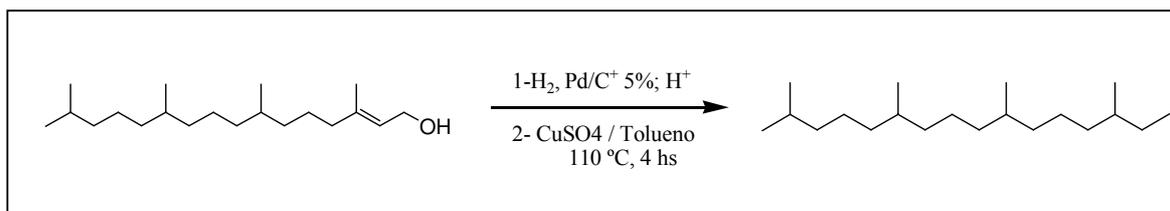
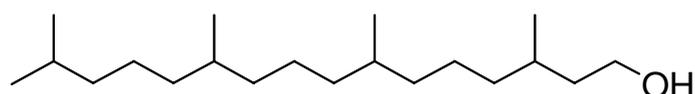


Figura 77. Reações para obtenção do fitano, tendo-se fitol como material de partida.

Hidrogenação do Fitol.

Em frasco de vidro, próprio para hidrogenação catalítica, sob alta pressão, adicionou-se fitol (1,01 g, 3,4 mmoles) e diluiu-se em acetato de etila destilado (30 mL). Adicionou-se 0,106 g de Pd / C⁺ 5% (Aldrich[®]) e 3 mL de ácido acético glacial. Seguiu-se à hidrogenação do fitol, a qual ocorreu durante 4 horas, 65 psi. Após este período, o conteúdo reacional foi filtrado em coluna de sílica, utilizando diclorometano como eluente. O produto, já filtrado, foi acondicionado em funil de separação e extraído (5 vezes) com solução saturada de bicarbonato de sódio, como forma de eliminar o ácido acético da reação. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio (15 min), filtrada e evaporada sob vácuo. Obteve-se 0,84 g de produto, o qual foi observado através de placas cromatográficas (CCD), utilizando-se hexano / acetato de etila (80:20) como eluentes, e anisaldeído como revelador¹⁸⁸. O produto reacional foi submetido à purificação em coluna de sílica (32 g, 20 cm), utilizando-se hexano : acetato de etila (90:10), como eluentes. Foram

coletadas 20 frações de 10 mL, onde as frações 13 à 20, corresponderam ao fitol hidrogenado puro. Obteve assim, 0,72 g (2,41 mmoles) de fitol hidrogenado, com rendimento reacional de 71%. Análises de CG-EM foram realizadas para a verificação da pureza do produto.



Fitol Hidrogenado

CG-EM (70eV), m/z (%): 298(1), 280(4), 252(8), 210(4), 196(10), 183(6), 169(1), 155(4), 141(8), 127(14), 99(14), 85(42), 71(82), 57 (100).

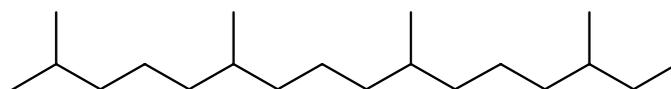
Obtenção do Fitano

Em balão de fundo redondo, adicionou-se o fitol hidrogenado (0,72 g, 2,41 mmoles), à mesma quantidade de CuSO_4 anidro e tolueno (10 mL). Acoplou-se um Dienstark (10 mL), ao balão contido do meio reacional, preenchendo-o com tolueno (10 mL). Ao Dienstark, acoplou-se um condensador e um bolhômetro. A reação procedeu em banho de óleo a 110 ° C, sob agitação, durante 4 horas (Hoffman *et al*, 1980)¹⁹¹. Após este período, o conteúdo reacional foi filtrado em coluna de sílica, utilizando-se diclorometano como eluente.

O solvente foi evaporado a vácuo, obtendo-se 0,52 g (1,84 mmoles) do produto, o qual foi observado através de placas cromatográficas (CCD), utilizando-se os mesmos eluentes e revelador descritos na reação de hidrogenação do fitol. Constatou-se fitano como produto majoritário da

¹⁹¹ Hoffman, R. V.; Bishop, R. D.; Fitch, P. M.; Hardenstein, R.; *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, .917-919.

reação, onde o mesmo foi submetido à purificação por coluna de sílica (23 g, 24 cm) utilizando-se hexano : acetato de etila (90:10), como eluentes. Foram coletadas 21 frações de 10 mL, onde as frações 3 e 4, corresponderam ao fitano puro. Obteve assim, 0,23 g (0,82 mmoles) de fitano, com rendimento reacional de 45%. Análises de CG-EM foram realizadas para a verificação da pureza do produto. Todas as frações correspondentes ao material de partida que não reagiu, ou seja, mantendo-se como fitol hidrogenado, e ainda, frações correspondentes à formação de fiteno a partir da desidratação do fitol hidrogenado, foram submetidas às mesmas reações descritas, desidratação e hidrogenação catalítica, respectivamente, para a obtenção de fitano em maiores rendimentos.



Fitano

CG-EM (70eV), m/z (%): 282 (1), 267(1), 253 (2), 197 (3), 183 (3), 169(2), 155 (2), 141(3), 127(12), 113(12), 99(12), 85(43), 71 (80), 57 (100).

5.2.2. BIOTRANSFORMAÇÕES ANAERÓBIAS DE HIDROCARBONETOS E COMPOSTOS OXIGENADOS PELA MICROBIOTA ANAERÓBIA

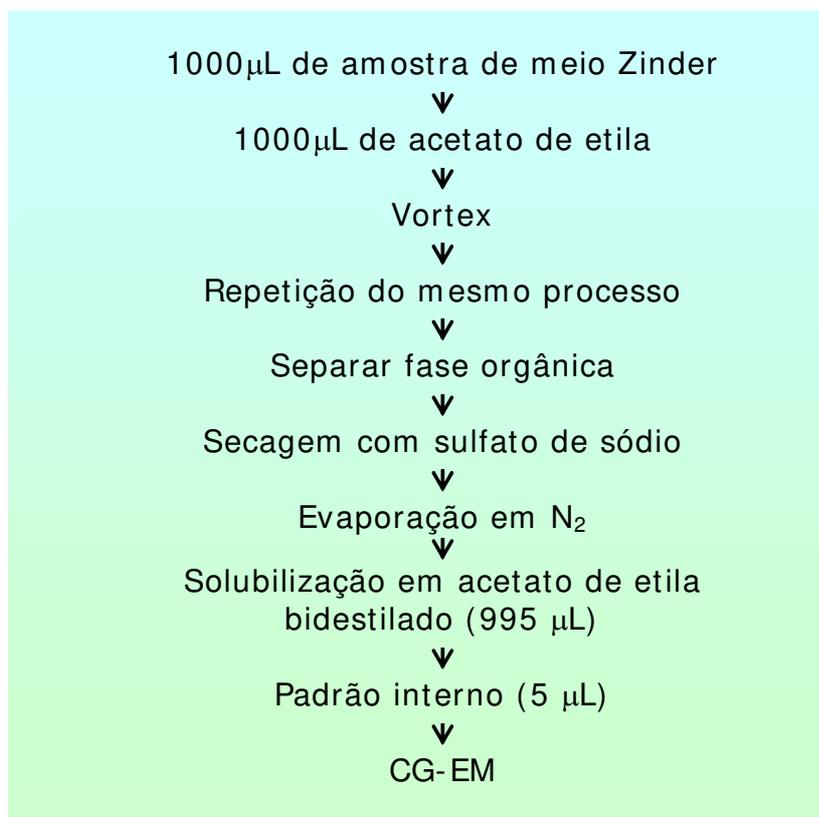
Buscou-se determinar biotransformações de compostos orgânicos presentes no petróleo brasileiro, sob condições anaeróbias, avaliadas através de perfis cromatográficos, obtidos por CG-EM. Os substratos avaliados foram

fitano, 5 α -colestano (Acros, 99% pureza), ácido octadecanóico e β -amirina, por representarem classes distintas de compostos orgânicos, incluindo biomarcadores e bioprecusores do petróleo.

Torna-se importante ressaltar que o ácido octadecanóico utilizado como substrato à biotransformação microbiana, foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Anita J. Marsaioli e sua aluna de Iniciação Científica, Liliane Giroto Cabrini.

Experimento I:

Fitano e Colestano: a mistura entre os dois biomarcadores, fitano e colestano, foi inicialmente avaliada frente ao inóculo, constituído microbiota anaeróbia obtida a partir do enriquecimento das amostras de águas de formação (Coleta 1). Foram pesados 20 mg de cada hidrocarboneto, os quais foram diluídos em 400 μ L de acetato de etila, 400 μ L de etanol absoluto e 200 μ L de Tween 80 (previamente esterilizado). O preparo da solução foi realizado sob fluxo de N₂. Frascos de meio Zinder (30 mL) recém preparados, sob condições anaeróbias (descritas no item 5.1.2.1), foram adicionados das seguintes soluções: 0,3 mL de solução de vitaminas; 0,3 mL de solução de bicarbonato de sódio (10 %); 0,3 mL de solução de sulfato de sódio (aceptor final de elétrons); 1 mL de Fitano e 1 mL Colestano, recém diluídos; 0,3 mL de solução redutora de sulfeto de sódio (10%) e 6 mL de inóculo anaeróbio. A concentração final de fitano e colestano no meio basal foi de 0,025 mg / mL. A atmosfera interna dos meios Zinder foi N₂ / CO₂ (70:30). Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo incubados em agitador rotacional, 150 rpm, 55 °C. Extratos orgânicos foram preparados a partir de alíquotas coletadas, a cada 48 horas, dos experimentos. O Esquema 2, apresenta de forma sucinta o procedimento adotado para a obtenção dos extratos orgânicos e verificação da atividade microbiana sobre os hidrocarbonetos avaliados.



Esquema 2. Protocolo utilizado para obtenção de extratos orgânicos para análise cromatográfica.

Os extratos foram analisados utilizando-se cromatógrafo HP5890II acoplado a detector de massas HP 5970-MSD; injetor tipo splitless; He como gás de arraste, fluxo de 1 mL / min; coluna capilar de sílica fundida do tipo HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), cuja fase estacionária consiste de 5% de fenil metil silicone. O forno foi operado na programação de 100 a 290 °C, em rampa de 20 °C / min, permanecendo à temperatura final durante 10 minutos. O injetor foi operado à temperatura de 220°C. Os dados foram adquiridos utilizando-se o modo varredura (SCAN) e os valores de massa variaram ente 50 e 700 u.m.a (unidades de massa atômica). Os experimentos foram monitorados durante 120 dias.

Experimento II:

Ácido Octadecanóico: as mesmas condições de preparo do substrato (ácido octadecanóico) e inoculação em meio Zinder, descritas no Experimento 1, foram empregadas no presente ensaio. No entanto, tratando-se de extratos de um ácido carboxílico, houve a necessidade da prévia derivatização do ácido ao éster correspondente, através de procedimento clássico de metilação utilizando-se Diazometano, segundo metodologia descrita por Kosak *et al.* (1954)¹⁹².

Experimento III:

β -amirina: este triterpeno foi avaliado como uma mistura entre os isômeros α -amirina e β -amirina, nos experimentos de biotransformação anaeróbia. Novamente as mesmas condições descritas no Experimento 1, tanto para o preparo do substrato, quanto inoculação do meio Zinder, foram aplicadas. Alíquotas foram extraídas utilizando-se o mesmo procedimento descrito pelo Esquema 2, entretanto, os extratos foram previamente sililados, como descrito no item 6.2.1, de forma a diminuir a polaridade da molécula e sua interação com a fase estacionária (Coluna HP-5MS) nas análises cromatográficas. Após sua sililação, os extratos seguiram às análises de CG-EM, utilizando-se o mesmo equipamento e condições descritas no Experimento 1, no entanto, o forno foi operado na seguinte programação: 100 à 290°C, elevando-se a temperatura à 5°C / min, tendo sido mantido à temperatura de 290 °C durante 20 minutos. O injetor foi utilizado na temperatura de 240°C, modo splitless.

¹⁹² Kosak, A. I.; Huntington, C. W.; MacGregor, C. W.; *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*(17), 4481-4482.

5.2.3. BIOTRANSFORMAÇÕES AERÓBIAS DE BIOMARCADORES DO PETRÓLEO

O monitoramento do potencial biodegradador de representantes das espécies bacterianas aeróbias obtidas pelo presente estudo, foi realizado com o intuito de avaliar a atuação de cada cepa isolada sobre misturas de moléculas presentes no petróleo, determinando ou confirmando preferências microbianas ao metabolismo de determinados compostos. Fitano, diidrofenantreno, ácido nonadecanóico e colestano, foram selecionados como biomarcadores a serem avaliados frente às bactérias, representando classes diferenciadas de compostos presentes no petróleo, ou seja, isoprenóides, aromáticos, ácidos lineares e esteranos, respectivamente.

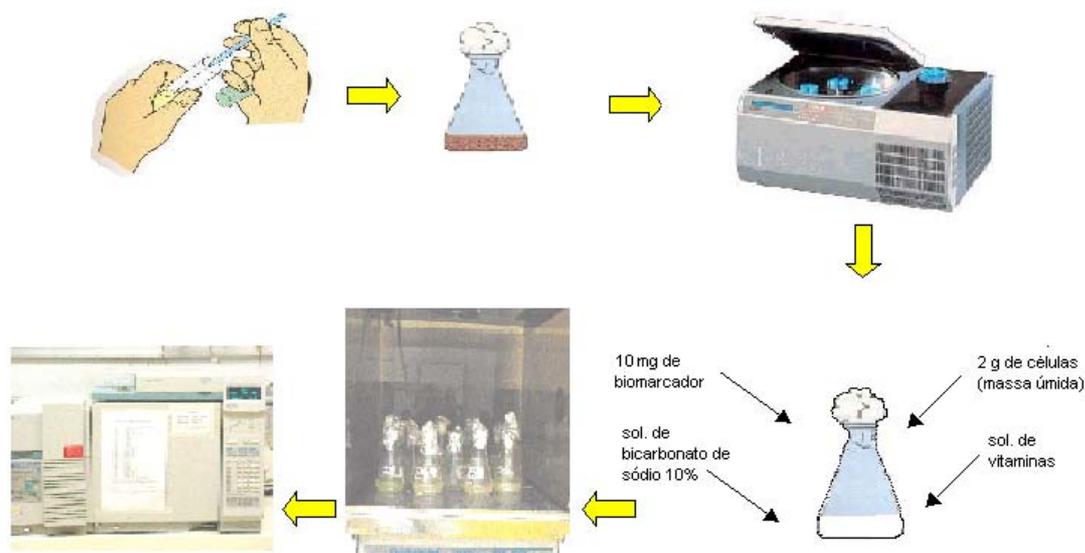
Foram realizados experimentos utilizando-se linhagens aeróbias puras, obtidas a partir dos consórcios microbianos de águas de formação e óleos (Coleta 1), frente aos biomarcadores descritos, tanto em mistura, quanto individualmente. Assim, os experimentos receberam diferentes abordagens, ou seja:

- (1) avaliação de cepas puras frente à misturas de compostos do petróleo;
- (2) avaliação de cepas puras frente à biomarcadores os quais as linhagens apresentaram maior habilidade à degradação, nos ensaios anteriores (compostos em mistura);
- (3) avaliação de consórcios microbianos aeróbios e anaeróbios sobre misturas de biomarcadores do petróleo, analisando a existência de sinergismo entre ambas as microbiotas.

Para a avaliação da atividade microbiana, tanto nos experimentos sob a abordagem 1, quanto 2, realizou-se o crescimento prévio das linhagens em meio sintético Caldo Nutriente (Oxoid), 400 mL. Após 3 dias de incubação à 28° C, em agitador rotacional (150 rpm), as culturas microbianas foram centrifugadas em centrífuga Harrier (modelo 18/80), em 5000 rpm à 18 °C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado, enquanto 2g do precipitado, constituído por massa celular bacteriana úmida, foi adicionado a 40 mL de meio Zinder “modificado” (Esquema 3).

Os biomarcadores foram pesados (0,010g) e em seguida, homogenizados em 300 µL (de Tween 80, 300 µL de etanol absoluto e 400 µL de acetato de etila, totalizando 1 mL de solução, o que resulta na concentração de 0,25 mg de biomarcador por mL de meio. Solução de bicarbonato de sódio (10%) foi adicionada ao meio reacional como agente estabilizador do pH. A solução de vitaminas Zinder (item 5.1.2) também foi adicionada ao meio como forma de ativar o crescimento microbiano e dar início à degradação ou biotransformação dos substratos avaliados.

Controles quanto à pureza do inóculo e ainda para a avaliação da estabilidade dos biomarcadores e do próprio meio de cultura, durante o período de tempo avaliado (40 dias), também foram realizados. Os controles dos inóculos e dos biomarcadores consistiram no preparo dos experimentos sob as mesmas condições descritas pelo Esquema 2, no entanto, não adicionando-se os biomarcadores ou os inóculos, respectivamente, ao meio reacional. O controle do meio de cultura foi realizado pela adição apenas das soluções de bicarbonato de sódio e vitaminas, de modo a controlar a esterilidade das soluções e meio durante os experimentos.



Esquema 3. Resumo esquemático da metodologia adotada nos ensaios de biotransformação.

Os experimentos sob as abordagens 1 e 2 foram realizados em triplicata e incubados em agitador rotacional, 150 rpm / 28° C, durante 40 dias. Os experimentos realizados sob a abordagem 3 tiveram condições diferenciadas, as quais serão descritas detalhadamente. Todos os experimentos, sob as três abordagens, foram monitorados periodicamente (a cada 48 horas), por análises de CG-EM. Previamente às análises cromatográficas todas as amostras foram metiladas segundo metodologia descrita por Kosak *et al.* (1984)¹⁹². As especificações e condições do equipamento foram as seguintes: cromatógrafo HP5890II acoplado a detector de massas HP 5970-MSD, injetor tipo split (10:1), He como gás de arraste, fluxo de 1 mL / min, coluna capilar de sílica fundida do tipo HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), cuja fase estacionária consiste de 5% de fenil metil silicone. O forno foi operado na programação de 60 à 290°C, em rampa de 20°C/min, tendo sido mantido a 290 °C durante 5 minutos. O injetor foi utilizado à temperatura de 240°C. Os dados foram

adquiridos utilizando-se o modo varredura (SCAN) e os valores de massa variaram entre 50 e 700 u.m.a (unidades de massa atômica).

Abordagem 1: Coquetéis de biomarcadores frente à linhagens puras

I) 9,10-Diidrofenantreno + Fitano + bactérias isoladas

A mistura dos hidrocarbonetos foi investigada frente aos seguintes microrganismos: *Bacillus megaterium*, *Microbacterium* sp., *Methylobacterium* sp., *Pseudomonas stutzeri*, e *Halomonas* sp., os quais foram isolados e purificados a partir de amostras de águas de formação de petróleo e óleos biodegradados, provenientes da Coleta 1.

Estes biomarcadores foram avaliados como forma de verificação da capacidade das linhagens aeróbias à biotransformar hidrocarbonetos, utilizando-os como únicas fontes de carbono. 9,10-Diidrofenantreno é apresentado como produto comercialmente disponível (Acros, 99% de pureza), enquanto fitano foi preparado segundo condições descritas no item 5.2.1.

II) 9,10-Diidrofenantreno + Fitano + Ácido Nonadecanóico + 5 α -Colestano + bactérias isoladas

O coquetel de biomarcadores foi avaliado frente às seguintes bactérias: *Micrococcus* sp., *Dietzia* sp., *Pseudomonas stutzeri*, *Brevibacillus* sp., *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus* sp. e *Bacillus subtilis*.

Os biomarcadores foram avaliados como forma de verificação da preferência de linhagens aeróbias a biotransformação de hidrocarbonetos ou compostos oxigenados, tais como ácido nonadecanóico.

Abordagem 2: Linhagens puras frente à biomarcador

Utilizando-se as mesmas metodologias descritas pelos Esquemas 2 e 3, linhagens puras que apresentaram maior afinidade pela biotransformação de determinados biomarcadores foram avaliados frente aos mesmos, individualmente. Assim, os seguintes experimentos foram realizados:

- *Bacillus subtilis* e *Methylobacterium* sp. frente a diidrofenantreno;
- *Bacillus subtilis* e *Micrococcus* sp. frente a fitano;
- *Achromobacter xylosoxidans*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas stutzeri*, *Dietzia* sp. e *Bacillus pumilus* frente a colestano.

Abordagem 3: Sinergismo entre a microbiota aeróbia e anaeróbia sobre misturas de biomarcadores do petróleo

As linhagens aeróbias isoladas e identificadas a partir das amostras de águas de formação de petróleo e óleos (Coleta 1) foram inoculadas em Caldo Nutriente (Oxoid), 400 mL, como um consórcio (cultura mista), simulando a composição da microbiota inicial. O consórcio aeróbio foi incubado em agitador rotacional, 150 rpm, durante 48 horas. Após este período, seguiu-se o mesmo procedimento descrito pelo Esquema 2. Entretanto, as condições de preparo, biomarcadores avaliados, inoculação e incubação microbiana, foram diferenciadas.

O meio Zinder foi preparado sob condições aeróbias, no entanto foi adicionado de resazurina. Após sua esterilização (121 °C/ 20 min) e resfriamento, à temperatura ambiente, o meio foi adicionado de 0,1 % das soluções de bicarbonato de sódio e vitaminas, já descritas.

Além da inoculação de 2 g do precipitado celular aeróbio, as microbiotas de arqueias metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato (BRS), pré-enriquecidas a partir de amostras de águas de formação de petróleo (Coleta 2), segundo descrito nos itens (5.1.2.1 e 5.1.2.2), também foram utilizadas como inóculo microbiano. Foram adicionados 4 mL das microbiotas anaeróbias, ou seja, 2 mL do enriquecimento de arqueias metanogênicas (coleta 2) e o mesmo volume dos enriquecimentos de BRS, 1 mL de cada condição descrita no item 5.1.2.2.

Como coquetel de biomarcadores utilizou-se a mistura entre 9,10-Diidrofenantreno, Fitano, Ácido Nonadecanóico e Diidrocolesterol (Acros, 99% de pureza), sendo que 5 mg de cada biomarcador foram diluídos no sistema tween 80 (200 µL), acetato de etila (400 µL) e etanol absoluto (400 µL), totalizando 0,125 mg de cada biomarcador por mL de meio reacional.

Adicionou-se 0,1% de solução de sulfato de sódio (descrita no item 5.1.2.1) como acceptor final de elétrons para BRS que estivessem participando das microbiotas anaeróbias avaliadas. Os meios foram vedados por tampas de borracha de butila, estéreis, e selados por lacres de alumínio, no entanto, foram incubados sob condições aeróbias, ou seja, não foi realizada a troca da atmosfera dos frascos para N₂ / CO₂ (70 : 30).

O experimento foi realizado em pentaplicata, sendo realizados controles quanto à esterilidade do meio reacional, estabilidade do coquetel de biomarcadores e perfis das microbiotas avaliadas, segundo descrito anteriormente para os experimentos sob as abordagens 1 e 2.

Os meios inoculados foram incubados em estufa DBO, durante 20 dias a 30 °C. Após este período, adicionou-se a solução redutora de Na₂S aos meios, verificando-se sobre a ausência de oxigênio nos mesmos. A ausência de cor rósea foi indicativa do consumo do oxigênio dos meios, transferindo-se

os mesmos à incubação em estufa DBO, a 55 °C, de modo a permitir o crescimento das microbiotas anaeróbias inoculadas.

O monitoramento da biotransformação do coquetel de biomarcadores investigados, também foi realizado por CG-EM, sob as mesmas condições descritas para as demais abordagens, no entanto, a periodicidade das análises foi de 48 horas, durante o período aeróbio de incubação (30 °C) e a cada 15 dias, durante a anaerobiose (55 °C). O experimento foi monitorado durante o período total de 120 dias.

5.3. CAPÍTULO 3 –PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXOPOLÍMEROS DE BACTÉRIAS DO PETRÓLEO BRASILEIRO

Estes experimentos foram realizados no Instituto de Biogeoquímica da Universidade de Hamburgo, Alemanha, sob supervisão do Prof. Dr. Walter Michaelis, através de projeto de colaboração IQ-Unicamp, CAPES/ DAAD, Hamburg University.

5.3.1. REATIVAÇÃO DAS CULTURAS BACTERIANAS

Foram selecionadas 10 linhagens bacterianas, de espécies distintas, recuperadas a partir das amostras de águas de formação e óleos provenientes da Coleta 1. Estas culturas mantinham-se preservadas em tubos de ágar nutriente (NA Biobrás) inclinado (“slants”), sob refrigeração a 4 °C. A reativação das bactérias se deu pela inoculação de cada linhagem em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio Zinder “modificado” adicionado de 0,1 mL das soluções de bicarbonato de sódio e de vitaminas, previamente descritas no item 5.1.2. Solução de glicose (8 mg/mL) foi adicionada ao meio como fonte de carbono e energia às bactérias. A solução de glicose foi preparada pela diluição do açúcar em água ultra purificada, seguindo-se à esterilização em autoclave, durante 20 minutos a 121 °C.

As culturas inoculadas foram incubadas em estufa DBO à 30 °C durante 48 horas.

5.3.2. PREPARO DE SOLUÇÕES DE SUBSTRATOS ORGÂNICOS

Foram preparadas soluções de substratos orgânicos a serem utilizados como fontes de carbono aos microrganismos, para a produção de exopolímeros.

[1] Solução de glicose

Pesou-se 800 mg de glicose PA (Fluka) e dissolveu-se em 100 mL de água destilada. Acondicionou-se a solução em frasco Schott (250 mL) e esterilizou-se em autoclave a 121 °C, durante 20 minutos. A solução estoque foi mantida sob refrigeração a 4 °C.

[2] Solução de fenantreno

Em área ao redor da chama de bico de Bunsen, de forma a ter-se área de trabalho asséptica, pesou-se 160 mg de fenantreno (Fluka, 99% de pureza) e dissolveu-se em 20 mL de etanol absoluto, previamente esterilizado em autoclave (121 °C, 20 min). A solução foi submetida à banho de ultrassom (marca Thornton, modelo T14), durante 5 minutos à 30 °C, onde após a completa dissolução do hidrocarboneto armazenou-se a mesma sob refrigeração à 4°C.

[3] Solução de octadecano

Pesou-se 160 mg de octadecano (Merck, 99% de pureza) e procedeu-se da mesma forma descrita para o preparo da solução [2].

5.3.3. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EXOPOLÍMEROS MICROBIANOS

A produção de exopolímeros (EPS) microbianos pelas 10 linhagens selecionadas foi avaliada frente a diferentes fontes de carbono: [1] glicose (Fluka); [2] fenantreno (Fluka); [3] octadecano (Fluka) e [2 + 3] mistura entre octadecano e fenantreno.

Realizados os procedimentos descritos no item 5.3.1, as 10 linhagens foram transferidas, individualmente, para erlenmeyers de 500 mL, contendo 400 mL de meio Zinder modificado e adicionou-se 4 mL de cada uma das soluções descritas anteriormente (vitaminas e bicarbonato de sódio). Adicionou-se 1 mL das soluções estoque [1], [2], [3] e [2 + 3], obtendo-se a concentração final de 0,02 mg/mL de cada substrato no meio reacional. Nos experimentos em que se avaliou a produção de EPS microbianos utilizando-se a mistura dos hidrocarbonetos, octadecano e fenantreno, adicionou-se 1 mL de cada solução estoque [2] e [3], aos meios de cultura. Após a adição dos substratos, inoculou-se 10 mL das bactérias, previamente cultivadas em meio Zinder modificado (item 5.3.1). Torna-se importante ressaltar que cada linhagem foi avaliada frente a cada uma das soluções estoque, como experimentos individuais, os quais foram realizados em duplicata. Os ensaios foram incubados por 4 dias a 30 °C em estufa DBO.

Após este período as culturas foram centrifugadas em 7700 rpm durante 15 min à 4 °C, utilizando-se centrífuga Biofuge Heraeus (modelo Primo R). O precipitado celular foi acondicionado em tubos Falcon e armazenado em freezer (-20 °C). O EPS, o qual ficara retido no sobrenadante, foi transferido a balão de fundo redondo (1000 mL) e rotaevaporado até o volume de 30 mL. Assim, o EPS, já concentrado, foi precipitado com três volumes de etanol absoluto gelado, dissolvido em água destilada estéril e centrifugado a 5000 rpm durante 15 minutos, à temperatura ambiente, segundo metodologia descrita por Quesada *et al* (1993)¹²⁵ e Calvo *et al.* (2002)⁷¹. O “pellet” obtido foi dissolvido em água destilada, dialisado em água Ultra purificada durante 24 horas. Separou-se 50% do volume do EPS dialisado para análises quanto à determinação dos teores de carboidratos, proteínas e ácidos urônicos.

O volume restante (50%) do EPS já dialisado, assim como a biomassa gerada durante o período de incubação da cultura junto aos hidrocarbonetos avaliados, foram liofilizados, separadamente, durante 48 horas. Através da relação entre os valores obtidos entre a massa de EPS produzida e a biomassa do microrganismo, após a liofilização, obteve-se o rendimento em termos de rendimento total de EPS em miligramas por grama de biomassa (EPS seco, em mg / biomassa seca, em g = mg EPS produzido por grama de células), lembrando-se que o valor obtido quanto à massa de EPS liofilizado foi multiplicada por 2, uma vez que metade do volume inicial (dialisado), foi destinada às análises descritas a seguir (item 5.3.4)

5.3.4. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS EPS MICROBIANOS

Os teores de carboidratos, proteínas e ácidos urônicos dos EPS microbianos (“pellet” dialisado), produzidos frente a diferentes fontes de carbono foram determinados por ensaios colorimétricos, determinados através de medidas espectrofotométricas de absorbância, realizadas em espectrofotômetro Kontron (modelo UVIKON 930)

Para a determinação de carboidratos utilizou-se a metodologia de Dubois *et al.* (1956)¹⁶⁴, baseada no uso de fenol (solução aquosa 5%) e ácido sulfúrico concentrado (95,5%) para promover a digestão de carboidratos e liberação de açúcares, com conseqüente liberação de cor (alaranjada). Em tubos de ensaio, previamente lavados com acetona e secos em estufa a 100 °C, diluiu-se 0,4 mL do EPS dialisado em 0,4 mL de água ultra purificada e adicionou-se o mesmo volume (0,4 mL) da solução de fenol (5%). Homogenizou-se a mistura em vortex e adicionou-se 2 mL da solução de ácido sulfúrico concentrado (95,5%). Novamente, agitou-se os tubos em vortex. Como controle negativo adicionou-se 0,8 mL de água ultra purificada à 0,4 mL da solução de fenol e 2 mL de ácido sulfúrico. Manteve-se as reações em repouso durante 10 a 20 minutos. As reações foram realizadas em duplicata. O teor de açúcares foi averiguado através de análises espectrofotométricas de absorbância no comprimento de onda de 490 nm.

Tendo-se uma curva de valores de absorbância determinados a partir de soluções de glicose a concentrações conhecidas (50, 25, 12,5 e 6,25 mg/mL), comparou-se os valores de absorbância das amostras dos EPS microbianos,

aferindo-se a concentração de carboidratos presentes em função da curva de calibração de glicose (Figura 78).

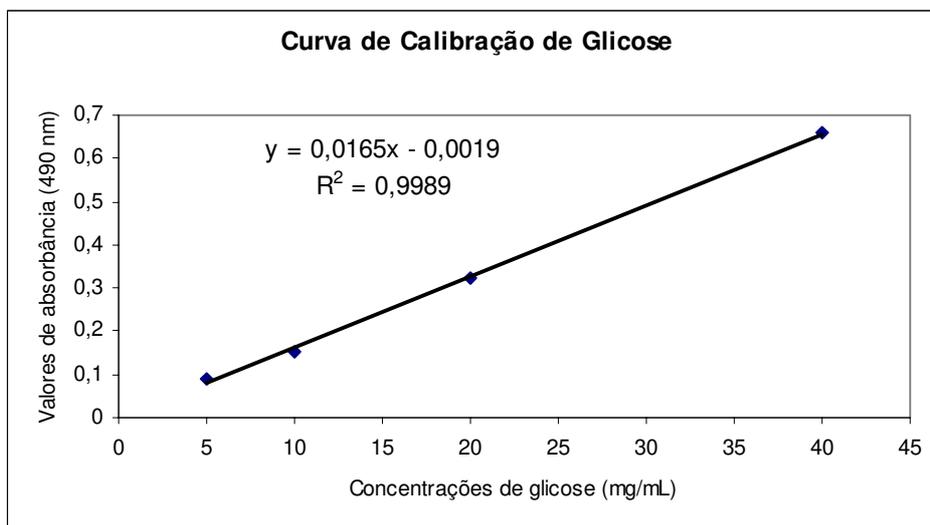


Figura 78. Curva de calibração de glicose, incluindo equação da regressão linear, definindo linha de tendência entre os pontos.

A concentração de carboidratos foi então expressa como valores equivalentes a miligramas de glicose, através da aplicação da seguinte equação:

$$(Abs+0,019)/0,016$$

onde: Abs corresponde à média entre os valores de absorvância aferidos à 490 nm, das amostras de EPS microbianos, analisadas em duplicatas.

Torna-se importante ressaltar que as reações de digestão da glicose foram realizadas da mesma forma descrita acima, entretanto adicionou-se 0,8 mL da solução de glucose, previamente preparada nas respectivas concentrações, à 0,4 mL da solução de fenol.

A metodologia descrita por Bradford (1976)¹⁶⁵ foi empregada para a determinação do teor de proteínas presentes nos EPS microbianos. Preparou-

se inicialmente a solução de “Brilliant Blue Coomassie”, a qual foi obtida a partir da diluição do corante (0,1 g) em etanol 95% (50 mL) e ácido fosfórico 85% (100 mL), completando-se o volume a 1000 mL, com água ultra purificada. Albumina de Soro Bovino (BSA, Aldrich 99% de pureza) foi diluída em solução aquosa de NaCl (0,15M), obtendo-se padrões de quantificação às concentrações de 1; 0,5; 0,25 e 0,125 mg/mL, á uma curva padrão para determinação do teor de proteínas das amostras. Tubos de ensaio, previamente lavados com acetona e secos (100 °C), foram adicionadas de 250 µL de EPS dialisado e 2,5 mL da solução de “Brilliant Blue Coomassie”, seguindo-se à homogenização em vortex. Como controle negativo, adicionou-se 250 µL da solução aquosa de NaCl (0,15M), em substituição ao EPS. O mesmo procedimento também foi adotado com relação às soluções padrões de BSA. O teor de proteínas das amostras foi determinado através de análises espectrofotométricas de absorbância no comprimento de onda de 595 nm.

Os teores de ácidos urônicos foram determinados empregando-se a metodologia proposta por Blumenkratz e Asboe-Hansen (1973)¹⁶⁶. Preparou-se uma solução 0,15 % de meta-hidroxi-difenila (PA, Aldrich) em 0,5% de NaOH. Uma solução 0,0125 M de tetraborato de sódio (PA, Aldrich) em ácido sulfúrico concentrado, também foi preparada. Em tubos de ensaio adicionou-se 0,4 mL de EPS e 2,4 mL de solução de tetraborato de sódio. Manteve-se os tubos em estufa a 100 °C, durante 45 minutos, seguindo-se imediatamente a banho de gelo, durante 5 minutos. Adicionou-se 40 µL da solução de meta-hidroxi-difenila, agitou-se em vortex e verificou-se a densidade óptica através de análises espectrofotométricas de absorbância a 520 nm. Curva padrão, utilizando-se ácido galacturônico às mesmas concentrações descritas para BSA, também foi empregada para determinar a concentração de ácidos

urônicos nas amostras. Água ultra purificada foi utilizada em substituição às amostras de EPS, como controle negativo.

5.3.5. CRESCIMENTO BACTERIANO FRENTE A HIDROCARBONETOS

Em tempo 0 e a cada 48 horas, alíquotas de 1 mL foram retiradas dos meios reacionais contendo hidrocarbonetos, para a verificação do aumento da densidade celular, através de análises espectrométricas de absorbância no comprimento de onda de 450 nm, de acordo com metodologia proposta por Johnsen *et al* (2002)¹⁶³, onde o aumento da turbidez do meio de cultura é relacionado ao aumentos da densidade celular microbiana. Utilizou-se o mesmo espectrofotômetro descrito no item 5.3.4, para a realização das aferições de absorbância.

Assim, a partir dos valores de absorbância obtidos no decorrer do período avaliados, ou seja, 4 dias, construiu-se curvas do crescimento microbiano de cada cultura, em função dos hidrocarbonetos que lhes foram oferecidos como substratos.

5.3.6. BIODEGRADADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS

Da mesma forma descrita no item 5.3.5, alíquotas de 1 mL foram retiradas dos experimentos para a verificação dos perfis de biodegradação do octadecano e do fenantreno, isoladamente ou combinados, pelas linhagens avaliadas.

Para a extração dos compostos orgânicos presentes nas alíquotas, utilizou-se o mesmo procedimento descrito pelo Esquema 2, no entanto, empregou-se hexano como solvente.

Os extratos orgânicos foram secos sob fluxo de N₂ e adicionados de 50 µL de solução estoque de 5α-colestano (0,02 mg/mL), o qual foi utilizado como padrão de quantificação interna nas análises de CG-EM. A solução de 5α-colestano, foi preparada pela dissolução do 2 mg do esterano em 100 mL de cicloexano, em balão volumétrico. Tanto a solução estoque de 5α-colestano, quanto os extratos orgânicos, dissolvidos na mesma, foram armazenados sob refrigeração a 4 °C.

Os extratos foram analisados em cromatógrafo Varian (modelo CP 3800), acoplado a detector de massas; injetor tipo splitless; He como gás de arraste, fluxo de 1 mL / min; coluna capilar de sílica fundida do tipo DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), cuja fase estacionária consiste de 5% de fenilpolimetilsiloxano. O forno foi operado na programação de 80 °C, durante 5 minutos, com rampa de 10 °C / min, à temperatura final de 310 °C, durante 20 minutos. O injetor foi operado à temperatura de 240°C. Os dados foram adquiridos utilizando-se o modo varredura (SCAN) e os valores de massa variaram entre 50 e 700 u.m.a (unidades de massa atômica).

5.4. CAPÍTULO 4 – ENSAIOS DE TRIAGEM ENZIMÁTICA DE ALTO DESEMPENHO (HTS)

5.4.1. REATIVAÇÃO E PREPARO DOS MICRORGANISMOS

Nos ensaios de triagem enzimática de alto desempenho avaliou-se todas as bactérias aeróbias que foram enriquecidas, isoladas e identificadas a partir das amostras de águas de formação e óleos biodegradados, provenientes da Coleta 1.

Os microrganismos foram cultivados em Ágar Nutriente (Biobras), sendo incubados durante 48 horas a 28°C. As colônias desenvolvidas sobre a superfície do ágar foram removidas com o auxílio de uma espátula estéril e transferidas para tubos eppendorf, seguindo-se à pesagem dos mesmos (o peso obtido foi registrado como massa úmida).

5.4.2. PREPARO DE SOLUÇÕES

5.4.2.1. SONDAS FLUOROGÊNICAS

A atividade enzimática microbiana foi avaliada frente à 5 sondas fluorogênicas, descritas anteriormente na seção de Resultados e Discussão do Capítulo 3, as quais foram sintetizadas e gentilmente cedidas pela Dra Luciana G. Oliveira e Dra. Lu Shi Chen.

As sondas foram inicialmente solubilizadas em acetonitrila, fornecendo soluções estoque à concentração de 20 mM do substrato. Uma segunda

diluição foi realizada, em H₂O:CH₃CN (1:1, v/v), obtendo-se uma solução 2 mM de cada sonda, a qual constituiu a solução trabalho.

As soluções, tanto estoque, quanto trabalho, foram mantidas sob refrigeração, a 4 °C.

5.4.2.2. SOLUÇÃO TAMPÃO BORATO

A solução tampão borato 20 mM, pH 8,8, foi preparada segundo procedimento descrito no manual “*Preparation of buffers for use in enzyme studies*”¹⁹³.

5.4.2.3. SOLUÇÃO DE PERIODATO DE SÓDIO

A solução de periodato de sódio foi utilizada na concentração de 20 mM, preparada a partir da dissolução de 4,3 mg do sal em 1 mL de água ultra purificada. É importante ressaltar que esta solução era preparada no momento da realização dos experimentos de HTS, não sendo permitido seu armazenamento.

5.4.2.4. SOLUÇÕES DE BSA

A solução de BSA (albumina de soro bovino) para a determinação da atividade de hidrolases foi preparada pela dissolução de 5 mg da proteína em 1 mL de solução tampão borato, agitando-se suavemente de modo a não gerar emulsão. A mesma solução foi preparada para a determinação da atividade de

¹⁹³ Gomori, G. Em *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology – Physical and Chemical Data*, Fasman, G.D., eds.; CRC-Press Inc.:Boca Raton, Florida, 2000, p. 370-377.

monooxigenases, no entanto, 4,4 mg da proteína foi solubilizada em 1 mL de solução tampão borato.

5.4.3. ENSAIOS DE HTS

Previamente à realização dos ensaios, quantidade suficiente de solução tampão borato 20 mM pH 8,8, foi adicionado às células para o preparo das suspensões, de modo a obter-se a concentração final de 0,2 mg de células por mL de solução.

5.4.3.1. LEITURAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS DE FLUORESCÊNCIA

As medidas de fluorescência, emitidas pelas reações enzimáticas microbianas, foram realizadas em espectrofotômetro *Flashscan 530 Analytic Jena*, utilizando-se filtro λ_{ex} 460 ± 20 nm. O aumento dos valores de fluorescência emitida, nos sistemas avaliados, foi relacionado à liberação de umbeliferona no meio reacional e conseqüente atividade enzimática.

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

5.4.3.2. DETECÇÃO DAS ATIVIDADES DE HIDROLASES

A 10 μ L da solução dos substratos, à concentração de 2 mM, em H₂O:CH₃CN (1:1), foram adicionados 80 μ L de solução de BSA a 5 mg / mL, em tampão borato 20 mM pH 8,8. Finalmente, 100 μ L das suspensões de células microbianas e 10 μ L de solução aquosa de NaIO₄ 2mM, foram adicionados às micro-reações. Controles negativos foram realizados à semelhança, porém substituindo a suspensão celular por solução tampão. Controles para a determinação da autofluorescência do microrganismo também foram realizados, substituindo-se 10 μ L das soluções de sondas, por solução tampão borato. Os controles positivos foram determinados pela substituição de 10 μ L das soluções de sondas, por soluções dos produtos esperados a partir da liberação de umbeliferona, mantendo-se as mesmas condições reacionais de forma a verificar se as suspensões celulares não poderiam mascarar resultados positivos de atividade enzimática.

As reações foram monitoradas durante 10 horas, através de leituras de fluorescência, com intervalos de 3 minutos, realizadas pelo espectrofotômetro descrito pelo item 5.4.3.1.

5.4.3.3. DETECÇÃO DAS ATIVIDADES DE BAEYER-VILLIGER MONOOXIGENASES

A 10 μ L da solução das sondas, à concentração de 2 mM, em H₂O:CH₃CN (1:1), foram adicionados 90 μ L de solução de BSA a 4,4 mg / mL, em tampão borato 20 mM pH 8,8. Finalmente, 100 μ L das suspensões de

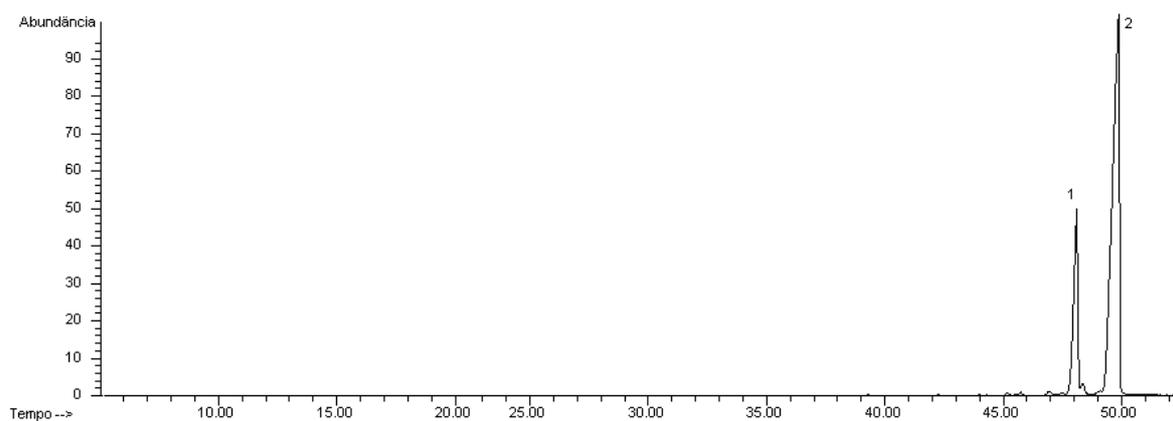
células microbianas totalizando 200 μL de volume final reacional, não havendo a adição de solução de periodato de sódio. Controles negativos foram realizados à semelhança, porém substituindo a suspensão celular por solução tampão. Controles para a determinação da autofluorescência do microrganismo também foram realizados, substituindo-se 10 μL das soluções de sondas, por solução tampão borato. Os controles positivos foram determinados pela substituição de 10 μL das soluções de sondas, por soluções dos produtos esperados.

As reações foram monitoradas durante 24 horas, através de leituras de fluorescência, com intervalos de 10 minutos, realizadas no espectrofotômetro descrito no item 5.4.3.1.

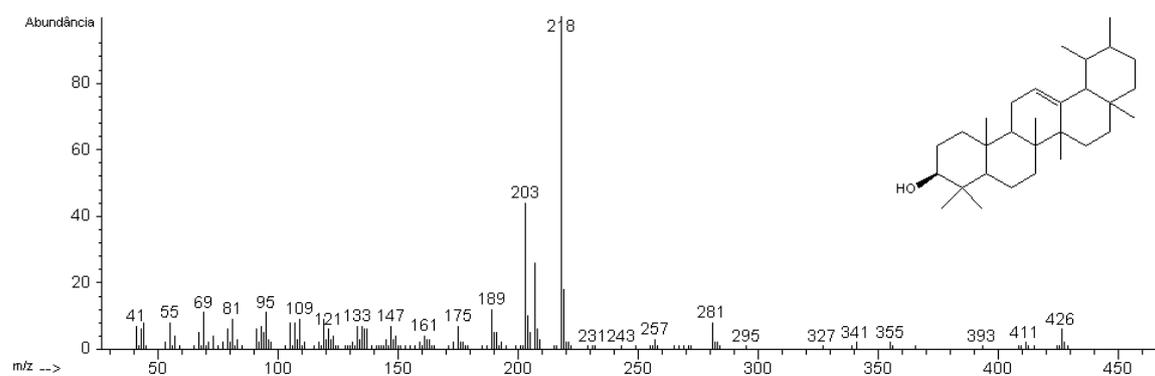
6. ANEXOS

ÍNDICE DE ANEXOS

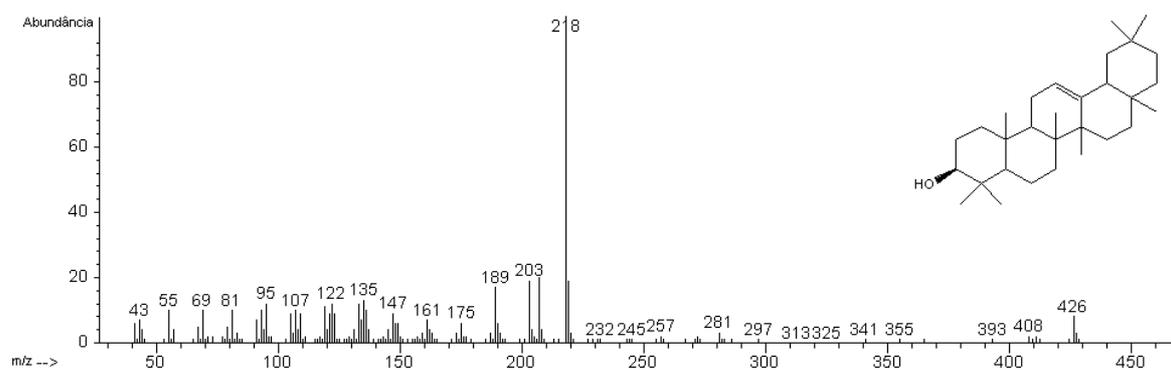
E01	Cromatograma de corrente iônica total da mistura entre α -amirina (1) e β -amirina (2).	215
E02	Espectro de massas da α -amirina.	215
E03	Espectro de massas da β -amirina.	215
E04	Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) da mistura de α -amirina e β -amirina.	216
E05	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (75,45 MHz, CDCl_3) da mistura de α -amirina e β -amirina.	216
E06	Cromatograma de corrente iônica total do fitol hidrogenado.	217
E07	Espectro de massas do fitol hidrogenado.	217
E08	Cromatograma de corrente iônica total do fitano.	217
E09	Espectro de massas do fitano.	218



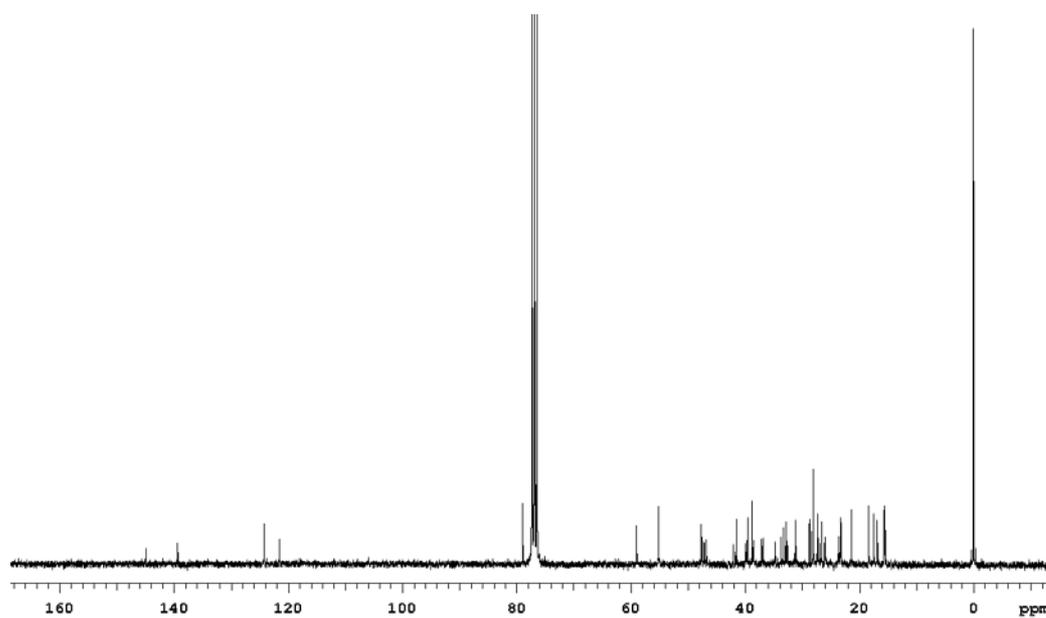
E01. Cromatograma de corrente iônica total da mistura entre α -amirina (1) e β -amirina (2).



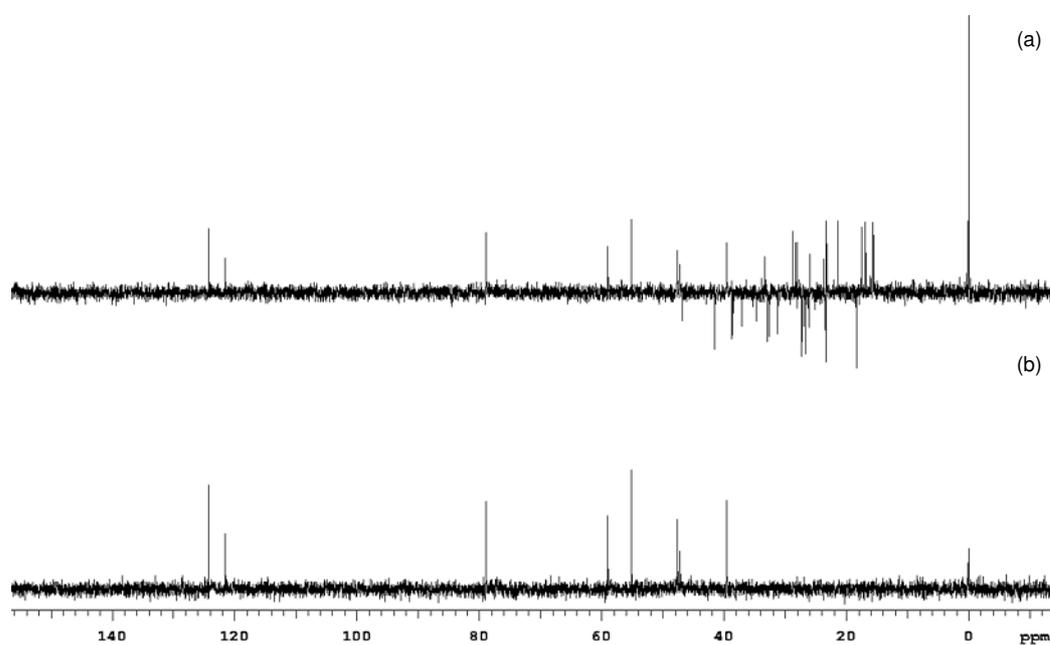
E02. Espectro de massas da α -amirina.



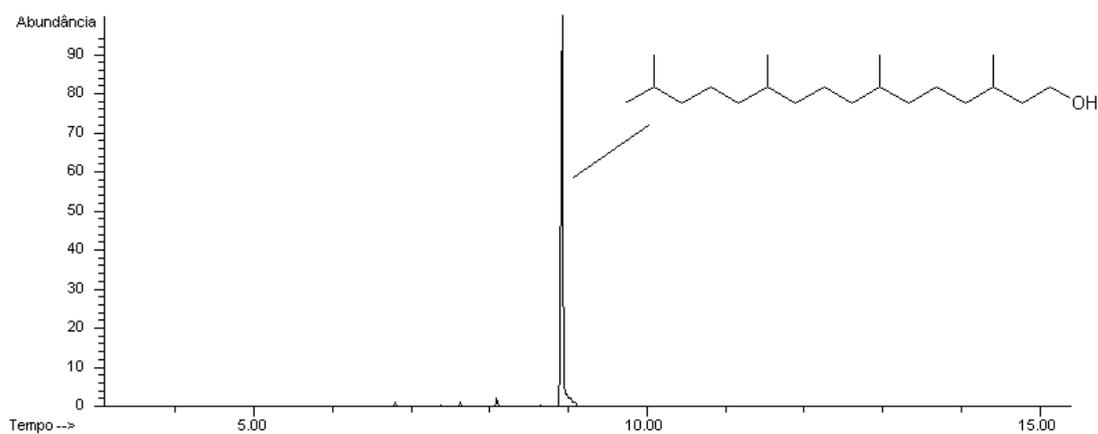
E03. Espectro de massas da β -amirina.



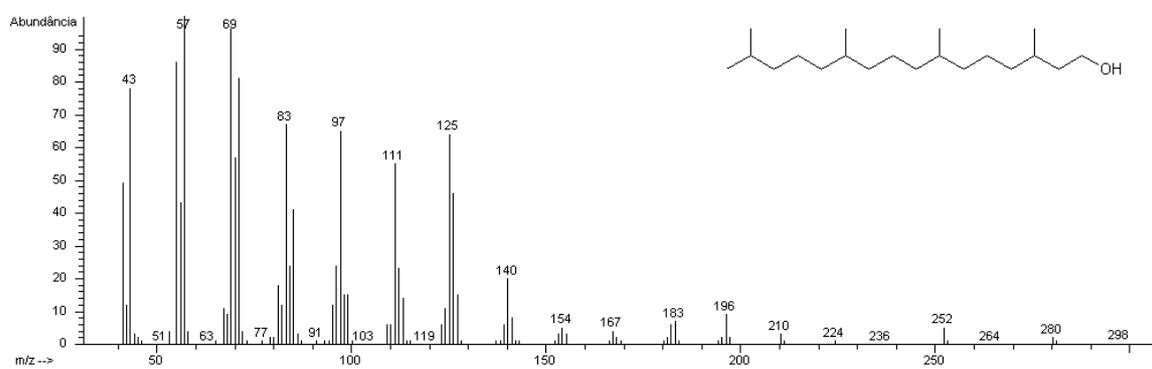
E04. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) da mistura de α -amirina e β -amirina.



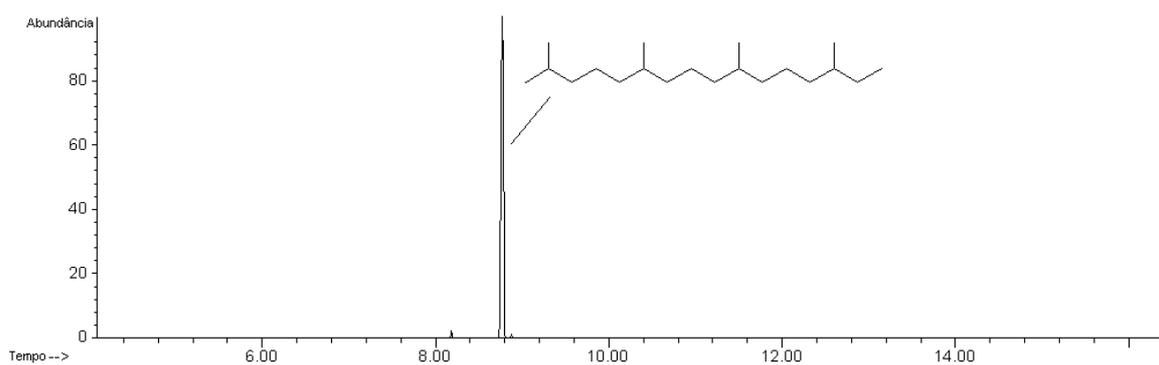
E05. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (a) DEPT 90° e (b) DEPT 135° (75,45 MHz, CDCl_3) da mistura de α -amirina e β -amirina.



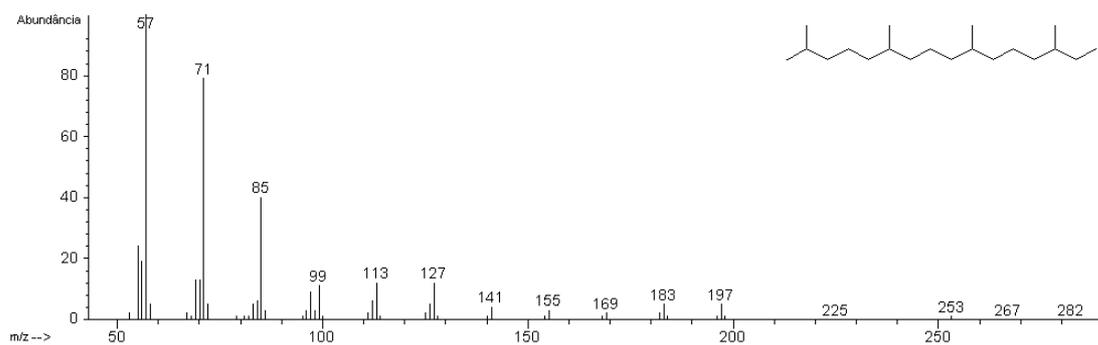
E06. Cromatograma de corrente iônica total do fitol hidrogenado.



E07. Espectro de massas do fitol hidrogenado.



E08. Cromatograma de corrente iônica total do fitano.



E09. Espectro de massas do fitano.