



Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação Engenharia Ambiental
Mestrado em Engenharia Ambiental

Débora Regina Figueiredo Silva

**“DETECÇÃO DE ESPÉCIES BACTERIANAS ENVOLVIDAS EM
PROCESSOS DE BIODISSULFURIZAÇÃO EM UM SISTEMA DE
LANDFARMING, NA REFINARIA GABRIEL PASSOS (REGAP),
MINAS GERAIS.”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Engenharia Ambiental,
Universidade Federal de Ouro Preto, como parte
integrante dos requisitos necessários para a
obtenção do título: “Mestre em Engenharia
Ambiental - Área de concentração: Saneamento
Ambiental”

Orientadora: Prof^a Dr^a Gabriela Frois Duarte

Ouro Preto, MG
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

“Nenhuma grande vitória é possível sem que tenha sido precedida de pequenas vitórias sobre nós mesmos.”

L. M. Leonov

*À minha mãe, pelo apoio incondicional
dado a todo momento*

*Ao meu pai, que onde quer que esteja
constitui uma peça fundamental para essa vitória*

*Aos meus irmãos Léo e Renata
pelo incentivo*

*Ao Glaucon,
o anjo que me colocou nesse caminho,
pelo amor e pela força para suportar a distância.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter colocado em meu caminho esta grande oportunidade.

À Prof. Dra. Gabriela, pela orientação, confiança, amizade e pela oportunidade de conhecer a microbiologia. Obrigada por tudo.

Ao Douglas, por estar sempre disposto a ajudar em todos os momentos que precisei. Obrigado, amigo pela grande amizade e pelo companheirismo durante todo o desenvolvimento do trabalho.

À Jaqueline, pela amizade e companheirismo nesta etapa da minha vida. Obrigada amiga.

À Lílian, pela força e os ensinamentos da Biologia Molecular. Valeu Lílian.

Aos alunos do laboratório de parasitologia Lívia e Maicon pela colaboração para conclusão da parte molecular do projeto.

Aos colegas do laboratório Camila, Lívia, Érika pelo apoio e incentivo.

Às amigas da República: Marisa pela sua calorosa acolhida em minhas vindas a Ouro Preto, Mariana pela sua amizade e o apoio e a mais nova moradora Thaís pela acolhida durante minha estadia em Ouro Preto.

Ao Luiz e a Marly, por toda sua ajuda e apoio técnico para realização do projeto.

Ao Laboratório de Parasitologia pela utilização do laboratório para realização de experimentos de Biologia Molecular.

Ao Laboratório de Química do Prof. Dr. Cornélio pelo uso do espectrofotômetro.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	4
2.1. Objetivo geral.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
3. Revisão bibliográfica.....	5
3.1. Presença de Enxofre nos Combustíveis Fósseis.....	5
3.2. Biodessulfurização.....	7
3.3. Vias metabólicas para utilização do DBT.....	8
3.4. <i>Landfarming</i>	13
4. Material e Métodos.....	17
4.1. Coleta das amostras.....	17
4.2. Isolamento de estirpes e condições de cultivo.....	17
4.3. Teste presuntivo para verificação da capacidade de dessulfurização do DBT.....	19
4.4. Curva de crescimento das estirpes selecionadas.....	19
4.5. Caracterização dos isolados.....	20
4.5.1. Caracterização fenotípica.....	20
4.5.2. Caracterização genotípica.....	20
4.5.2.1. Extração de DNA de culturas puras.....	20
4.5.2.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	21
4.5.2.3. Análise de similaridade dos perfis genômicos dos isolados usando UPGMA.....	23
4.5.2.4. Sequenciamento.....	23
4.5.2.5. Análise filogenética.....	23
4.6. HPLC.....	24
5. Resultados.....	25
5.1. Enumeração das populações bacterianas isoladas de amostras de solo contaminadas com petróleo.....	25
5.2. Teste presuntivo para verificação presuntiva da capacidade de dessulfurização do DBT.....	26
5.3. Curvas de crescimento em meio seletivo.....	27
5.4. Caracterização dos isolados.....	33
5.4.1. Caracterização fenotípica.....	33
5.4.2. Caracterização genotípica.....	35
5.4.2.1. Amplificação das seqüências genômicas repetitivas BOX.....	35
5.4.2.2. Análise de similaridade dos perfis genômicos dos isolados usando UPGMA.....	37
5.4.2.3. Sequenciamento.....	40
5.4.2.4. Análise filogenética.....	40
5.5. Verificação da capacidade de dessulfurização do DBT.....	41
6. Discussão.....	43
7. Conclusão.....	52
8. Sugestões para trabalhos futuros.....	53
9. Referências bibliográficas.....	54
Anexo.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Regulações internacionais para emissões de enxofre atuais e previstas (Monticello, 1998)

Tabela 4.1 - Reagentes utilizados na reação de PCR

Tabela 5.1 - Enumeração de populações bacterianas isoladas das amostras de solo contaminadas com petróleo

Tabela 5.2 - Descrição morfológica, arranjo e coloração de GRAM das linhagens isoladas a partir de amostras de solo contaminadas com petróleo provenientes de um sistema de *Landfarming* da Refinaria Gabriel Passos, Betim, MG.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Vias de degradação do DBT com a clivagem da ligação carbono – carbono.

Metabolismo Tipo 1 - “Via de Kodama” (Ohshiro *et al.*, 1999); e Metabolismo Tipo 2 – Via de Van Afferden (Ohshiro *et al.*, 1999)

Figura 3.2 - Via de dessulfurização “4S” – Nesta via, o enxofre é removido na forma de sulfito, permanecendo intacta a estrutura carbonada

Figura 5.1 - Teste de absorvância de luz UV para verificação da biodisponibilidade de enxofre. Fotografia da placa de microtitulação sob luz UV. Poços: **5 A**, Isolado I–3; **7 A**, Isolado I–5; **7 B**, Isolado I–12; **11B**, Isolado I -14; **3C**, Isolado I–16; **3D**, Isolado II–18; **5D**, Isolado II–20; **8F**, Isolado IV–37; **3G**, Isolado V–43. As linhagens destacadas em vermelho mostraram-se positivas para esse teste, apresentando fluorescência

Figura 5.2 - Curva de crescimento de isolados bacterianos na presença de DBT como fonte de enxofre. As medidas de densidade ótica (D.O.), a 600nm (luz visível), começaram a ser realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo máximo de 44 horas

Figura 5.3 - Curva de crescimento de isolados bacterianos na presença de DBT como fonte de enxofre. As medidas de densidade ótica (D.O.), a 600nm (luz visível), começaram a ser realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo máximo de 44 horas

Figura 5.4 - Curva de crescimento de isolados bacterianos na presença de DBT como fonte de enxofre. As medidas de densidade ótica (D.O.), a 600nm (luz visível), começaram a ser realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo máximo de 44 horas

Figura 5.5 - Curva de crescimento de isolado bacteriano na presença de DBT como fonte de enxofre. As medidas de densidade ótica (D.O.), a 600nm (luz visível), começaram a ser realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo máximo de 44 horas

Figura 5.6 - Curva de crescimento de isolado bacteriano na presença de DBT como fonte de enxofre. As medidas de densidade ótica (D.O.), a 600nm (luz visível), começaram a ser realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo máximo de 44 horas

Figura 5.7 - Curva de crescimento de isolados bacterianos na presença de DBT como fonte de enxofre. As medidas de densidade ótica (D.O.), a 600nm (luz visível), começaram a ser realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo máximo de 44 horas

Figura 5.8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (6%) evidenciando os padrões de diversidade genômica obtidos através de experimentos de PCR com iniciadores repetitivos BOX. Canaletas: **1**, Marcador Molecular (1 kb ladder); **2**, Controle Negativo; **3**, Isolado I-01; **4**, Isolado I-02; **5**, Isolado I-03; **6**, Isolado I-05; **7**, Isolado I-07; **8**, Isolado I-08; **9**, Isolado I-09; **10**, Isolado I-10; **11**, Isolado I-11; **12**, Isolado I-12; **13**, Isolado I-13; **14**, Isolado I-14 e **15**, Isolado I-15; **16**, Isolado I-16; **17**, Isolado II-17; **18**, Isolado II-18; **19**, Isolado II-20; **20**, Marcador Molecular (1 kb ladder); **21**, Isolado III-24; **22**, Isolado III-27; **23**, Isolado III-28; **24**, Isolado III-30; **25**, Isolado III-31; **26**, Isolado III-32; **27**, Isolado III-33; **28**, Isolado III-35; **29**, Isolado III-25; **30**, Isolado III-26; **31**, Isolado IV-37; **32**, Isolado V-43; **33**, Isolado VI-46; **34**, Isolado VI-49

Figura 5.9 - Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean”), baseado na matriz de similaridade de DICE

Figura 5.10 - Árvore filogenética construída utilizando o programa Mega 4.1 (Beta 3).

Figura 5.11 - Comparação entre a formação do DBT/2-HBP em diferentes isolados.

LISTA DE NOTAÇÕES

BDS – Biodessulfurização

BSM – “Basic Salt Medium”

DBT – Dibenzotiofeno

D.O. – Densidade Óptica

2 - HBP – 2 - hidroxibifenil

DGGE – “Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis”

dsz – Genes envolvidos na Biodessulfurização

EPA– Agência de Proteção Ambiental

HDS – Hidrodessulfurização

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

PAHs – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PPM – Partes por milhão

REGAP – Refinaria Gabriel Passos

RNAr 16S– RNA ribossomal 16S

TSA – “Trypticase Soy Agar”

UFC – Unidades formadoras de colônia

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

UPGMA – “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean”

UV – Ultra-Violeta

RESUMO

A emissão de enxofre decorrente da queima de combustíveis fósseis representa um problema global porque corresponde à maior causa da chuva ácida e poluição do ar. Uma das grandes preocupações das refinarias é diminuir o conteúdo de enxofre do petróleo. A tecnologia usualmente utilizada para esse fim é a hidrodessulfurização. Uma alternativa que vem sendo cada vez mais valorizada é a biodessulfurização, por utilizar microrganismos capazes de remover seletivamente o enxofre presente nas cadeias de hidrocarbonetos. Além disso, esse processo pode ser realizado em condições mais amenas de temperatura e pressão, o que o torna menos poluente e mais barato para a refinaria. O presente trabalho evidencia um isolamento de estirpes bacterianas com capacidade de dessulfurização a partir de amostras de solo contaminadas com petróleo provenientes de um sistema de *Landfarming*, na Refinaria Gabriel Passos (REGAP), em Minas Gerais. As linhagens foram testadas quanto à sua capacidade de utilizar o composto dibenzotiofeno utilizando técnicas de espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência. Também foram utilizadas técnicas moleculares como extração de DNA e BOX-PCR, no intuito de se obter um retrato da estrutura da comunidade microbiana presente nas amostras. Foram obtidos 31 isolados com capacidade de utilizar o DBT como fonte de energia. A maioria dos isolados apresentaram forma de cocos e cocobacilos e 55% mostraram-se Gram-positivos. Com relação às curvas de crescimento, os isolados apresentaram padrões de crescimentos diferentes entre isolados com mesmos perfis genômicos. A análise de similaridade usando UPGMA mostrou a formação de 5 grupos com padrões genômicos semelhantes. Além disso, foram obtidos no mínimo duas espécies ou gêneros novos e possíveis estirpes com capacidade de dessulfurização.

Palavras-chave: *Biodessulfurização, DBT, petróleo.*

ABSTRACT

The emission of sulfur from the burning of fossil fuels represents a global problem because it is the major cause of acid rain and air pollution. A major concern of the refineries is reducing the sulfur content of oil. The technology commonly used for this purpose is the hydrodesulfurization. An alternative that is being increasingly considered is biodesulfurization by using microorganisms to remove selectively the sulfur present in the hydrocarbon chains. Furthermore, this process can be performed in more mild conditions of temperature and pressure, which makes it less polluting and cheaper for the refinery. This work shows an isolation of bacterial strains capable of desulfurization from samples of soil contaminated with oil from a *landfarming* system in the Gabriel Passos Refinery (REGAP) in Minas Gerais. The strains were tested for their ability to use the compound dibenzothiophene using techniques as spectrophotometry and high performance liquid chromatography. Were also used molecular techniques such as extraction of DNA and BOX-PCR, in order to obtain a picture of the structure of microbial community present in the samples. We obtained 31 isolates with the ability to utilize DBT as a source of energy. Most of the isolates were considered as cocci and coccibacillus and 55% showed Gram-positive. With respect to growth curves, the isolates showed different patterns of growth among isolates with the same genomic profiles. The similarity analysis using UPGMA showed the formation of five groups with similar DNA patterns. Furthermore, we obtained at least two species or genera and possible new strains capable of desulfurization.

Keywords: Biodesulfurization, Dibenzothiophene, petroleum.

1. Introdução

A Refinaria Gabriel Passos (REGAP) foi construída nos anos 60, em Betim, Minas Gerais e pode processar 152 mil barris de óleo por dia. Atualmente, entre óleo e derivados, são gerados pela PETROBRAS, no processo de refino do petróleo bruto, os seguintes produtos: diesel comum, diesel metropolitano, gasolina automotiva, gasolina Premium, querosene de iluminação, querosenes de aviação I e V, nafta petroquímica, aguarrás, óleos combustíveis 1a, 2a, 2b, 4a, 7a, 7b, betume, GLP, gás combustível, gás natural, coque e asfaltos. Paralelamente à produção de combustíveis e derivados, são gerados, no processo de refino do petróleo, gases como dióxido de carbono e dióxido de enxofre, além de dejetos sólidos e líquidos. Em suas onze refinarias, a PETROBRAS tem desenvolvido sistema de tratamento para todos os efluentes. Enquanto chaminés, filtros e outros dispositivos evitam a emissão de gases, vapores e poeira para a atmosfera, os despejos líquidos são tratados por meio de processos físico-químicos e biológicos. Além de minimizar a geração de resíduos sólidos, todas as refinarias também realizam coleta seletiva. Os resíduos não-reciclados, como as borras oleosas, eram tratados na própria refinaria, em unidades de biodegradação natural, constituintes de um sistema denominado *Landfarming*, que consiste na degradação natural dos resíduos oleosos por microrganismos indígenas presentes no solo.

Essas borras oleosas formadas e acumuladas por decantação no fundo dos tanques de armazenamento de petróleo e derivados eram acrescentadas diariamente às células do *Landfarming*. Entre a microbiota selecionada naturalmente, através da adição de substratos metabólicos específicos, podem ser encontradas bactérias com capacidade de dessulfurização, processo que consiste na retirada específica do enxofre, um contaminante natural, que se encontra complexado às cadeias de hidrocarbonetos do petróleo.

Como proposta de melhoramento dos produtos oferecidos à comunidade, as refinarias da PETROBRAS vêm sendo renovadas para produzir um combustível com baixo teor de enxofre, mais puro e menos poluente. O enxofre, em diferentes conformações moleculares, é o terceiro elemento químico encontrado nos combustíveis fósseis, mas a sua presença, apesar de natural, é indesejável, pois este elemento é um contaminante das cadeias de hidrocarbonetos do petróleo e carvão, e sua combustão, na ocasião do refino do combustível no seu processamento pela refinaria, leva à emissão de óxidos sulfurosos na atmosfera, resultando na precipitação desse enxofre na forma de chuva ácida. O grande problema consiste no fato de que a maioria das reservas de petróleo utilizadas mundialmente, no

momento, é constituída de óleos crus pesados, com elevado conteúdo calorífico, mas com altos conteúdos de enxofre e metais. Uma vez que esse alto teor de enxofre no petróleo é a maior causa da chuva ácida, um grande problema ambiental, legislações governamentais rigorosas em relação ao conteúdo de enxofre permitido nos combustíveis derivados do petróleo têm sido implementadas em todo o mundo, o que significa que devem ser desenvolvidas tecnologias mais eficientes na redução desse conteúdo de enxofre antes da combustão dos combustíveis no refino.

Essa presença natural do enxofre no petróleo justifica o estudo da presença e diversidade, tanto das espécies bacterianas, quanto dos genes específicos, muitas vezes localizados em plasmídeos, associados aos processos de biodessulfurização. A técnica de biodessulfurização apresenta vantagens para a refinaria, em relação ao processo químico (hidrodessulfurização), normalmente utilizado com o mesmo propósito, porque o processo biológico requer condições mais amenas de temperatura e pressão, além de ser praticamente não-polvente.

Também em relação aos custos de operação, a biodessulfurização é um processo que tem como consequência um acréscimo menor, em termos de valores econômicos, ao combustível, como produto final que chega ao mercado consumidor. Usando-se a hidrodessulfurização, que tem elevados custos de investimento e operacionais, é preciso que seja feito um aumento de 6 a 10 centavos de dólar por galão (3,8L) de gasolina, para que níveis aceitáveis de enxofre sejam obtidos pelas refinarias, o que encarece bastante o combustível para o consumidor (vide exemplo prático da gasolina “Podium”). Já usando-se a biodessulfurização, este acréscimo cai para um valor de 1 a 2 centavos de dólar por galão de gasolina, com um investimento 50% menor do que aquele requerido para a hidrodessulfurização. Ou seja, a tecnologia de BDS apresenta um custo geral, em investimento e operacional, mais baixo, o que barateia o produto final, que apresenta a mesma qualidade do produto obtido com a HDS, para o mercado consumidor. Resumindo, é extremamente vantajoso para a refinaria implementar uma tecnologia de BDS para o melhoramento de seu combustível, atendendo normas internacionais de teor de enxofre a baixo custo, além de oferecer um produto final com maior qualidade para seus consumidores.

A relevância biotecnológica dessa pesquisa é o isolamento de novas estirpes bacterianas com a habilidade de dessulfurização, estudo das vias metabólicas relacionadas a esse processo e obtenção de patentes pela PETROBRAS, a fim de que a indústria tenha em seu poder uma alternativa mais eficiente e menos poluente de produzir um combustível “mais limpo”. Essa

finalidade é mais que justificada atualmente devido à imensa necessidade de se atender às demandas internacionais de diminuição de enxofre liberado na atmosfera pelos órgãos competentes (EPA, entre outros).

Nos últimos anos, técnicas de biorremediação, utilizando microrganismos componentes da microbiota nativa, dotados de capacidades degradativas específicas para os mais diversos tipos de compostos orgânicos vêm sendo cada vez mais estudadas e aplicadas, visando obter uma maior eficiência, com especificidade de resultados, uma vez que estimula a seleção de espécies adaptadas às condições ambientais particulares da região de onde foram originalmente isoladas.

Portanto, a obtenção de microrganismos que utilizem a via degradativa, que implica na degradação do esqueleto de carbono do petróleo poderá ser interessante para processos de biorremediação de hidrocarbonetos poliaromáticos contendo enxofre liberados no ambiente, como áreas impactadas com eventos de derramamento de petróleo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Analisar a composição da comunidade bacteriana cultivável predominante em amostras de solo contaminadas com petróleo, provenientes de um sistema de *Landfarming*, localizado na Refinaria Gabriel Passos em Minas Gerais, por meio do uso de metodologias microbiológicas convencionais e moleculares.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolar estirpes com capacidade de utilização do dibenzotiofeno (DBT).
- Caracterizar morfológicamente os isolados.
- Obter curvas de crescimento das estirpes.
- Verificar a capacidade de retirada específica do enxofre pelas estirpes obtidas, através da formação de produto metabólico característico da via específica de dessulfurização (2 – hidroxibifenil).
- Estudar o perfil genético da microbiota bacteriana cultivável em meio seletivo presente nas amostras de solo contaminadas com petróleo.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Presença de Enxofre nos Combustíveis Fósseis

O crescimento da civilização industrial, em particular o uso dos combustíveis fósseis como fonte de energia, tem propiciado o aparecimento de uma poluição ambiental com alta taxa de compostos de origem não-biológica (Oshiro & Izumi, 1999). Todos os combustíveis fósseis contêm compostos orgânicos sulfurosos, e devido à sua difícil biodegradabilidade, são considerados compostos recalcitrantes (Alves *et al.*, 1999). A queima destes combustíveis libera grande quantidade de dióxido de enxofre no ambiente, um dos principais poluentes atmosféricos, e responsável pelas chuvas ácidas (Alves *et al.*, 1999).

Além disso, são gerados durante a combustão vários resíduos, especialmente particulados, incluindo poeira, fuligem, outros gases como óxido de nitrogênio, alguns compostos orgânicos voláteis e materiais suspensos que podem causar problemas respiratórios. Estes produtos podem afetar outros ambientes e animais, incluindo o homem (Gupta *et al.*, 2005). Quando presente em concentrações superiores a 100 ppm, o dióxido de enxofre é nocivo, provocando irritações nas mucosas (Schmid *et al.*, 1973).

Tendo em vista a utilização crescente destes combustíveis fósseis, devido às necessidades dos países industrializados, a emissão de enxofre para a atmosfera constitui, assim, um dos problemas ambientais da atualidade. Este problema poderá agravar-se ainda, se não forem tomadas às devidas precauções, tendo em conta a diminuição das reservas de combustíveis fósseis com baixo teor de enxofre (Konishi, 1997). Segundo Monticello (1998), em 1990 eram produzidos, a nível mundial, 70 milhões de barris de petróleo por dia, com uma percentagem de enxofre superior a 1,1. No entanto prevê-se que em 2010 a produção ultrapasse os 83 milhões aumentando também o enxofre contido no petróleo para 1,27%. A gravidade causada pelos efeitos da presença do SO₂ na atmosfera levou vários países e a União Européia a restringir suas emissões de SO₂ (Tabela 3.1). Recentemente, a Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos propôs uma redução significativa de 97% no conteúdo de enxofre presente no diesel, o que significa que este conteúdo deve baixar dos atuais teores de 500 ppm de enxofre para 15 ppm, nos próximos anos. Atitudes semelhantes vêm sendo adotadas por outros países, o que torna eminente a necessidade de se estudar rapidamente tecnologias eficientes para a retirada do enxofre do petróleo, causando o mínimo de impacto possível. Conforme informação da PETROBRAS, a empresa tem como meta a

diminuição do teor de enxofre do diesel metropolitano dos atuais 2.000 ppm para no máximo 500 ppm o mais brevemente possível.

Tabela 3.1 - Regulações internacionais para emissões de enxofre atuais e previstas (Monticello, 1998).

País	Produto	Concentração actual (ppm)	Concentração alvo (ppm)	Ano
União Europeia	Petróleo	3500	1000	1999
União Europeia	Petróleo bruto	33000	10000	1999
Coreia do Sul	Gasóleo	2000	500	2000
Tailândia	Gasóleo	5000	500	2000
Estados Unidos	Gasolina	400	50-100	2000
União Europeia	Gasóleo	500	200	2000
União Europeia	Gasóleo	350	< 100	2005

Para evitar a produção de óxidos de enxofre, é necessário que este seja removido do combustível fóssil antes, durante e depois da combustão (Oshiro & Izumi, 1999). O método mais utilizado pelas refinarias para remoção do enxofre é a hidrodessulfurização (HDS). Essa é a tecnologia a tecnologia através da qual foi gerada a gasolina especial da PETROBRAS 'Pódio', mais pura, eficiente e menos poluente do que a comum, mas bem mais cara para o consumidor final, exatamente devido ao custo extremamente oneroso do processo de HDS.

A hidrodessulfurização é uma técnica convencional usada especificamente para remover enxofre do diesel, opera a altas temperaturas (200 - 450°C) e altas pressões (150 – 250 psi) na presença de um catalista inorgânico (Orr, 1978; Speight, 1980; Izumi *et al.*, 1994), dependendo do nível de dessulfurização requerido (Speight, 1981). Além disso, é uma técnica energeticamente cara e altamente poluente (Oshiro & Izumi, 1999) por liberar grande quantidade de dióxido de carbono no ambiente decorrente das altas temperaturas e altas pressões utilizadas neste processo.

O enxofre associado a compostos orgânicos é muito difícil de ser removido pela HDS, já que se encontra ligado covalentemente a matrizes complexas (Denome *et al.*, 1994) e, quanto mais recalcitrantes as moléculas de enxofre ligadas, maior devem ser as temperatura e pressão utilizadas, o que resulta em maiores emissões de CO₂ decorrentes do processo e maior poluição atmosférica (Castorena *et al.*, 2002).

Entretanto, um dos maiores obstáculos na produção de combustíveis com baixo teor de enxofre por HDS é a dificuldade na remoção dos dibenzotiofenos (DBTs) e outros compostos

orgânicos sulfurosos (Chen e Li *et al.*, 2008). Os DBTs são poluentes orgânicos semelhantes aos compostos heterocíclicos, considerados poluentes ambientais ubíquos (Thangaraj *et al.*, 2007). Desta forma, o desenvolvimento de catalistas capazes de dessulfurizar estes tiofenos resistentes a HDS é extremamente necessário para dessulfurização das frações do petróleo.

Uma tecnologia alternativa atrativa para remoção do enxofre presente nos compostos orgânicos recalcitrantes é a biodessulfurização (Caro *et al.*, 2007), que consiste no uso de microrganismos dotados de aparato genético para um ataque específico aos átomos de enxofre ligados, sem que ocorra a degradação do esqueleto de carbono do combustível, característica desejável no melhoramento do combustível para que não ocorra queda na sua octanagem. Além disso, a biodessulfurização é um processo realizado em condições mais amenas de temperatura e pressão, o que o torna menos poluente e mais barato para a refinaria.

Atualmente, esse tipo de biotecnologia já é a base do processo comercial proposto e utilizado pela companhia norte-americana “Energy Biosystems Corporation” para a retirada do enxofre do petróleo. Essa companhia tem desenvolvido contínuos processos de dessulfurização do diesel usando estirpes geneticamente recombinantes de *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. Em parceria com cinco outras organizações, esse processo tem sido bem-sucedido para um planta piloto (5 barris/dia) que vem operando desde 1995 (Gupta *et al.*, 2005).

3.2. Biodessulfurização

No início da década de 50 e 60, tiveram início os estudos de biodessulfurização, porém sem resultados significativos. Foram selecionadas bactérias com a capacidade de utilizar o enxofre presente em hidrocarbonetos poliaromáticos pertencentes a diversos gêneros. *Beijerinckia* sp. (Laborde & Gibson, 1977), *Acinetobacter* sp. (Malik, 1978), *Rhizobium* sp. (Malik, 1978), *Sulfolobus* sp. (Kargi, 1987), *Brevibacterium* sp. (Van Afferden *et al.*, 1990), *Desulfovibrio* sp. (Kim *et al.*, 1990), *Corynebacterium* sp. (Omori *et al.*, 1992), *Rhodococcus* sp. (Izumi *et al.*, 1994), *Xanthomonas* sp. (Constanti, 1994), *Agrobacterium* sp. (Constanti, 1994), *Arthrobacter* sp. (Lee *et al.*, 1995), *Pseudomonas* sp. (De Fátima *et al.*, 1996), *Gordona* sp. (Rhee *et al.*, 1998).

Mais de 70% do enxofre presente no petróleo é encontrado como DBT e substitutos do DBTs (metilados DBTs e benzo – DBTs) que são particularmente recalcitrantes à tecnologia convencional de HDS (Moheballi *et al.*, 2007).

Geralmente, o DBT tem sido usado como composto modelo para estudos de dessulfurização, por ser considerado representativo dos compostos organosulfurados recalcitrantes presente nos combustíveis fósseis. (Monticello, 1985; Omori *et al.*, 1992; Purdy *et al.*, 1993; Constanti *et al.*, 1994; Izumi *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994; Rhee *et al.*, 1998.) No entanto, há que salientar a existência de numerosos estudos efetuados com outros compostos orgânicos contendo enxofre (Kayser *et al.*, 1993; Eaton & Nitterauer, 1994; Kropp *et al.*, 1994; Constanti *et al.*, 1996), misturas de DBT com alcanos (Setti *et al.*, 1993, Oshiro *et al.*, 1995;) e até mesmo com amostras de carvão (Dahlberg *et al.*, 1993) ou petróleo (Van Afferden *et al.*, 1993).

Portanto, o processo de biodessulfurização é atrativo porque não requer hidrogênio e produz significativamente menos dióxido de carbono que a tecnologia convencional, a hidrodessulfurização (Linguist & Pacheco; 1999).

3.3. Vias metabólicas para utilização do DBT

Tem sido demonstrado que o DBT é metabolizado por microrganismos usando mecanismos aeróbicos ou anaeróbicos (Oshiro & Izumi, 1999). *Desulfovibrio desulfuricans* M6, uma bactéria redutora de sulfato, degrada o DBT anaerobicamente, e o bifenil foi isolado como o maior produto de degradação (Kim *et al.*, 1990). Isto foi mostrado em outra bactéria redutora de sulfato, que tem a habilidade de converter o DBT para bifenil anaerobicamente (Armstrong *et al.*, 1995; Lizama *et al.*, 1995).

O processo anaeróbico para remoção de enxofre pode ser atraente porque não leva à liberação de sulfato como produto. Entretanto, microrganismos anaeróbicos efetivos o bastante para a prática da dessulfurização do petróleo não foram descritos até o momento (Oshiro & Izumi, 1999).

Existem muitos relatos acerca do metabolismo aeróbio do DBT, embora muitos destes sejam focados somente na taxa de degradação ou de dessulfurização do DBT, sem mencionar os metabólitos produzidos no processo (Kilbane *et al.*, 1992; Klubek *et al.*, 1998).

O metabolismo do DBT por microrganismos aeróbios pode ser geralmente classificado em três tipos: No metabolismo tipo 1, o esqueleto carbônico do DBT é parcialmente oxidado e clivado, com a ligação carbono – enxofre permanecendo intacta: este processo é referido

como “degradação do DBT”, para claramente distinguir da “dessulfurização do DBT” (Oshiro & Izumi, 1999). Em 1968, foi descrita uma estirpe do gênero *Pseudomonas* com a capacidade de degradar o DBT (Yamada *et al.*, 1968; Nakatami, 1968). Posteriormente foi mostrado que o DBT pode ser metabolizado por hidroxilação do componente benzóico do composto para os derivados dihidroxi - dihidro, clivando o anel entre os substituintes diol, e produzindo, na seqüência, 4-[2-(3-hidroxi)-thionaphthenil]-2 oxo-3-ácido butenóico e 3-hidroxi-2-formilbenzothiophene (HFBT) como mostrado na Figura 3.1 (Kodama *et al.*, 1970; Kodama *et al.* 1973).

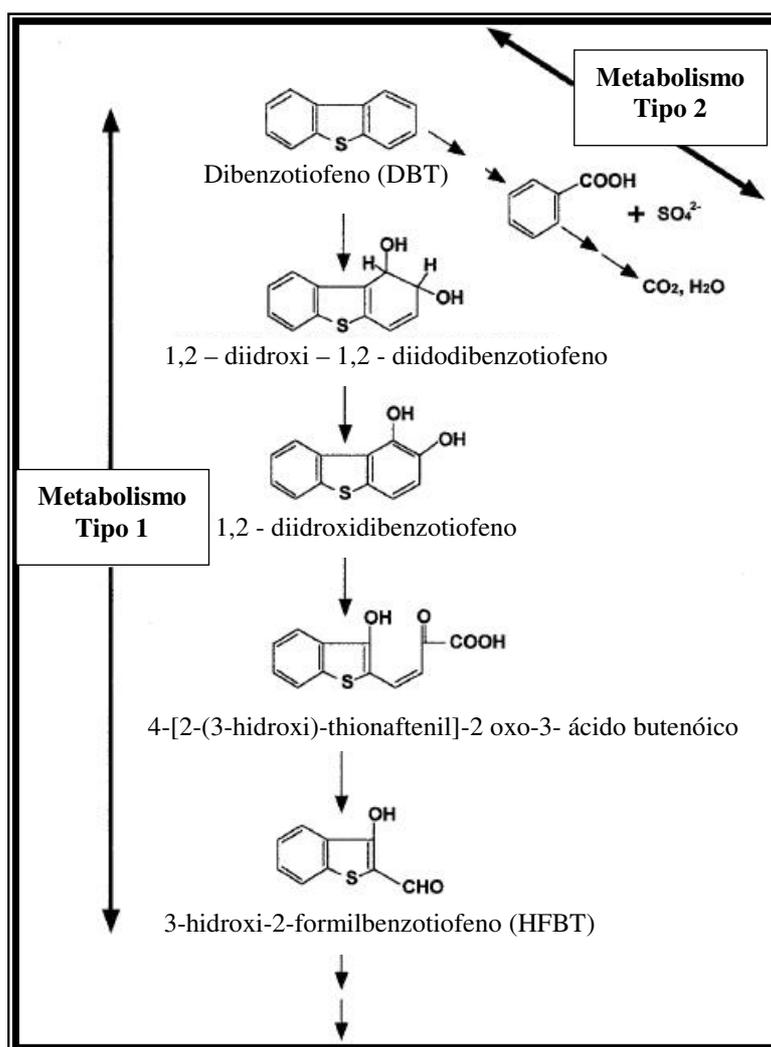


Figura 3.1: Vias de degradação do DBT com a clivagem da ligação carbono – carbono. **Metabolismo Tipo 1 - “Via de Kodama”** (Ohshiro *et al.*, 1999); e **Metabolismo Tipo 2 – Via de Van Afferden** (Ohshiro *et al.*, 1999).

Essa via de degradação é conhecida como “Via de Kodama”, pois no início da década de 70, Kodama e colaboradores, estudando duas espécies de *Pseudomonas* spp., constataram que o DBT era parcialmente degradado através de sucessivas oxidações por um mecanismo semelhante ao da degradação do naftaleno (Denome *et al.*, 1993). Nesta via, o produto final da degradação parcial do DBT ainda contém o átomo de enxofre, apresentando níveis de toxicidade biológica semelhantes ao do substrato inicial (Gallagher *et al.*, 1993).

A ocorrência desta via degradativa tem sido estudada em várias outras estirpes bacterianas sendo, *P. aeruginosa* ERC – 8, (Hou *et al.*, 1976), *Beijerinckia* sp., (Laborde *et al.*, 1977) *Pseudomonas* sp. (Monticello *et al.*, 1985) e *Rhizobium melioli* (Frassinetti *et al.*, 1998).

Em 1990, Van Afferden propôs uma via metabólica diferente, em *Brevibacterium* sp., que apresenta a capacidade de converter o DBT em quantidades estequiométricas a benzoato e sulfito. O benzoato é totalmente mineralizado a CO₂ e água (Alves *et al.*, 1999) e o sulfito é, por sua vez, oxidado a sulfato, por oxidação abiótica (Van Afferden *et al.*, 1990). A literatura também relata que *Arthrobacter* DBTS₂ é capaz de oxidar o DBT-sulfóxido, mas não o DBT, com formação de sulfato e benzoato (Sato *et al.*, 1995). Somente estes dois microrganismos são conhecidos por terem essa via metabólica peculiar, como mostrado na Figura 1 (Metabolismo tipo 2 ou Via de Van Afferden). Eles dessulfurizam o DBT, mas também quebram o esqueleto carbônico do hidrocarboneto (Oshiro & Izumi, 1999).

Deste modo, o DBT é usado pela bactéria duplamente como fonte de carbono e de enxofre. Esta via de degradação não é de grande interesse em termos de processos de biodessulfurização de combustíveis fósseis, já que a mineralização completa da estrutura carbonada implicará necessariamente em uma diminuição na energia química potencial dos combustíveis. Porém, as bactérias que utilizam esta via metabólica podem ser úteis na formulação de inóculos microbianos mistos para processos de biorremediação de hidrocarbonetos poliaromáticos contendo enxofre liberados no ambiente (Alves *et al.*, 1999).

No metabolismo tipo 3, o DBT serve como única fonte de enxofre e não como fonte de carbono. Essa via é normalmente denominada “Via 4S” (via sulfóxido-sulfona-sulfonato-sulfato). Trata-se de uma via específica para a remoção do átomo de enxofre presente no DBT, sendo que o grupo tiofênico sofre um ataque oxidativo progressivo.

Segundo essa via, o DBT é metabolizado para 2 - HBP (2-hidroxibifenil) via DBT-sulfóxido (DBTO), DBT-sulfona (DBTO₂), e 2'-hidroxibifenil 2-sulfinato (HBPS). O dibenzotiofeno é dessulfurizado por uma clivagem seletiva da ligação carbono - enxofre, resultando em uma acumulação de 2 - HBP como mostrado na Figura 3.2. A clivagem específica da ligação carbono - enxofre é fundamental para o processo de dessulfurização microbiana, sendo que o enxofre é removido, mas o carbono e o valor calorífico são mantidos intactos (Ohshiro & Izumi, 1999).

Atualmente sabe-se, a partir de estudos em *Rhodococcus* sp. IGTS8, que esta via envolve um sistema multienzimático com três atividades diferentes (Gray *et al.*, 1996). A primeira enzima é uma monooxigenase do DBT, a DszC, uma proteína de 45 - kDa que catalisa a seqüência de conversão do DBT para DBT- sulfóxido (DBTO) e DBT- sulfona (DBTO₂), utilizando FMNH₂ como co - substrato; a segunda enzima é igualmente uma monooxigenase, a DszA, uma proteína de 50 - kDa, que catalisa a transformação de DBT-sulfona (DBTO₂) a DBT-sulfinato (HBPS), também utilizando FMNH₂ como co - substrato. Finalmente a DszB, uma proteína de 40 - kDa, é uma desulfinase que catalisa a formação do produto final, 2 - hidroxibifenil (2 - HBP) (Ohshiro & Izumi, 1999), através de um ataque nucleofílico da base ativada da molécula da água sobre o enxofre do sulfinato para formar o 2- HBP e sulfato (Gupta *et al.*, 2005). É importante salientar que as enzimas Dsz C e Dsz A são dependentes de flavina. Ambas requerem a flavina redutase (DszD) para sua atividade .

As enzimas envolvidas nessa via (DszA, DszB e DszC) são codificadas por três genes, *dszA*, *dszB* e *dszC*, respectivamente, suficientes para a conversão do DBT a 2 - HBP (Ohshiro & Izumi, 1999) . Estes genes foram clonados e seqüenciados a partir de uma variedade de microrganismos. Duarte e colaboradores (2001) realizaram uma análise genética (usando PCR e eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes químicos) da comunidade de bactérias encontradas em solos contaminados com óleo. Através desses estudos, observaram que amostras de solo com altos teores de contaminação por óleo contêm organismos relacionados filogeneticamente a *Actinomyces* sp., *Arthrobacter* sp., e a um microrganismo não identificado. Os genes *dsz* (A, B e C) estão presentes em todas as amostras de solo e a seqüência do *dszA* obtida através da PCR revelou uma grande similaridade (> 95%) para *dszA* da estirpe IGTS8. Entretanto, os iniciadores da PCR usados neste experimento foram desenhados a partir da seqüência dos genes de *Rhodococcus* sp. IGTS8.

A maioria da linhagens mesofílicas que possui a via “4S”, pertencem ao gênero *Rhodococcus* e seu genótipo *dsz* parece estar bem preservado entre eles (Denis – Larose, 1997; Duarte *et al.*, 2001).

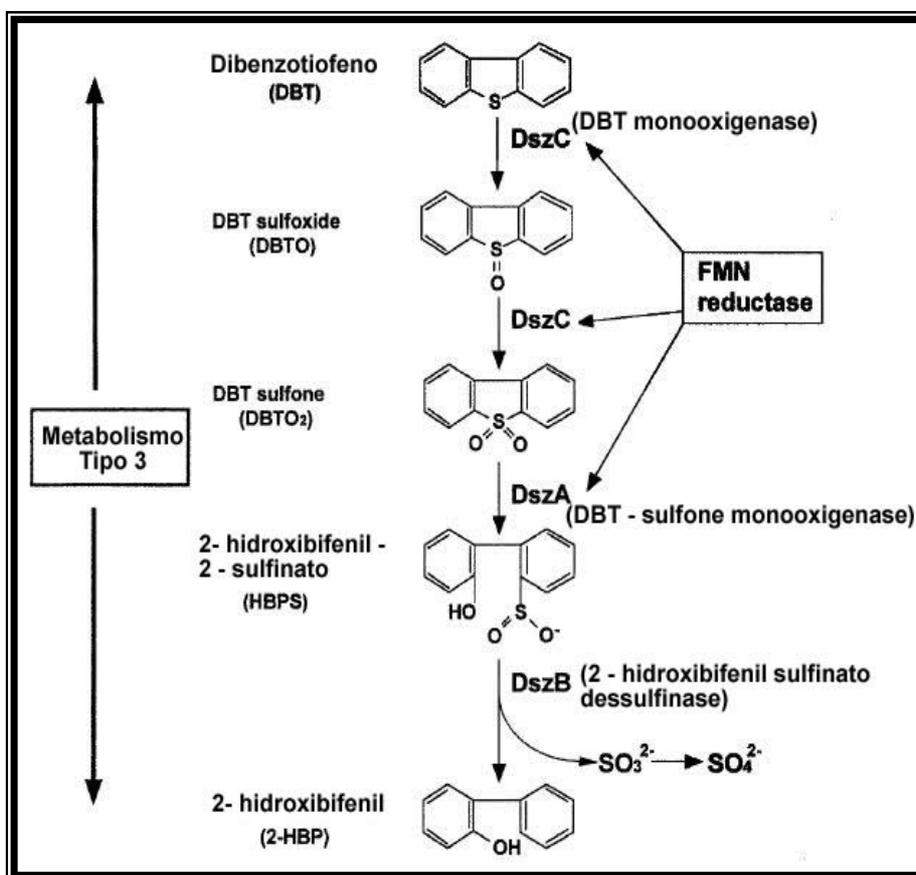


Figura 3.2: Via de dessulfurização “4S” – Nesta via, o enxofre é removido na forma de sulfito, permanecendo intacta a estrutura carbonada.

Depois que a *R. erythropolis* IGTS8 foi encontrada, muitas outras espécies bacterianas, incluindo *Corynebacterium* sp. SY1, (Omori *et al.*, 1992), *Rhodococcus* SY1 (Omori *et al.*, 1992); *Rhodococcus* UM3 (Purdy *et al.*, 1993), *R. erythropolis* D-1 (Izumi *et al.*, 1994; Oshiro *et al.*, 1994), *Nocardia globelula*, (Wang *et al.*, 1994), *Xanthomonas* sp., (Constanti *et al.*, 1994), *Agrobacter* MC501 (Constanti *et al.*, 1996), *Rhodococcus* B1 (Denis – Larose *et al.*, 1997); *Mycobacterium* sp. G3 (Nekozyuka *et al.*, 1997), *Paenibacillus* strain (Konishi *et al.*, 1997); *Gordona* CYKS1 (Rhee *et al.*, 1998); *Rhodococcus* ECRD1 (Grossman *et al.*, 1999), *Mycobacterium* sp. (Li *et al.*, 2003) foram descritas na literatura como capazes de dessulfurizar o DBT através de uma via metabólica similar.

Os microrganismos que utilizam esta via para metabolizar o DBT conseguem, desta forma, que o átomo potencialmente tóxico seja retirado do composto tiofênico, sob a forma de um composto solúvel e inócuo (sulfato) apenas com uma ligeira perda do seu valor energético (Wang & Krawiec, 1994).

Deste modo, as estirpes capazes de utilizar a via “4S” poderão servir como uma “ferramenta” biológica fundamental no tratamento em larga escala dos combustíveis fósseis, caso se consigam obter biocatalisadores de elevada estabilidade em ambiente industrial (Wang & Krawiec, 1994).

3.4. *Landfarming*

O *Landfarming* é a tecnologia que envolve a remoção biológica dos produtos do petróleo em solos contaminados (Maila & Cloete, 2004).

Em 1970, quando a preocupação ambiental associada com a disposição incontrolada de resíduos fez-se aparente, e a regulação ambiental era estabilizada e aplicada no Norte da América e Europa (almejado para minimizar o risco de contaminação da terra, água e ar.), o *Landfarming* obteve popularidade (Maila & Cloete, 2004). O *Landfarming* é uma tecnologia de biorremediação em que o solo contaminado com petróleo é misturado com nutrientes e o material é periodicamente revolvido para aeração. Os contaminantes são degradados, transformados e imobilizados por meio de reações bióticas e abióticas (Rubinos *et al.*, 2007).

Esta tecnologia tem sido amplamente usada, é simples e apresenta baixo custo para implementação, comparado a outros tratamentos (“American Petroleum Institute” 1983; Harmsen, 1991).

Embora tenha tido muitas restrições para aplicação desta tecnologia, ela ainda tem sido usada para tratar produtos do petróleo com acréscimo de medidas para minimização ou tratamento de voláteis e lixiviados (Genow *et al.*, 1994; Harmsen *et al.*,1994; Balba *et al.*, 1998; Picado *et al.*, 2001; Maila, 2002).

Os produtos do petróleo no solo durante o *Landfarming* são largamente removidos por volatilização, biodegradação e adsorção (Morgan & Watkinson, 1989; DeVlieghe & Verstraete, 1996; Margesin *et al.*, 1999; Hejazi *et al.*, 2003). Os produtos mais voláteis, semelhantes à gasolina, tendem a ser removidos por volatilização durante o processo de aeração do *Landfarming*. Outros produtos do petróleo, semelhantes aos combustíveis diesel e querosene, contêm baixa porcentagem de constituintes voláteis quando comparados à gasolina. A biodegradação destes é mais significativa do que a volatilização. Os produtos do petróleo mais pesados ou não voláteis, como óleos lubrificantes, não são volatilizados durante a aeração do *Landfarming*, em que o mecanismo dominante de quebra destes produtos do petróleo é a biodegradação. A adsorção também tem um importante papel na dissipação de produtos do petróleo no solo (Maila & Cloete, 2004). Entretanto, a tecnologia não tem sido amplamente usada para tratar poluentes orgânicos semelhantes a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos de alto peso molecular.

Picado *et al.*, (2001) observaram a redução da concentração de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos totais (PAHs) depois dos três primeiros meses de tratamento. Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos de alto peso molecular não são removidos, provavelmente devido a falta de estirpes bacterianas capazes de degradar estes compostos, condições desfavoráveis ao crescimento das bactérias ou devido ao fato de elas requererem um longo tempo de tratamento para dissipar o composto, uma vez que estes são difíceis de serem degradados.

Bossert *et al.*, (1986) estudando o *Landfarming*, verificou a presença de 16 PAHs no lodo contaminado com óleo e observou a redução de aproximadamente 80 – 90% depois de três anos de tratamento. A baixa taxa de remoção de compostos do petróleo de alto peso molecular e os longos períodos de tratamento são verificados em muitos estudos devido à falta de processos de otimização. Em adição, os fatores limitantes subsequentes (nutrientes, pH, biodegradadores, metabólitos tóxicos) não são adequadamente listados durante o *Landfarming*, resultando em longos períodos de tratamento (Maila & Cloete, 2004).

Embora a simplicidade e o fator custo-benefício serem as maiores vantagens para o uso do *Landfarming*, outros fatores geralmente considerados como desvantagens para implementação desta tecnologia podem ser listados. Estes incluem um requerimento de grande área para tratamento, disponibilidade de bactérias que degradam os poluentes e a inabilidade da tecnologia para reduzir as concentrações dos poluentes em mais que 95% (EPA 1994).

Além disso, aspectos físicos, químicos e biológicos dessa tecnologia podem dificultar o processo de remediação. Os aspectos físicos incluem área para tratamento, a habilidade e limitação dos equipamentos de aeração, mobilidade dos poluentes no solo e requerimento de água. Já os aspectos químicos incluem toxicidade, transformação e partição dos produtos do petróleo em diferentes compartimentos ambientais (ar, água e lençol freático); enquanto os aspectos biológicos incluem bioestimulação ou bioaugmentação, para otimizar a biotransformação dos produtos do petróleo no solo (Maila & Cloete., 2004).

A bioaugmentação consiste na introdução de bactérias capazes de degradar o poluente no local contaminado (Maila & Cloete, 2004). Para isso, microrganismos indígenas podem ser isolados, cultivados e devolvidos ao solo para produzir um aumento na população (bioaugmentação); pode-se usar microrganismos de outras fontes ou ainda linhagens comerciais. Por outro lado, a técnica de bioestimulação refere-se a modificações do local como ajustes de pH, adição de nutrientes considerados limitantes para obter uma taxa ideal de C:N:P a fim de melhorar a mistura do solo, propiciando, assim, condições mais favoráveis para um melhor crescimento bacteriano (Maila & Cloete, 2004).

Desta forma, é preciso encontrar soluções para os contrastes físicos, químicos e biológicos associados ao *Landfarming* e conduzir estudos que possam produzir informações sobre o tipo da atividade metabólica de microrganismos indígenas do local, a presença de possíveis inibidores, biodegradabilidade de contaminantes abaixo das condições ótimas, influência de nutrientes e bioaproveitabilidade dos poluentes no solo. Estas informações também podem ajudar nas práticas de reabilitação para decidir se é relevante usar bioestimulação ou bioaugmentação para limpeza do solo (Maila *et al.*, 2004).

Outro fator que pode ajudar na eficiência da remoção dos compostos de petróleo do solo é a umidade. O nível de umidade na maior parte dos *Landfarms* é mantido entre 30 e 80% da capacidade real (Block *et al.*, 1992; Pope & Mathews, 1993; Malina *et al.*, 2002). O nível de umidade garante a sobrevivência de bactérias capazes de degradar o poluente e permite o controle da poeira. Entretanto, como há necessidade de uma grande área para tratamento, a quantidade de água requerida para manter o nível de umidade ideal para atividade biológica pode ser enorme, especialmente em países secos, em que o custo do tratamento aumenta (Maila & Cloete, 2004).

Concluindo, é preciso entender o processo microbiano e as condições ambientais que conduzem a geração de informações sobre biodegradação para a comunidade microbiana local. O processo de remediação envolvendo bioaugmentação em que o objetivo é aumentar a capacidade de remoção dos poluentes por bactérias indígenas mostra, entretanto, ser válido para melhorar a remoção biológica de compostos persistentes do petróleo usando o *Landfarming*. Isso também é importante para entender os fatores limitantes subsequentes durante a biorremediação, assim como compostos do petróleo de baixo e alto peso molecular.

4. Material e métodos

4.1. Coleta das amostras

As amostras de solo contaminado com petróleo foram coletadas em um sistema de *Landfarming* da Refinaria Gabriel Passos, em Betim, seis meses antes que parte deste sistema fosse desativado para aproveitamento da área pela refinaria. Atualmente, o processo de tratamento de resíduo petroquímico utilizado pela REGAP é o método de co-processamento. Esta tecnologia consiste na destruição térmica de resíduos em fornos de cimento. Em relação a outras técnicas de queima é uma solução pró-sustentabilidade, uma vez que envolve o aproveitamento energético do resíduo ou seu uso como matéria-prima na indústria cimenteira sem afetar a qualidade do produto final.

Landfarming é uma técnica comumente utilizada para o tratamento de resíduos petroquímicos em solo, mas que frequentemente apresenta taxas de degradação relativamente baixas. Com o objetivo de aumentar as taxas de degradação dos resíduos podem ser adicionados ao solo nutrientes, surfactantes, microrganismos ou todos eles.

A amostragem foi feita randomicamente, sendo que amostras individuais retiradas dos 10 cm superiores do solo foram misturadas, originando seis amostras compostas. As amostras individuais coletadas apresentavam, segundo informações dos técnicos da PETROBRAS, diferentes teores de óleo, sendo que estes teores variavam de cerca de 1.000 a 5.000 mg de óleo / grama de solo. Assim sendo, as misturas foram feitas a partir de amostras individuais do mesmo quadrante, gerando as amostras compostas que foram numeradas de I a VI, sendo que as amostras apresentando maiores conteúdos de óleo foram as de números IV e VI.

4.2. Isolamento de Estirpes e Condições de Cultivo

O isolamento de culturas capazes de dessulfurizar o DBT teve início com o cultivo dos microrganismos do solo em meios de culturas, tanto ricos como mínimos, sendo o último suplementado com dibenzotiofeno a 0,1% com o objetivo de se isolar as espécies bacterianas capazes de utilizar o DBT como única fonte de enxofre.

A partir de cada amostra de solo foi retirada uma porção de 10g do solo e foi colocado em um frasco Erlenmeyer contendo 10g de gravel e 95 ml de salina (0,9%). Estes foram agitados durante 20 minutos em um agitador (Agitador Mod 109/ Nova Ética), a 200 rpm em temperatura ambiente, para homogeneização da suspensão de solo.

Cada suspensão obtida foi então submetida a uma diluição seriada até 10^{-7} e alíquotas de 0,1mL dessas diluições foram plaqueadas em meio rico TSA (“Trypticase Soy Agar”, Merck) com o objetivo de amostrar a diversidade total de microrganismos presentes. Neste meio, foram plaqueadas as diluições 10^{-5} a 10^{-7} . Estas foram incubadas à temperatura ambiente (27°C) e após 48 horas, foi feita a contagem das colônias e calculado o índice UFC (Unidade Formadora de Colônias).

O plaqueamento em meio seletivo seguiu o mesmo protocolo, porém as bactérias foram inoculadas em placas de Petri contendo meio mínimo BSM, ”Basic Salt Medium (meio básico de sais, (Denome *et al.*, 1994) (2 g de K_2HPO_4 , 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,1 g de NaCl, 0,01 g de $FeCl_3$, 0,5 g de NH_4NO_3 , 15 g de ágar bacteriológico, 1 litro de H_2O destilada, suplementado com DBT (Acros Organics) a 0,1mM com objetivo de se isolar apenas as linhagens bacterianas capazes de utilizar o organosulfurado como única fonte de enxofre. . O DBT, para ser adicionado ao meio, foi dissolvido em etanol, constituindo, assim, uma fonte de carbono.

Foram plaqueadas as diluições 10^0 a 10^{-5} e incubadas a 27°C. Após um período de 72 horas, foi feita a contagem das colônias obtidas neste meio e calculado o índice UFC (Unidades formadoras de colônias).

Após a incubação das placas e contagem, as colônias isoladas foram repicadas em tubos de ensaio com meio BSM líquido (2 g de K_2HPO_4 , 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,1 g de NaCl, 0,01 g de $FeCl_3$, 0,5 g de NH_4NO_3 , 1 litro de água destilada) suplementado com DBT a 0,1mM para enriquecimento, e aquelas que continuaram apresentando crescimento, foram repicadas para frascos de penicilina contendo BSM sólido acrescido de DBT a 0.1mM para preservação dos microrganismos. Estes frascos foram estocados a 4 °C, para utilização rápida, e serão repicados esporadicamente, para manutenção.

4.3. Teste presuntivo para verificação da capacidade de dessulfurização do DBT

Alíquotas de cada um dos isolados em caldo (BSM+DBT) foram inoculadas em “poços” vazios de uma placa de microtitulação e foram observadas sob luz UV para verificação da biodisponibilidade de enxofre.

4.4. Curva de Crescimento das Estirpes Seleccionadas

O crescimento de cada isolado foi quantificado através da medida da turbidez da suspensão bacteriana usando-se espectrofotômetro (Thermo Scientific / Bio Mate TM), sendo este calibrado em um comprimento de onda de 600nm na faixa visível.

Para gerar a curva de crescimento, os isolados foram repicados em frascos Erlenmeyer contendo 30mL de BSM líquido acrescido de DBT a 0,1mM e incubados a uma temperatura de 27°C durante 12 horas, uma vez que estas linhagens apresentaram um crescimento lento, fato este observado desde o primeiro repique. Após essa etapa, as suspensões bacterianas tiveram seu crescimento medido em espectrofotômetro.

Para a construção da curva, as medidas foram feitas em intervalos de 4 horas, com a retirada de uma alíquota de 1 mL de cada Erlenmeyer, começando pelas primeiras 12 horas após a inoculação (T_0). Sendo assim, as medidas dos tempos foram representadas da seguinte forma: T_1 (12 hs), T_2 (16hs), T_3 (20hs), T_4 (24hs), T_5 (36hs), T_6 (40hs), T_7 (44hs). As alíquotas retiradas foram submetidas à agitação em vórtex no momento de cada medida para uma melhor homogeneização.

4.5. Caracterização dos isolados

4.5.1. Caracterização fenotípica

Colônias individuais crescidas em placas de BSM suplementado com DBT de cada isolado em cultura pura foram identificadas através de técnicas clássicas de microbiologia. Para a identificação através da observação de parâmetros clássicos, foram analisadas características morfológicas, usando os esquemas taxonômicos do “Manual Bergey de Bacteriologia Sistemática” (Holt *et al.*, 1994).

Para a verificação das características fenotípicas, foram confeccionadas lâminas para a observação ao microscópio óptico de caracteres morfológicos básicos como forma, arranjo colonial e coloração específica de Gram para tipos diferenciados de parede celular. Posteriormente, as lâminas coradas foram fotografadas em câmara acoplada ao microscópio (Leica MPS- 30).

4.5.2. Caracterização genotípica

4.5.2.1. Extração de DNA de culturas Puras

Para a extração de DNA das culturas puras foi usado um protocolo adaptado no laboratório a partir de outros existentes na literatura. Primeiramente, as culturas puras foram repicadas em 30mL de BSM suplementado com DBT a 0.1mM e colocadas sob agitação a uma temperatura de 27°C durante 48 horas. Em seguida, 1,5mL desta cultura foi transferido para um tubo tipo eppendorf (1,5mL) e submetido à centrifugação a 12.000 x g durante 2 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado de células foi ressuspensão em 1,0mL de TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) e foram novamente submetidos à centrifugação por 2 minutos a 10.000 x g. O sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspensão em 500 µL tampão de lise (TE + NaCl 0,1M) +10µL de lisozima (10mg/mL). Logo após, as amostras foram incubadas a uma temperatura de 37°C por 60 minutos. Decorrido este tempo, foi adicionado 10µL de proteinase K (10mg/mL) e 30µL de SDS (10%) novamente incubado à 37°C durante 30 minutos. Após o período de incubação, foram adicionados 500µL de fenol e submetidos à centrifugação a 14.000 x g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e transferido para um tubo tipo eppendorf estéril (1,5mL) e a este adicionado 500 µL de fenol-

clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 25:24:1. Novamente as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g durante 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf estéril (1,5mL) no qual adicionou-se 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção 24:1 e misturados por inversão do tubo (3 vezes). Em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 14.000 x g. Após a centrifugação, a fase superior foi transferida para um novo eppendorf estéril (1,5mL) no qual foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol e deixados à temperatura ambiente por 5 minutos. Logo após, foram submetidos à centrifugação a 14.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida, o pellet foi lavado com etanol (70%) gelado e colocado à temperatura ambiente. E ao final do procedimento, adicionou-se 50µL de TE nos tubos contendo as amostras, e estes DNA's foram estocados a -20°C.

4.5.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram realizados experimentos de PCR com iniciadores de seqüências genômicas repetitivas do tipo BOX, com o objetivo de se obter um retrato da diversidade genômica das culturas puras obtidas nos isolamentos em nível de espécie. O iniciador utilizado foi o BOX-A1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') e a mistura de PCR foi preparada usando os reagentes descritos na Tabela 2. O volume da reação foi completado com 0,5 µL de DNA das amostras, resultando em um volume final de 25 µL.

Tabela 4.1 - Reagentes utilizados na reação de PCR

Componentes	Volume	Concentração estoque dos reagentes
Água Milli – Q	15,75µL	-
Tampão	2,5 µL	10x
MgCl ₂	3,75 µL	25mM
dNTPs	0,5 µL	10mM
DMSO	1,25 µL	10mM
Primer Box	0,5 µL	127nmol
Taq	0,25 µL	5u/µL

A mistura da reação foi incubada em um termociclador automático (Minicycler™) a 94°C, durante 7 minutos para desnaturação do DNA. Após a desnaturação, a reação de amplificação consistiu de 35 ciclos formados por uma etapa de desnaturação durante 1 minuto a 94°C, uma etapa de 1 minuto a 53°C, 8 minutos a 65°C e 16 minutos para extensão a 65°C (Versalovic *et al.*, 1994). Ao final dos ciclos, os produtos da reação foram armazenados a 4°C. Posteriormente, 5µL do produto da reação foram analisados em gel de poliacrilamida a 6% corado com prata. Os resultados foram observados e registrados por meio de fotografias.

Foram também realizados experimentos de PCR com iniciadores de seqüências que codificam para o RNAr 16S com o objetivo de se obter amplicons para seqüenciamento e identificação filogenética de alguns isolados. Os iniciadores utilizados com esse objetivo foram o 27F e o 1492R, referidos como PA e PH (Edwards *et al.*, 1989), que possuem aproximadamente 1500pb. O DNA obtido foi submetido à amplificação em PCR com volume de 50 µL, contendo 2 µL (0,5 a 10 ng) de DNA molde, 0,2 µM dos iniciadores 27F e o 1492R. Foram usados na mistura de PCR 25 U/ml *Taq* DNA polymerase, 0.2 mM de cada dNTP e 2 mM de MgCl₂. A mistura foi colocada em termociclador PTC-100 (MJ Reserch, Inc. USA), programado para gerar uma desnaturação inicial de cinco minutos a 94°C, e 25 ciclos de 94°C por um minuto; 57°C, um minuto; 72°C, dois minutos; seguidos de uma extensão final de

cinco minutos a 72°C. Os amplicons resultantes foram purificados usando o Kit (Ultra Clean PCR Cleanup/MOBIO) e quantificados em espectrofotômetro.

4.5.2.3. Análise de similaridade dos perfis genômicos dos isolados usando UPGMA

Para a determinação da similaridade dos perfis genômicos dos isolados obtidos após eletroforese dos produtos de PCR resultantes da amplificação de sequências genômicas repetitivas do tipo BOX, o gel de poliacrilamida foi analisado através da construção de um dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean”), baseado na matriz de similaridade de DICE, que considerou o coeficiente de similaridade baseado em bandas consideradas idênticas, inserido no software Bionumerics v 5.10 (Applied Maths, St. Martens Latem, Belgium).

4.5.2.4. Sequenciamento de DNA

Algumas estirpes isoladas foram selecionadas, tomando por base os resultados obtidos nos experimentos anteriores, para o procedimento de sequenciamento automático de DNA com o objetivo de identificação filogenética. O sequenciamento de DNA foi realizado pela empresa Genomic (São Paulo). As reações de sequenciamento foram realizadas usando-se o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* da Applied Biosystems. Os produtos de PCR foram purificados com o Kit (Ultra Clean PCR Cleanup/MOBIO) e quantificados em espectrofotômetro. Os produtos de sequenciamento foram submetidos à eletroforese em um sequenciador modelo 3130xl (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento alcançam normalmente 650 bases, com fidelidade de análise de 99%.

4.5.2.5. Análise filogenética

A partir dos resultados de sequenciamento, foi construída uma árvore filogenética usando-se o software Mega 4.1, através do método de máxima parsimônia com análises de 500 árvores para obter uma árvore consenso.

4.6. HPLC

Os isolados submetidos a análise em HPLC foram escolhidos a partir dos resultados obtidos em experimentos anteriores para comprovar a presença da capacidade de dessulfurizar o DBT pelos isolados.

Para análise, uma alíquota de cada cultura bacteriana pura (700µl) foi diluída com igual volume de acetonitrila (700µl) e essa suspensão homogeneizada através do uso de vórtex, para solubilizar alguma substância insolúvel em água. As células foram removidas por centrifugação a 16,000 x g por 3 minutos, a temperatura ambiente, e o sobrenadante foi retirado para análise no equipamento de HPLC em fase reversa com um sistema equipado com detector “diode array”. A coluna utilizada foi a RP C18 Synchronapak (4.6 por 100 mm) e foi feita eluição isocrática de nitrogênio-acetonitrila-em tampão fosfato (10mM, pH 6.0) (50:50 vol/vol) bombeado a 1.5 l/min. Os valores obtidos a partir da análise HPLC representam a área sob a curva. DBT foi monitorado a 233 nm.

5. Resultados

5.1. Enumeração de populações bacterianas isoladas das amostras de solo contaminadas com petróleo.

Os números obtidos após a contagem dos isolados tanto em meio rico (TSA) como em meio seletivo (BSM), estão mostrados na Tabela 5.1. A contagem dos microrganismos totais em meio TSA variou entre 10^6 a 10^7 UFC / g^{-1} de solo e não foram observadas diferenças significativas entre as contagens das amostras com teores diferenciados de contaminação.

Entretanto, as contagens, em meio BSM acrescido de DBT como fonte de enxofre, apresentaram resultados 10 a 100 vezes menores do que as contagens em meio rico.

Tabela 5.1 - Enumeração de populações bacterianas isoladas das amostras de solo contaminadas com petróleo.

Amostras de solo	UFC/g de solo (Meio TSA)	UFC/g de solo (Meio BSM + DBT)
1	5×10^6	4×10^5
2	$7,4 \times 10^7$	2×10^5
3	$4,2 \times 10^7$	5×10^5
4	1×10^6	2×10^5
5	3×10^6	2×10^5
6	$3,2 \times 10^7$	2×10^5

Dos 50 isolados em placa contendo meio BSM, apenas 31 isolados mantiveram seu crescimento em meio líquido na presença do DBT e estes foram utilizados para os estudos subsequentes.

5.2. Teste presuntivo para verificação da capacidade de dessulfurização do DBT

O teste presuntivo consiste em verificar se os isolados possuem a capacidade de utilizar o DBT como única fonte de enxofre, seguindo, assim, a via denominada “4S”. Trata-se de uma via específica em que ocorre a remoção do átomo de enxofre sem a quebra da cadeia carbônica da molécula. Isso pode ser verificado pela formação do composto 2 – hidroxibifenil, sendo este observado pela absorvância de luz UV a 254nm (teste de fluorescência) (Krawiec, 1990). O teste de fluorescência obteve resultado positivo para as linhagens I – 3; I – 5; I – 12; I – 14; I – 16; II – 18; II – 20; IV – 37 e V – 43 (Figura 5.1).

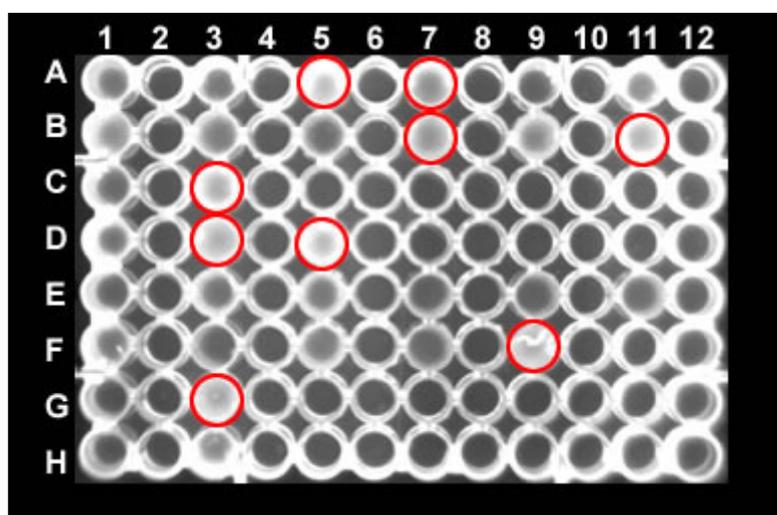


Figura 5.1 - Teste de absorvância de luz UV para verificação da biodisponibilidade de enxofre. Fotografia da placa de microtitulação sob luz UV. Poços: **1A**, Isolado I-1; **3A**, Isolado II-2; **5A**, Isolado I-3; **7A**, Isolado I-5; **9A**, Isolado I-7; **11A**, Isolado I-8; **1B**, Isolado I-9; **3B**, Isolado I-10; **5B**, Isolado I-11; **7B**, Isolado I-12; **9B**, Isolado I-13; **11B**, Isolado I-14; **1C**, Isolado I-15; **3C**, Isolado I-16; **1D**, Isolado II-17; **3D**, Isolado II-18; **5D**, Isolado II-20; **1E**, Isolado III-24; **3E**, Isolado III-25; **5E**, Isolado III-26; **7E**, Isolado III-27; **9E**, Isolado III-28; **11E**, Isolado III-30; **1F**, Isolado III-31; **3F**, Isolado III-32; **5F**, Isolado III-33; **7F**, Isolado III-35; **9F**, Isolado IV-37; **3G**, Isolado V-43; **1H**, Isolado VI-46; **3H**, Isolado VI-49. As linhagens destacadas em vermelho (Isolados I-3, I-5, I-12, I-14, I-16, II-18, II-20, IV-37 e V-43) mostraram-se positivas para esse teste, apresentando fluorescência.

5.3. Curvas de crescimento em meio seletivo

Trinta e uma colônias isoladas em placa de BSM suplementada com DBT foram novamente repicadas, mas, desta vez, em meio BSM líquido suplementado com DBT e incubados a temperatura ambiente (27°C) durante 12 horas. Após este enriquecimento, o crescimento foi avaliado através de medidas espectrofotométricas.

Para visualização dos resultados das curvas de crescimento dos isolados obtidos, foram construídos gráficos, sendo que em cada gráfico foram colocadas as medidas de D.O. obtidas pelos isolados provenientes de cada uma das amostras de solo. Assim sendo, estão apresentados 6 gráficos, correspondendo às 6 amostras de solo analisadas.

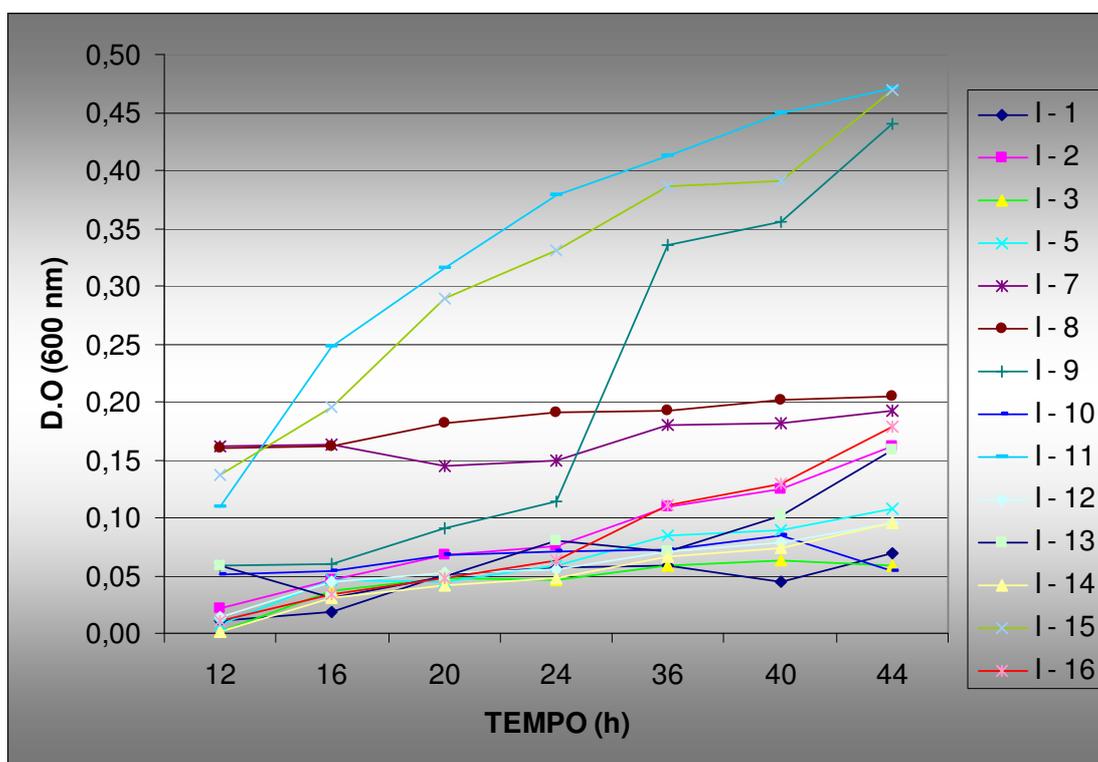


Figura 5.2 - Curva de crescimento de isolados bacterianos na presença de DBT como fonte de enxofre. As medidas de densidade óptica (D.O.), a 600nm (luz visível), começaram a ser realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo máximo de 44 horas.

A figura 5.2 mostra as curvas de crescimento obtidas após inoculação dos isolados provenientes da amostra I em meio BSM suplementado com DBT. A partir dessa amostra, foram isoladas 14 bactérias capazes de crescer usando o DBT como substrato. Esses isolados

apresentaram diferentes comportamentos de crescimento, como se pode observar no gráfico 5.1, tendo sido obtidos desde bactérias com crescimento tipicamente exponencial, atingindo D.O. de 0,5, até bactérias com crescimento constante mas pouco significativo do ponto de vista quantitativo.

Os isolados I-09, I-11 e I-15 apresentaram uma curva de crescimento semelhante, sendo o padrão desse crescimento exponencial, até a última medida de densidade óptica realizada no tempo de 44 horas, e atingiram D.O.s aproximadas de 0,47 (I-11 e I-15) e 0,44 (I-09). Na ocasião dessa última medida, observa-se que o isolado I-11 parece ter atingido a fase estacionária da sua curva de crescimento, em 44 horas, enquanto que os isolados I-15 e I-09 permaneciam ainda em crescimento. Os outros isolados (I-01, I-02, I-03, I-05, I-07, I-08, I-10, I-12, I-13, I-14 e I-16) mostraram pouco crescimento até esse tempo. Em relação a esses últimos isolados, eles podem ser divididos em dois grupos, sendo, um grupo formado pelos isolados que atingiram D.O.s entre 0,15 e 0,2 (I-2, I-7, I-8, I-13, I-16), e outro grupo apresentando D.O.s entre 0,05 e 0,10 (I-1, I-3, I-5, I-10, I-12 e I-14).

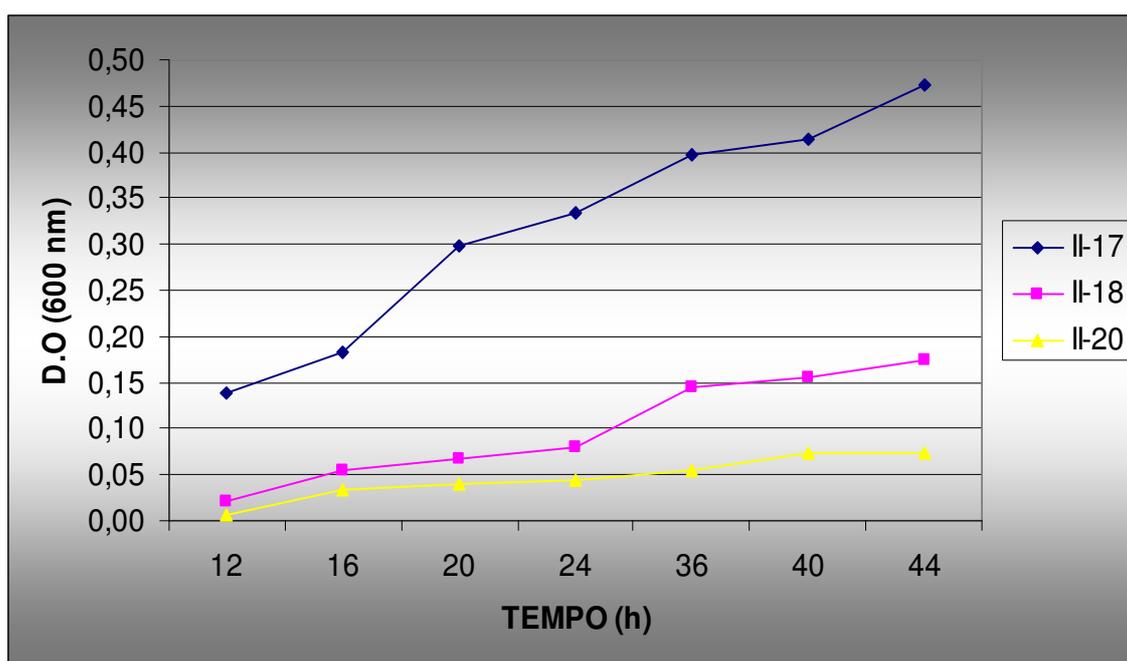


Figura 5.3 - Curva de crescimento de isolados bacterianos na presença de DBT como fonte de enxofre. As medidas de densidade óptica (D.O.), a 600nm (luz visível), começaram a ser realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo máximo de 44 horas.

A figura 5.3 mostra as curvas de crescimento obtidas após inoculação dos isolados provenientes da amostra II em meio BSM suplementado com DBT. A partir dessa amostra, foram isoladas 3 bactérias capazes de crescer usando o DBT como substrato e, de modo muito interessante, cada um dos isolados apresentou um padrão diferente de crescimento.

O isolado II-17 apresentou uma curva de crescimento exponencial crescente, atingindo D.O. de 0,48 até o tempo de 44 horas de crescimento, sem ter, até esse tempo final de medida, atingido o padrão estacionário da sua curva, ou seja, II-17 continuava crescendo após 44 horas de inoculação. O isolado II-18 atingiu uma D.O. de 0,17 em 44 horas e aparentemente também começava nesse período a etapa estacionária de sua curva de crescimento. Já o isolado II-20 atingiu uma D.O. máxima de 0,07, indicando que esse isolado apresentou um crescimento pouco significativo em meio mínimo na presença de DBT.

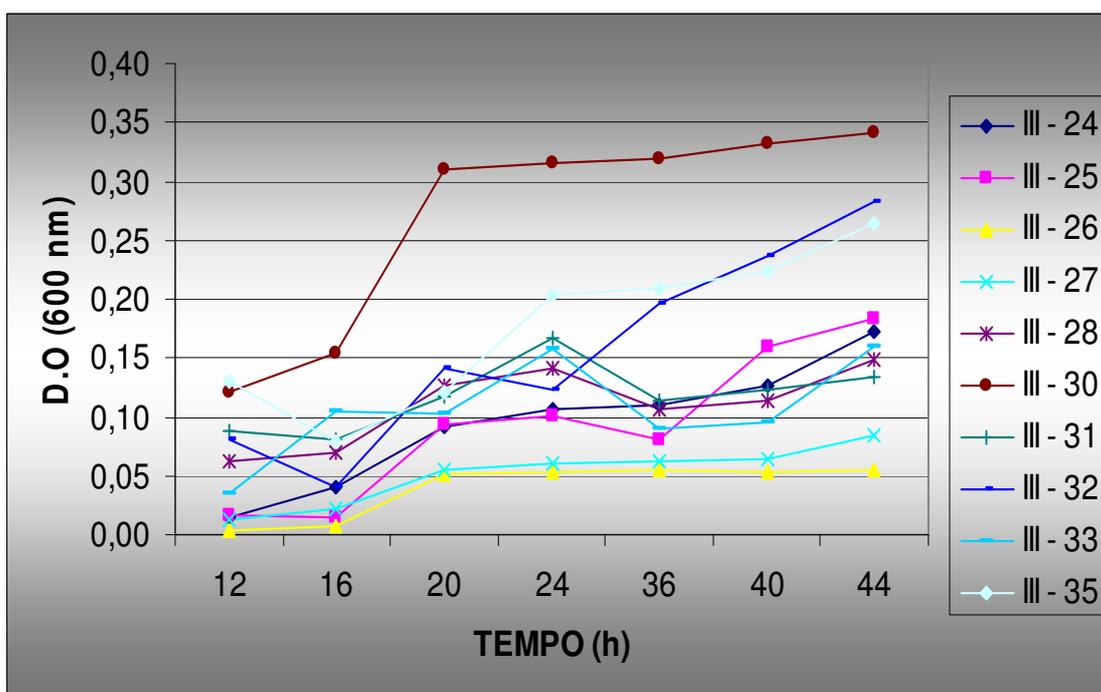


Figura 5.4 - Curva de crescimento de isolados bacterianos na presença de DBT como fonte de enxofre. As medidas de densidade ótica (D.O.), a 600nm (luz visível), começaram a ser realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo máximo de 44 horas.

A figura 5.4 mostra as curvas de crescimento obtidas após inoculação dos isolados provenientes da amostra III em meio BSM suplementado com DBT. A partir dessa amostra, foram isoladas 10 bactérias capazes de crescer usando o DBT como substrato. Observando-se cuidadosamente este gráfico, pode-se constatar que praticamente foram formados 4 grupos

com comportamentos distintos de crescimento. No primeiro grupo, se enquadraria o isolado III-30, que apresentou um crescimento rápido e exponencial até o tempo de 20 horas, atingindo após esse período a etapa estacionária da sua curva, estabilizando seu crescimento em uma D.O. de 0,35.

No segundo grupo, estariam alocados os isolados III-32 e III-35. Estes atingem D.O.s máximas semelhantes (entre 0,25 e 0,30) e apresentam curvas diferenciadas, com momentos de diminuição no crescimento seguida de recuperação deste. O isolado III-32 apresenta uma queda na D.O. por volta de 24 horas, enquanto que III-35 apresenta uma queda na D.O. em torno de 16 horas. Esse padrão de curva de crescimento, que em determinado momento sofre uma diminuição brusca na D.O., seguida de recuperação do crescimento, é comumente observado em vários gráficos deste trabalho. O isolado III-35 atingiu D.O. de 0,26 apresentando um crescimento regular e constante. No entanto, o isolado III-32 não atinge sua fase estacionária até 44 horas.

O terceiro grupo seria formado pelos isolados III-24, III-25, III-28, III-31 e III-33. Esses isolados apresentam crescimentos semelhantes, atingindo, em 44 horas, uma D.O. média de aproximadamente 0,15. Dentro desse grupo, os isolados III-31, III-33 e III-28 apresentam um padrão similar de crescimento, com picos de crescimento máximo em 24 horas seguido de queda e estabilização. III-24 cresce de maneira constante ao longo do tempo, enquanto que III-25 tem momentos de crescimento exponencial e queda, alternados.

O quarto grupo é formado por III-26 e III-27. Esses isolados praticamente não apresentam crescimento significativo, atingindo D.O. máxima menor que 0,10.

A figura 5.5 mostra a curva de crescimento obtida após a inoculação do único isolado proveniente da amostra IV em meio BSM suplementado com DBT. Esse isolado, nomeado IV-37, teve um padrão de crescimento exponencial constante, atingindo uma D.O. de 0,19 em um tempo máximo de 44 horas. No entanto, esse isolado continuava crescendo, sem ter atingido a fase estacionária da sua curva de crescimento.

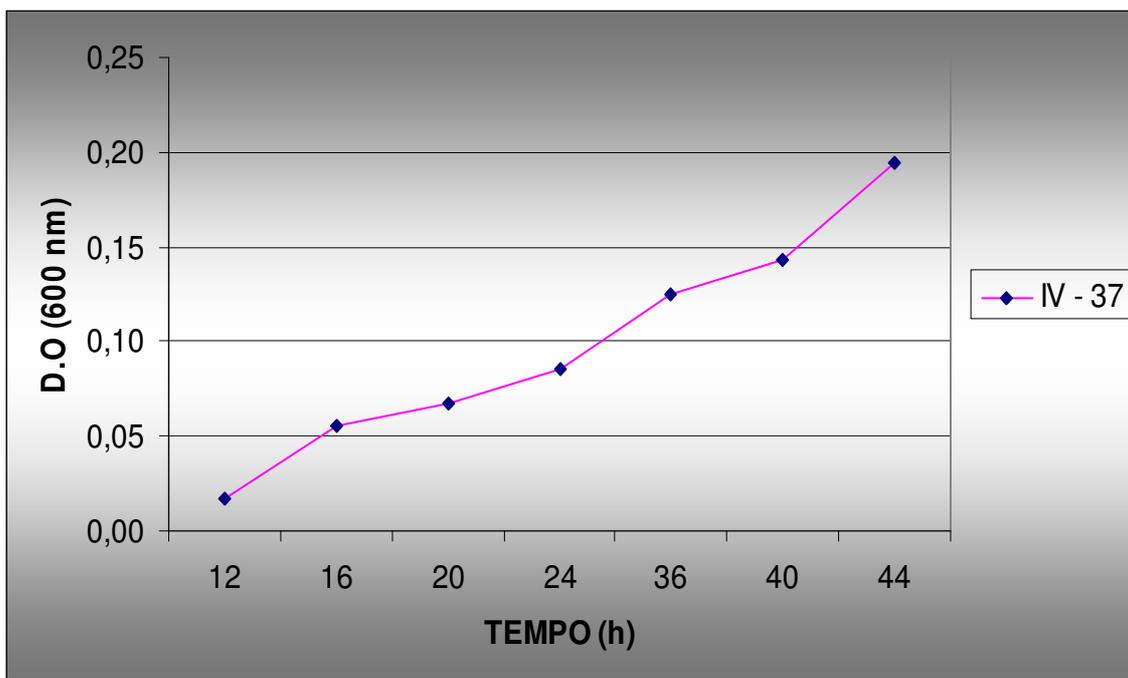


Figura 5.5 - Curva de crescimento de isolado bacteriano na presença de DBT como fonte de enxofre. As medidas de densidade ótica (D.O.), a 600nm (luz visível), começaram a ser realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo máximo de 44 horas.

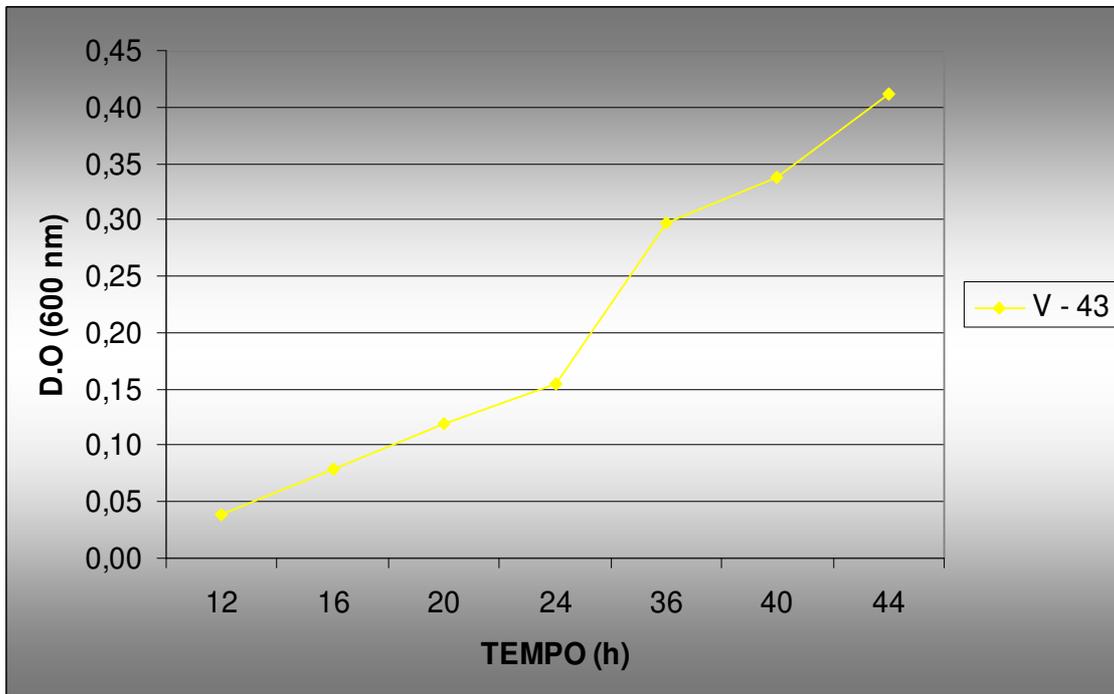


Figura 5.6 - Curva de crescimento de isolado bacteriano na presença de DBT como fonte de enxofre. As medidas de densidade ótica (D.O.), a 600nm (luz visível), começaram a ser realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo máximo de 44 horas.

A figura 5.6 mostra a curva de crescimento obtida após a inoculação do único isolado proveniente da amostra V em meio BSM suplementado com DBT. Esse isolado, nomeado V-43, começou a crescer rápida e exponencialmente com 24 horas, apresentando um padrão de crescimento abrupto e atingindo uma D.O. de 0,41 em 44 horas. O gráfico mostra que esse isolado continuava crescendo, sem ter atingido sua D.O. máxima nem a fase estacionária da sua curva de crescimento.

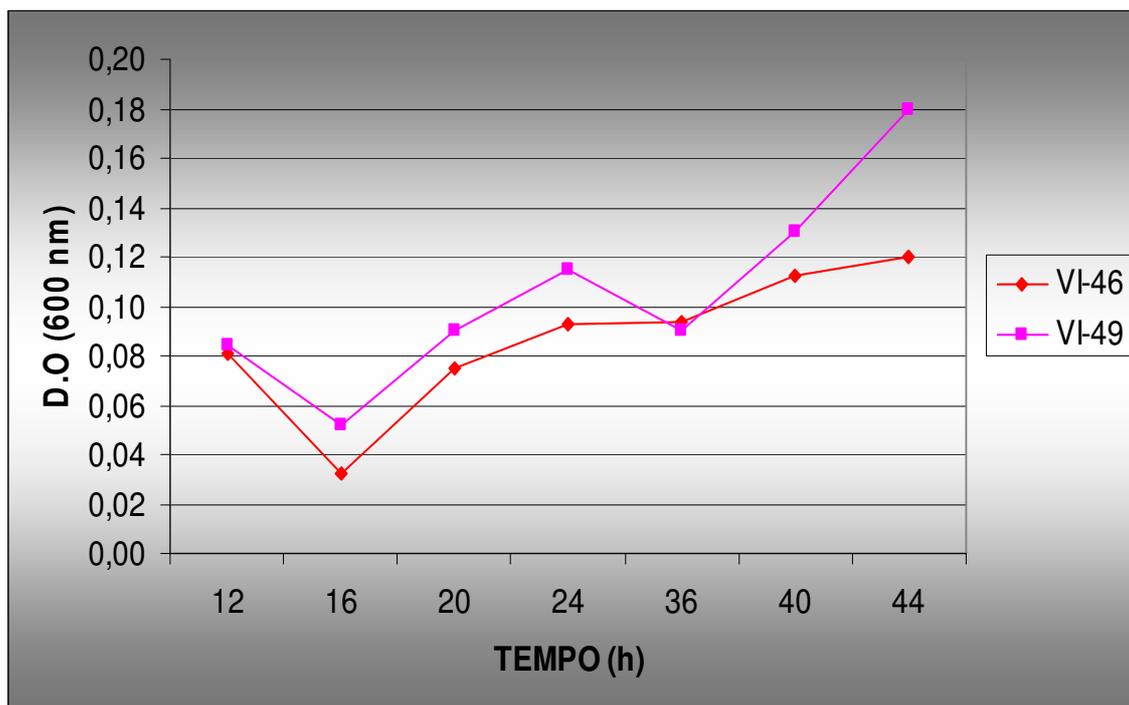


Figura 5.7 - Curva de crescimento de isolados bacterianos na presença de DBT como fonte de enxofre. As medidas de densidade ótica (D.O.), a 600nm (luz visível), começaram a ser realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo máximo de 44 horas.

A figura 5.7 mostra as curvas de crescimento obtidas após inoculação dos isolados provenientes da amostra VI em meio BSM suplementado com DBT. A partir dessa amostra, foram isoladas 2 bactérias capazes de crescer usando o DBT como substrato. Esses dois isolados, sendo VI-46 e VI-49 apresentaram padrões de crescimento semelhantes até o tempo de 36 horas e depois esses padrões se modificaram. Ambos os isolados começaram a crescer com 16 horas e atingiram D.O. de 0,10 com 36 horas. A partir daí, o isolado VI-46 cresceu até a D.O. máxima de 0,12, com 44 horas de crescimento, atingindo nesse ponto a fase estacionária de sua curva de crescimento. Já o isolado VI-49 apresentou rápido crescimento

exponencial após o tempo de 36 horas, atingindo uma D.O. de 0,18, sem atingir sua fase estacionária nesse tempo.

5.4. Caracterização dos isolados

5.4.1. Caracterização fenotípica

Para a caracterização fenotípica dos isolados, foram realizados testes de coloração diferencial de GRAM, observação da morfologia e arranjo colonial de todos os isolados obtidos em meio mínimo acrescido de DBT (Tabela 5.2). As lâminas de coloração diferencial de GRAM foram fotografadas e estão disponíveis (em anexo) para visualização.

Tabela 5.2 - Descrição morfológica, arranjo colonial e coloração de GRAM dos isolados obtidos a partir de amostras de solo contaminadas com petróleo provenientes de um sistema de *Landfarming* da Refinaria Gabriel Passos, Betim, MG.

Isolados	Caracterizações morfológicas	
	Forma/arranjo	Coloração Diferencial de Gram
I – 01	Cocobacilos	Gram -
I – 02	Cocobacilos	Gram variável
I – 03	Cocobacilos	Gram -
I – 05	Cocobacilos	Gram -
I – 07	Cocobacilos	Gram -
I – 08	Cocobacilos	Gram -
I – 09	Cocobacilos	Gram variável
I – 10	Cocos	Gram +
I – 11	Cocobacilos	Gram variável
I – 12	Bacilos	Gram +
I – 13	Micrococos	Gram +
I – 14	Cocobacilos	Gram -
I – 15	Cocobacilos	Gram -
I – 16	Bacilos	Gram -
II – 17	Cocos	Gram +
II – 18	Micrococos e diplococos	Gram +
II – 20	Micrococos	Gram +
III – 24	Cocos	Gram +
III – 25	Cocos	Gram +
III- 26	Cocobacilos	Gram -
III – 27	Cocos	Gram +
III – 28	Cocos	Gram +
III- 30	Cocobacilos	Gram +
III – 31	Micrococos	Gram variável
III – 32	Cocos e diplococos	Gram +
III – 33	Cocos	Gram +
III – 35	Estreptococos	Gram +
IV – 37	Cocos	Gram +
V – 43	Cocos e diplococos	Gram +
VI – 46	Cocos	Gram +
VI – 49	Estreptobacilos	Gram -

5.4.2. Caracterização genotípica

5.4.2.1. Amplificação de seqüência genômica repetitiva BOX

O gel de poliacrilamida (6%) foi confeccionado no intuito de obter um perfil da diversidade dos organismos presentes nas amostras com diferentes teores de contaminação. Para isso, foram usados iniciadores repetitivos do tipo BOX (Figura 5.1). Analisando visualmente o gel, podemos constatar que os isolados I-01, I-10, I-11, I-12 e I-13 apresentaram um perfil genômico semelhante entre si (canaletas 3, 10, 11, 12, e 13 respectivamente). O mesmo pode ser verificado entre os isolados I-03, I-05, I-09 e II-18 (canaletas 5, 6, 9 e 18 respectivamente) que apresentaram padrões de bandas semelhantes entre si. Os isolados III-27 e III-32 formaram outro grupo apresentando perfis genômicos semelhantes (canaletas 22 e 26). O mesmo evento acontece com relação aos isolados III-28 e III-30 que apresentaram padrões de bandas semelhantes (canaletas 23 e 24 respectivamente). Os isolados III-35 e VI-46 também apresentaram perfis genômicos muito semelhantes entre si (canaletas 28 e 33 respectivamente).

Todos os outros isolados (I-02, I-07, I-08, I-14, I-15, I-16, II-17, II-20, III-25, III-26, III-24, III-31, III-33, IV-37, V-43 e VI-49) apresentaram padrões de bandas diferentes e conseqüentemente perfis genômicos diferentes tanto entre si como em relação aos demais isolados (canaletas 4, 7, 8, 14, 15, 16, 17, 19, 29, 30, 21, 25, 27, 31, 32 e 34 respectivamente).

Sendo assim, uma análise visual do gel após amplificação do DNA com iniciadores BOX permitiu a formação de 5 grupos contendo, cada um, isolados com padrões de bandas semelhantes entre si e um total de 21 perfis genômicos distintos a partir do total de 31 isolados obtidos nesse estudo.

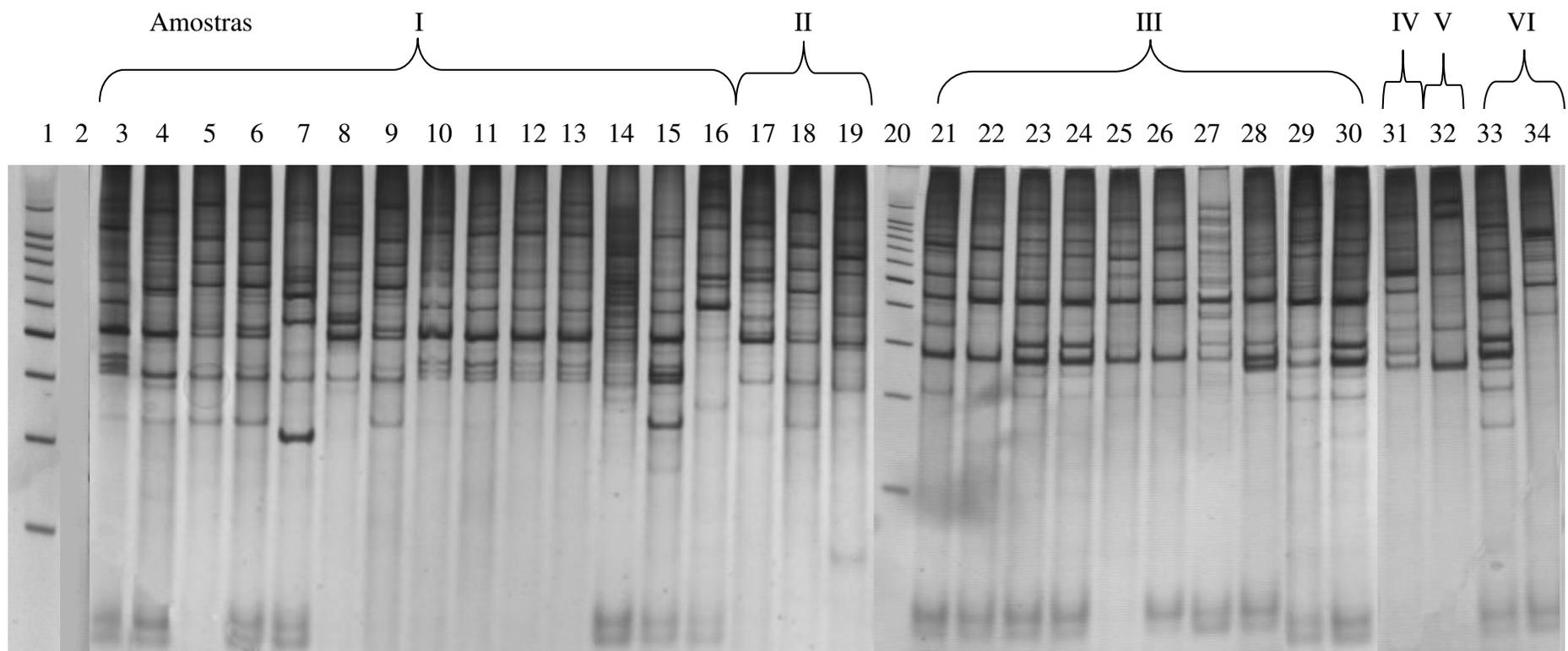


Figura 5.8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (6%) evidenciando os padrões de diversidade genômica obtidos através de experimentos de PCR com iniciadores repetitivos BOX. Canaletas: **1**, Marcador Molecular (1 kb ladder); **2**, Controle Negativo; **3**, Isolado I -01; **4**, Isolado I-02; **5**, Isolado I-03; **6**, Isolado I-05; **7**, Isolado I-07; **8**, Isolado I-08; **9**, Isolado I-09; **10**, Isolado I-10; **11**, Isolado I-11; **12**, Isolado I-12; **13**, Isolado I-13; **14**, Isolado I-14 e **15**, Isolado I-15; **16**, Isolado I -16; **17**, Isolado II-17; **18**, Isolado II-18; **19**, Isolado II-20; **20**, Marcador Molecular (1 kb ladder); **21**, Isolado III -24; **22**, Isolado III-27; **23**, Isolado III-28; **24**, Isolado III-30; **25**, Isolado III-31; **26**, Isolado III-32; **27**, Isolado III-33; **28**, Isolado III-35; **29**, Isolado III-25; **30**, Isolado III-26, **31**, Isolado IV-37; **32**, Isolado V-43; **33**, Isolado VI-46; **34**, Isolado VI-49.

5.4.2.2. Análise de similaridade dos perfis genômicos dos isolados usando UPGMA

A análise de similaridade dos padrões de bandas visualizados em gel, após amplificação dos DNAs dos isolados por BOX-PCR, usando agrupamento por UPGMA e coeficiente de DICE, mostrou a formação de grupos com padrões genômicos semelhantes em porcentagens de similaridades que variaram desde aproximadamente 30 até 100%. Considerou-se o nível de similaridade genética de 70% na análise de agrupamento, estabelecido na literatura (Kaschuk *et al.*, 2006).

Analisando-se o dendrograma de similaridade obtido (Figura 5.3), o UPGMA considerou com 100% de similaridade o isolado III-28 e III-30. Os isolados I-11 e I-13 apresentaram 96% de similaridade. O isolado I-12 apresentou 86% de similaridade com o grupo formado pelos isolados I-11 e I-13. O isolado I-09 é 86% similar ao grupo formado pelos isolados I-03 e II-18. Já o isolado I-05 tem 84% de similaridade com o grupo formado pelos isolados I-09, II-18 e I-13. O UPGMA considerou com 76% de similaridade os isolados III-27 e III-32. O isolado III-31 é 74% similar ao grupo de isolados III-28 e III-30, considerados idênticos. Quanto ao isolado I-10, este apresentou 72% de similaridade com o grupo formado pelos isolados I-11, I-13 e I-12. Os isolados III-24 e VI-46 apresentaram 72% de similaridade. Esses agrupamentos feitos pelo software com base nos perfis de bandas mostrados no gel formaram 5 grupos contendo cada um, isolados com padrões de bandas semelhantes entre si e um total de 22 perfis genômicos distintos a partir do total de 31 isolados obtidos nesse estudo.

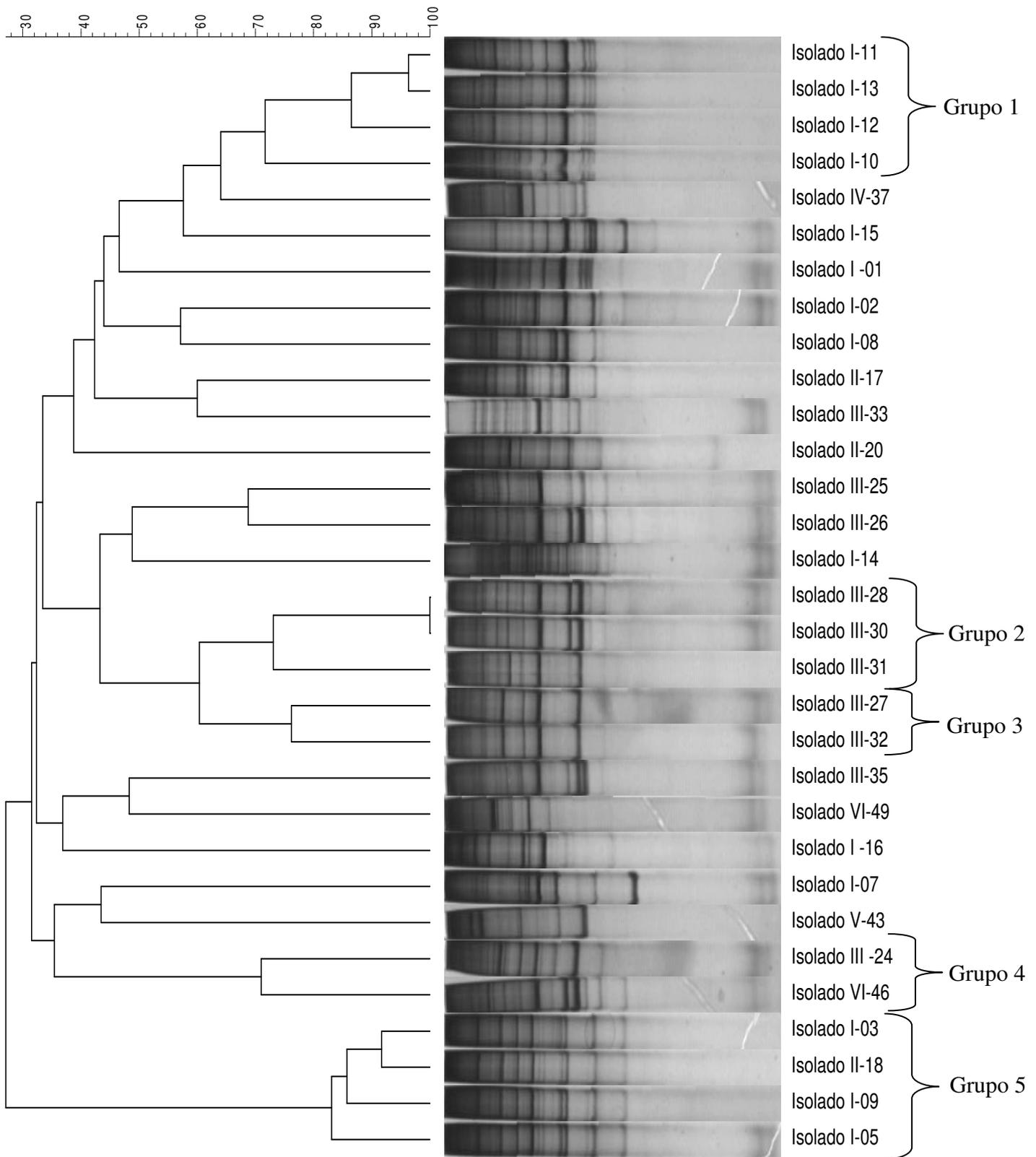


Figura 5.9 - Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, baseado na matriz de similaridade de DICE.

5.4.2.3. Sequenciamento

Os isolados selecionados para o procedimento de sequenciamento automático de DNA foram: I-1, I-3, I-9, I-10, I-11, I-15, II-17, II-18, III-24, III-25, III-27, III-30, III-31, III-32, III-35, IV-37, V-43 e VI-46, mas somente 6 isolados(I-11, II-17, II-18, III-31,IV-37 e V-43) apresentaram DNA suficiente para sequenciamento (20ng).

O isolado I-11 apresentou 92% de similaridade com bactérias do gênero *Methylobacterium* sp. Por outro lado, os isolados III-31 e V-43 apresentaram 90% de similaridade com bactérias pertencentes ao gênero *Acinetobacter* sp. Já o isolado II-18 mostrou-se 93% similar a bactérias do gênero *Acinetobacter* sp. O isolado IV-37 apresentou 94% de similaridade com bactérias do gênero *Acinetobacter* sp. e o isolado II-17 apresentou 90% de similaridade com bactérias do gênero *Acinetobacter* sp. (considerando o primer PA), e 75% de similaridade com bactérias pertencentes ao gênero *Methylobacterim* sp. (considerando o primer PH).

Vale ressaltar que somente acima de 97% pode ser considerados como pertencentes a mesma espécie. Portanto, essas baixas porcentagens indicam possíveis novas espécies e/ou gêneros bacterianos.

5.4.2.4. Análise filogenética

A árvore filogenética construída com o auxílio do software mega 4.1 (Figura 5.10) mostrou que os isolados sequenciados foram considerados distantes dos gêneros *Methylobacterium* sp., *Acinetobacter* sp. e da estirpe dessulfurizadora *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. Somente o isolado II-17 mostrou-se mais próximo do gênero *Rhodococcus* sp.

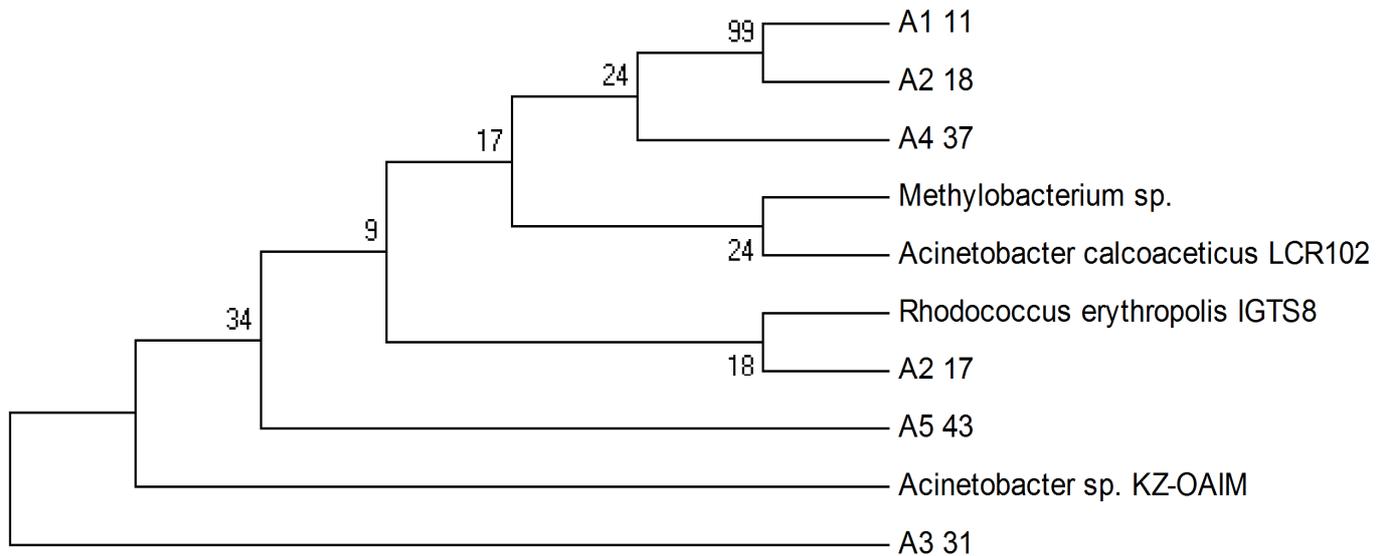


Figura 5.10: Árvore filogenética construída utilizando o programa Mega 4.1(Beta 3).

5.5. Verificação da capacidade de dessulfurização do DBT

Apenas os isolados I-5, I-9, I-11, I-15, II-17, III-30, III-32, III-35 e V-43 foram submetidos a análise em HPLC. A partir dos resultados obtidos, verificou-se a formação do 2-HBP, o produto final característico da via 4S em todos os isolados analisados. Porém os isolados se diferenciaram na eficiência e no consumo do DBT, como se pode observar no gráfico 5.11.

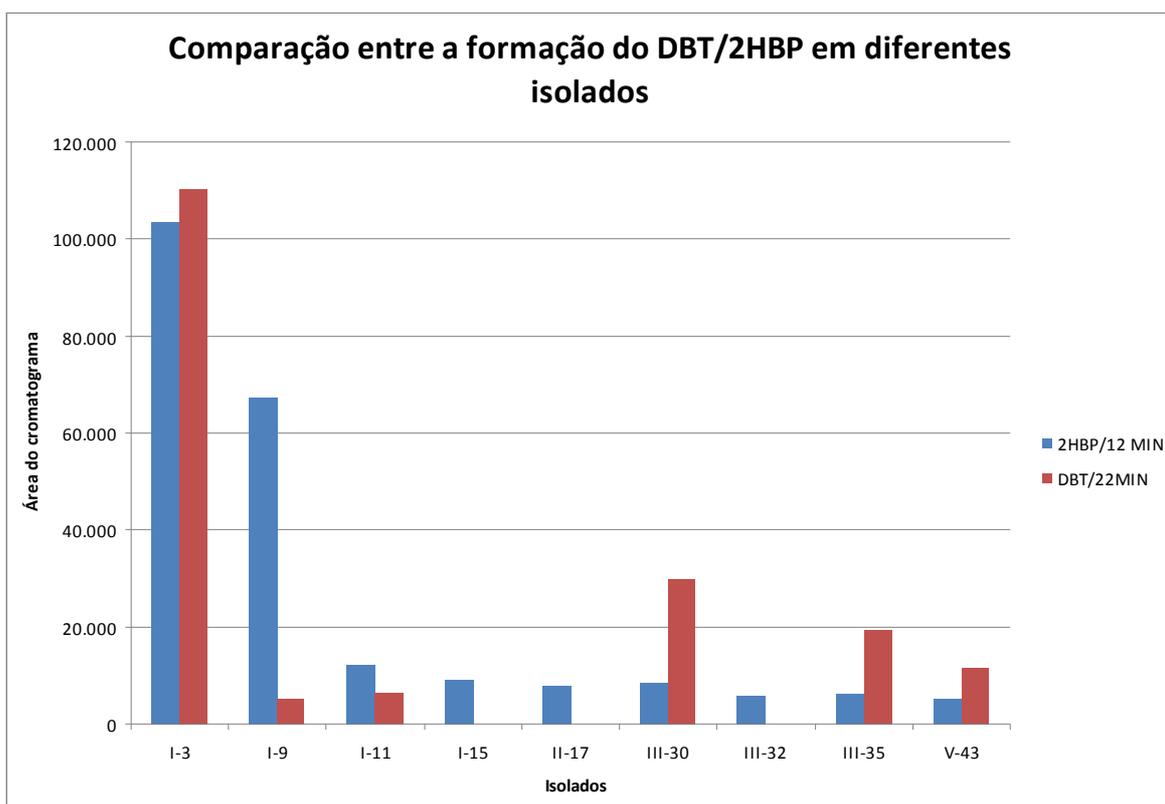


Figura 5.11 - Comparação entre a formação do DBT/2HBP em diferentes isolados

Considerando os isolados I-9 e I-11, ambos apresentaram consumo de DBT seguido de produção de 2-HBP, porém o isolado I-09 mostrou-se mais eficiente no consumo do DBT produzindo uma grande quantidade de 2-HBP quando comparado com o isolado I-11. Por outro lado, os isolados I-15, II-17 e III-32 apresentaram comportamentos metabólicos similares. Em todos estes isolados, houve consumo total do DBT, com produção do 2-HBP, porém em uma taxa menor que o isolado I-09. Os isolados III-30, III-35 e V-43 apresentaram entre si comportamentos semelhantes de utilização do DBT. Os três isolados apresentaram baixo consumo de DBT, apresentando, no final da análise, ainda uma grande quantidade de DBT seguido de uma pequena produção de 2-HBP. Com relação ao isolado I-3, este apresentou uma grande quantidade de DBT, seguido de alta produção de 2-HBP.

6. Discussão

Uma das grandes preocupações ambientais é a emissão de enxofre para a atmosfera decorrente da queima de combustíveis fósseis, pois constitui uma das maiores causas da chuva ácida. Regulamentações ambientais têm exigido cada vez mais, nos últimos anos, que as refinarias adotem métodos eficazes para diminuir o conteúdo de enxofre no petróleo. Para obedecer a essas regulamentações, a HDS é o processo convencional utilizado pelas refinarias, mas este processo não é suficientemente eficiente para a eliminação de compostos orgânicos sulfurosos recalcitrantes. Portanto, uma alternativa promissora é a biodessulfurização, que consiste na utilização de microrganismos para a retirada do enxofre complexado às cadeias carbônicas. Além disso, é um processo que requer baixa temperatura e pressão, o que significa menos custo e poluição.

A remoção do enxofre presente no petróleo por microrganismos tem utilizado o DBT como composto modelo dos vários compostos recalcitrantes presentes nos combustíveis fósseis. Assim sendo, este trabalho consiste no isolamento e caracterização molecular de novas estirpes bacterianas presentes em amostras de solo contaminadas com petróleo, provenientes de um sistema de *Landfarming* da REGAP.

As contagens obtidas após o plaqueamento das amostras de solo em meio seletivo BSM/DBT foram menores em 10 ou até 100 vezes do que aquelas obtidas por plaqueamento em meio rico (TSA). Esse resultado sugere que os microrganismos capazes de utilizar o DBT como fonte de energia representam aproximadamente de 1 a 10% da população cultivável total. Esses resultados são idênticos aos valores encontrados previamente e citados na literatura (Duarte *et al.*, 2001) para cultivo bacteriano feito a partir de amostras de solo também contaminadas com petróleo. Além disso, estes resultados são coerentes com o pressuposto de que no meio rico o número de colônias será maior uma vez que oferece uma grande quantidade de nutrientes, propiciando, assim, o crescimento de colônias variadas. Já o meio BSM acrescido de DBT permite apenas o crescimento de bactérias capazes de utilizar o substrato aromático dibenzotiofeno como única fonte de energia, ou seja, esses microrganismos precisam apresentar em seu aparato genético enzimas específicas para a quebra desse tipo de ligação.

Apesar do isolamento de microrganismos ser uma etapa fundamental quando se trabalha com objetivos biotecnológicos, como é o caso da bioprospecção de bactérias com capacidade de

biodessulfurização, para emprego na indústria petrolífera, sabe-se que as técnicas clássicas de microbiologia como isolamento e cultivo estão relacionadas a várias dificuldades do ponto de vista metodológico e de interpretação de resultados. Isso se deve ao fato de que somente uma fração pequena dos microrganismos do ambiente (em torno de 10%) é normalmente cultivada em laboratório, uma vez que muitos requerimentos nutricionais e condições de crescimento ainda permanecem desconhecidos. Assim sendo, os isolamentos em placa sempre subestimam a verdadeira densidade populacional viável (Margesin *et al.*, 2003) e falham muitas vezes na captura de uma população bacteriana específica que se almeja isolar. Nesse sentido, atualmente utiliza-se uma associação de metodologias clássicas e moleculares, quando se tem a intenção de procurar o microrganismo desejado e cultivá-lo, a fim de aproveitar seu potencial enzimático e metabólico.

Vale ressaltar a grande diferença observada no isolamento quantitativo obtido nas diferentes amostras de solo analisadas, quando estas foram plaqueadas em meio seletivo. As amostras de solo I e III apresentaram uma maior quantidade de bactérias isoladas em relação às outras amostras, sendo de 14 e 10 isolados, respectivamente. Por outro lado, a amostra de solo II apresentou 3 isolados, a VI teve 2 isolados e as amostras IV e V apresentaram apenas 1 isolado cada, após plaqueamento das mesmas em meio seletivo. Esse resultado pode estar diretamente ligado ao teor de contaminação de cada amostra, uma vez que amostras com maiores níveis de contaminação tendem a selecionar mais e especificamente populações com capacidades seletivas de utilização dos compostos contaminantes. Esse fato corrobora com as informações recebidas da própria REGAP a respeito dos solos, conforme as quais as amostras IV e VI apresentariam maiores conteúdos de óleo do que as outras amostras. Assim sendo, as espécies bacterianas capazes de tolerar esses altos níveis de contaminação estariam mais restringidas, o que poderia justificar a ocorrência de apenas 1 ou 2 isolados em cada uma dessas amostras específicas. Além do mais, os solos mais contaminados, com sua alta seletividade, acabam gerando, ao longo do tempo, o estabelecimento de comunidades pouco diversas, mas constituídas de linhagens com alto poder de degradação e grande potencial de aplicação em processos como a biorremediação (Miqueletto, 2007). Mas também não devem ser desconsiderados outros fatores físicos das amostras, como sua porosidade, teor de matéria orgânica e níveis de outros nutrientes presentes. E também não podemos considerar os isolados quantitativamente sem saber sua filogenia, pois, caso alguns deles sejam da mesma espécie, na verdade esse número de isolados podem tender a diminuir. Embora o BOX-PCR possa dar uma idéia dessa semelhança de isolados, apenas o sequenciamento de DNA possibilitará a elucidação correta dessa dúvida.

As curvas de crescimento dos trinta e um isolados foram construídas a partir das medições de densidade óptica ao longo do tempo (T_1 a T_7), sendo que essas medições tiveram início no tempo equivalente a 12 horas após a sua inoculação (T_0). Esse tempo inicial de medida da D.O. de crescimento dos isolados foi estimado em função da observação prévia de que geralmente o crescimento bacteriano em meio BSM/DBT tem início após esse intervalo de 12 horas. Supõe-se que o crescimento lento das linhagens no meio seletivo pode ser atribuído ou à alta especificidade dos microrganismos no caso de consumo do DBT, tanto quando apresentam uma via metabólica e aparato enzimático para a degradação do DBT (consumo de carbono) como quando apresentam estes para a dessulfurização do composto; ou devido a uma limitação de fonte de carbono.

Em relação às curvas de crescimento dos isolados em meio BSM/DBT, cinco isolados identificados como I-9, I-11, I-15, II-17 e V-43 apresentaram um crescimento exponencial, atingindo uma D.O. máxima de 0,47 em um intervalo de tempo de 44 horas. Dentre esses isolados, alguns se destacaram apresentando um padrão de crescimento exponencial um pouco mais rápido, como o I-11 que atingiu uma D.O. de 0,45 em 40hs.

Estes isolados foram submetidos a análise em HPLC para verificar a capacidade de dessulfurização. Em todos os isolados analisados, houve a formação de 2-HBP, porém se diferenciaram quanto ao comportamento metabólico. Pode-se observar que o isolado I-09 metabolizou parte do DBT produzindo uma grande quantidade de 2-HBP, sendo, assim, uma possível dessulfurizadora. Já os isolados I-15, II-17 e III-32 apresentaram comportamentos metabólicos semelhantes entre si. Em todos estes, o DBT foi totalmente metabolizado, produzindo 2-HBP. Estes resultados sugerem que estes isolados podem utilizar as duas vias de utilização do DBT (degradativa e Via “4S”) devido a pequena quantidade de 2-HBP formado. Quanto aos isolados III-30, III-35 e V-43, estes apresentaram no final da análise, ainda uma grande quantidade de DBT seguido de uma pequena produção de 2-HBP. Isso pode estar relacionado ao tempo para realização das análises das amostras, o que não permitiu um consumo maior de DBT.

Dentre o grupo de isolados com maior crescimento, apenas o isolado V-43 apresentou fluorescência no teste presuntivo, sendo que este teste deveria, teoricamente, indicar uma possível existência da via metabólica de dessulfurização “4S”, de maior interesse neste trabalho. Este resultado foi confirmado pela análise em HPLC em que esta bactéria V-43 apresentou formação do produto esperado na via “4S”, o 2-HBP.

Os isolados I-02, I-07, I-08, I-13, I-16, II-18, III-24, III-25, III-28, III-31, III-33, IV-37 e VI-49 apresentaram, em um intervalo de tempo de 44 horas, uma D.O. variando entre 0,15 e 0,20. Desses isolados, I-16, II-18 e IV-37 apresentaram fluorescência no teste presuntivo. Uma correlação entre esses dois dados, crescimento e fluorescência, é subjetiva pois é descrita na literatura a ocorrência na natureza de bactérias com fluorescência inerente (ex: *Pseudomonas fluorescens*), sendo que esse tipo de fluorescência não tem nenhuma ligação com capacidade metabólica de dessulfurização de compostos. Os demais isolados identificados como I-01, I-03, I-05, I-10, I-12, I-14, II-20, III-26, III-27 e VI-46 foram os que apresentaram menor crescimento, atingindo D.O.s que variaram de aproximadamente 0,06 a 0,12. O baixo crescimento destes isolados pode estar relacionado a ausência de fonte de carbono, constituindo, assim, um fator limitante para o crescimento destes. Dentre esse grupo, os isolados I-03, I-05, I-12, I-14 e II-20 apresentaram fluorescência no teste presuntivo para verificação da utilização de enxofre.

Em muitos gráficos não foi possível observar a fase estacionária das curvas de crescimento, provavelmente devido à descontinuidade das medições espectrofotométricas após o tempo de 44 horas. A fase de declínio ou morte não pode ser observada nesse tipo de medição por turbidez, uma vez que o método não permite diferenciar células viáveis de células mortas.

Mohebbali (2007) estudando a estirpe *Gordonia alkanivorans* RIPI90A observou que o tempo de crescimento máximo desta bactéria em meio MS-SB (meio mínimo de sais suplementado com benzoato de sódio e DBT) ocorreu depois de aproximadamente 40h de cultivo, o que corrobora com os resultados apresentados neste estudo, em que algumas estirpes apresentaram crescimento máximo com 44 horas de cultivo. Tanaka *et al.*, (2002), avaliando o crescimento da estirpe *Rhodococcus* sp. KT462, verificou um crescimento máximo em 80h de cultivo em meio KT suplementado com DBT, como única fonte de enxofre. A turbidez a 660nm foi de 3.41. Chen *et al.*, (2008) estudando o isolado identificado como *Mycobacterium* sp. ZD-19, verificou que a densidade máxima de células ($5g\ DCWI^{-1}$) foi detectada com 48h de cultivo em meio BSM suplementado com DBT (0,5mM).

As características morfológicas dos isolados apresentaram uma grande variedade de tipos, sendo que 90% do total de isolados apresentaram a forma de cocos e cocobacilos. Com relação à coloração diferencial de Gram, 55% do total de isolados mostraram-se Gram-positivos, 32% Gram-negativos e 13% Gram-variáveis. Estes resultados podem ser de grande interesse para o nosso estudo, uma vez que, segundo a literatura, entre os principais

microrganismos com capacidade de utilizar o DBT como única fonte de enxofre, seguindo a via específica de dessulfurização “4S”, estão várias linhagens diferentes de bactérias do gênero *Rhodococcus*, que apresentam forma de cocos e são Gram-positivos (Kilbane, 1992). No entanto, apenas a descrição morfológica é insuficiente para se fazer inferências sobre a identidade filogenética dos isolados obtidos nesse trabalho e, assim sendo, experimentos de sequenciamento de DNA estão em andamento para essa confirmação.

Considerando-se os grupos de isolados agrupados através da análise de similaridade (UPGMA), observa-se que entre os isolados do grupo 1, apenas o isolado I-12 apresentou morfologia diferente dos demais isolados (I-10, I-11 e I-13) que apresentaram forma de cocos, porém se diferenciaram quanto à coloração de Gram. O isolados I-10, I-12 e I-13 apresentaram coloração Gram-positiva e o isolado I-11 foi Gram-variável.

Quanto ao 2º grupo de isolados, representado pelos isolados I-03, I-05, I-09 e II-18 (Grupo 5), que apresentaram mesmo padrões de bandas também se diferenciaram quanto à morfologia e coloração de Gram. Ambos os isolados (I-03 e I-05) apresentaram a forma de cocobacilo e coloração Gram-negativa. Os isolados I-09 e II-18 apresentaram mesma morfologia (cocos), porém se diferenciaram quanto à coloração (I-09 Gram-variável e II-18, Gram-positivo). Essa característica de coloração diferencial de Gram não é suficiente para diferenciar com precisão os isolados, sendo que muitas bactérias ambientais são conhecidamente variáveis tanto em relação à forma como em relação à coloração que assumem em suas paredes celulares (BONIEK, 2008). Os isolados I-28 e III-30 considerados idênticos pela análise de similaridade apresentaram padrões morfológicos semelhantes (ambos tem forma de cocos e são Gram-positivos). Isso pode ser também observado entre os isolados III-27 e III-32 que mostraram padrões de bandas semelhantes e padrões morfológicos também semelhantes (forma de cocos e Gram-positivos).

Analisando-se as diferenças de perfis genômicos observados após a eletroforese em gel de poliacrilamida (6%), de produtos de PCR obtidos usando-se iniciadores repetitivos do tipo BOX (Figura 5.8), pode-se perceber que alguns isolados apresentam padrões semelhantes de bandas no gel e podem, portanto, se tratar da mesma espécie bacteriana. Em relação a isso, a primeira coisa que o gel de BOX-PCR nos mostra é que a amostra I não apresentou de fato 14 isolados distintos, mas sim 9 isolados, enquanto que a amostra III apresentou 7 isolados distintos ao invés de 10, como suposto antes da caracterização molecular.

O perfil genômico obtido sugere a existência de maior abundância microbiana nas amostras I e III e menor abundância nas amostras IV, V e VI, provavelmente devido aos teores diferenciados de contaminação das amostras (amostras IV e VI com maiores conteúdos de óleo).

Para que o gel do BOX-PCR pudesse ser analisado com maior precisão, nos valem do auxílio do software “Bionumerics” para construção de um dendrograma de similaridade tipo UPGMA, usando o coeficiente de DICE, que relaciona a semelhança dos padrões de acordo com bandas previamente determinadas como iguais. Assim sendo, o dendrograma construído pelo programa, apresentado na Figura 5.9, mostrou algumas semelhanças de padrões de bandas descritos previamente nos resultados.

A análise de similaridade por UPGMA mostrou a formação de grupos com padrões genômicos semelhantes em porcentagens de similaridades que variaram desde aproximadamente 30 até 100%. Para efeito de determinação preliminar de quais isolados serão considerados como pertencentes à mesma espécie, consideraremos os agrupamentos formados no intervalo correspondente às porcentagens de 70 e 100%. No entanto, alguns desses isolados poderão ser separados posteriormente como estirpes diferentes dentro de uma mesma espécie, caso sejam constatadas diferenças metabólicas que justifiquem essa separação, como seria o caso da ocorrência de uma estirpe dessulfurizadora dentro de um grupo de não-dessulfurizadores da mesma espécie. Isso poderia ocorrer pelo fato dos genes responsáveis por esta capacidade estarem normalmente localizados em plasmídios, que não precisam necessariamente estar presentes em todas as linhagens de uma espécie.

Resumindo, a partir dos resultados obtidos no dendrograma de UPGMA, formaram-se 5 grupos com padrões genômicos semelhantes, sendo estes: Grupo 1 (I-11, I-13, I-12, I-10), Grupo 2 (III-28, III-30, III-31), Grupo 3 (III-27, III-32), Grupo 4 (III-24, VI-46) e Grupo 5 (I-03, II-18, I-09, I-05). Analisando-se esses resultados, observamos algumas curiosidades, descritas a seguir. O UPGMA considerou o isolado I-01 diferente dos isolados do grupo 1, sendo que quando analisamos visualmente o gel, podemos constatar que I-01 parece fazer parte do grupo 1, por semelhança de padrão de bandas. Provavelmente o isolado I-01 foi considerado como mais distante do grupo 1 devido a um provável erro de agrupamento pelo programa. Além disso, o isolado I-10 foi considerado pelo UPGMA como mais distante dos outros (I-11, I-13 e I-12), sendo que eles todos tem perfis muito semelhantes. Provavelmente a distância se deveu ao fato do perfil do isolado I-10 ter apresentado bandas tortas por defeito

de corrida do gel. Em relação ao grupo 4, a observação visual das bandas no gel mostra que os padrões dos 2 isolados desse grupo (III-24 e VI-46) parecem diferentes. Para confirmação, os 2 isolados foram selecionados para sequenciamento, porém não apresentaram quantidade de DNA suficiente para tal. Continuando as comparações feitas entre o agrupamento por observação visual do gel e aquele feito pelo UPGMA do software, visualmente agrupamos os isolados III-35 e VI-46 como tendo padrões parecidos, enquanto que o UPGMA tratou esses isolados como completamente distintos. Estes isolados foram também selecionados para sequenciamento mas não apresentaram quantidade de DNA suficiente.

Constatações interessantes surgiram, tanto quando se observa visualmente o gel quanto com o agrupamento pelo dendrograma. Em 3 grupos, foi observada a presença de isolados semelhantes provenientes da mesma área, caso de isolados das áreas I e III. Nos 2 outros grupos restantes, observou-se a ocorrência de perfis genômicos parecidos provenientes de amostras de solo diferentes, sendo o caso de isolados das áreas III e VI e isolados das áreas I e II. Esse tipo de observação já foi descrita por outros pesquisadores anteriormente (Stocco *et al.*, 2008). Apesar de interessante, no caso desse estudo parece ser uma constatação relativamente óbvia, pois as espécies bacterianas dotadas de habilidades especiais, como utilização de compostos de petróleo, podem estar presentes em qualquer solo onde elas já habitavam anteriormente e ser enriquecidas pela pressão seletiva do contaminante.

De acordo com a análise feita pelo software do gel de BOX-PCR foram obtidos 21 perfis genômicos diferentes, estando estes agrupados em 5 grupos distintos. Quinze isolados estão alocados dentro dos 5 grupos formados e então 52% dos isolados não foram inseridos em nenhum agrupamento (Figura 5.9).

Considerando os grupos formados pela análise do gel em UPGMA e os resultados de sequenciamentos obtidos, os isolados pertencentes ao Grupo 1 (I-10, I-11, I-12 e I-13) apresentaram 92% de similaridade com bactérias do gênero *Methylobacterium* sp, uma vez que o isolado I-11 foi submetido ao sequenciamento. Os isolados pertencentes ao Grupo 2 (III-28, III-30, III-31) apresentaram 90% de similaridade com bactérias do gênero *Acinetobacter* sp e os isolados pertencentes ao Grupo 5 (I-03, II-18, I-09, I-05) mostraram-se 93% similar a bactérias do gênero *Acinetobacter* sp. Além disso, os isolados II-17, IV-37 e V-43 também apresentaram similaridade com bactérias do gênero *Acinetobacter* sp.

Segundo Patt *et al* (1976), o gênero bacteriano *Methylobacterium* sp. apresenta a capacidade de utilizar uma variedade de compostos orgânicos como substrato, utilizando o carbono como fonte de energia, utilizando, assim uma via degradativa. Por outro lado, o gênero *Acinetobacter* sp., apresenta a capacidade de utilizar o enxofre presente em PAH's, sendo possíveis dessulfurizadores (Malik, 1978).

Quando se compara os resultados obtidos no sequenciamento e o gel BOX, observa-se que os isolados considerados como pertencentes ao mesmo gênero bacteriano *Acinetobacter* sp. (Grupo 1, 2 e 5, além dos isolados II-17, IV-37 e V-43) apresentaram padrões genômicos diferentes. Estes resultados sugerem que os isolados podem representar linhagens diferentes de uma possível nova espécie, uma vez que o gel box discrimina por linhagens e não por espécie. Com relação à morfologia, observa-se que todos estes isolados se diferenciaram quanto a morfologia e coloração de Gram, uma vez que muitas bactérias ambientais são conhecidamente variáveis.

Pela análise da árvore filogenética construída utilizando o software 4.1, observa-se que os isolados seqüenciados foram considerados distantes dos gêneros *Methylobacterium* sp. *Acinetobacter* sp. e da estirpe dessulfurizadora *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, corroborando com outros resultados obtidos neste trabalho de que estes isolados possam ser estirpes novas, espécies novas ou gêneros novos.

Outro dado interessante observado a partir dos resultados obtidos neste trabalho é quando comparamos os grupos de isolados que apresentaram padrões de bandas semelhantes no gel de BOX-PCR com os padrões de crescimento dos isolados. Observa-se que dentre os isolados pertencentes ao primeiro grupo (I-01, I-10, I-11, I-12 e I-13), apenas o isolado I-11 apresentou maior crescimento, atingindo uma D.O. máxima de 0,47 no tempo de 44 horas. Os outros isolados (I-01, I-10, I-12 e I-13) apresentaram pouco crescimento, atingindo um D.O. de no máximo 0,2. Este fato pode ser também observado entre os outros grupos que apresentaram padrões de bandas semelhantes. No grupo representado pelos isolados I-03, I-05, I-09 e II-18, somente o isolado I-09 apresentou maior crescimento, com uma D.O. de 0,44. Já entre o isolado III-27 e III-32, o III-32 foi o que obteve maior crescimento atingindo uma D.O. de 0,30. No grupo representado pelos isolados III-28 e III-30, apenas o III-30 apresentou maior crescimento (D.O. de 0,35) e entre os isolados III-35 e VI-46, somente o isolado III-35 obteve maior crescimento com uma D.O. máxima de 0,27.

Estes resultados sugerem que alguns isolados conseguem degradar o substrato e assim conseguir energia para o seu crescimento, com maior velocidade que outros com perfis genômicos parecidos, talvez por apresentarem um plasmídeo com genes específicos para essa utilização de substrato, seja através da degradação deste PAH para obtenção de energia e como fonte de carbono, seja para retirada do enxofre especificamente na via “4S”. Além disso, bactérias pertencentes a uma mesma espécie podem apresentar estirpes diferentes, com diferentes comportamentos metabólicos. A definição de estirpe seria “uma população de organismos que descendem de um único organismo ou de um isolado de uma cultura pura” (Prescott *et al.*, 1996, p. 392). Logo, uma estirpe pode diferir de outra da mesma espécie por diferenças pequenas, embora identificáveis.

Assim, além das possíveis estirpes dessulfurizadoras obtidas neste trabalho de grande interesse para refinarias pela utilização específica do enxofre, a presença de microrganismos com genes participantes das vias metabólicas de utilização do DBT pode também ser de grande utilidade em âmbito ambiental, uma vez que bactérias com capacidade degradativa de hidrocarbonetos aromáticos contendo enxofre é interessante para desenvolvimento de projetos de biorremediação em ambientes impactados pela contaminação com petróleo.

7. Conclusões

- Foram obtidos 31 isolados com capacidade de utilizar o DBT como fonte de
- A maioria dos isolados (90%) apresentaram a forma de cocos e cocobacilos. E com relação à coloração diferencial de Gram, 55% do total de isolados mostraram-se Gram-positivos.
- As curvas de crescimento dos isolados em meio BSM/DBT apresentaram padrões de crescimento diferentes entre isolados que apresentaram padrões de bandas semelhantes, sugerindo que alguns isolados conseguem degradar o substrato com maior velocidade que outras pertencentes a mesma espécie provavelmente por apresentarem um plasmídeo com genes específicos da via “4S”, permitindo uma melhor utilização do substrato.
- A análise de similaridade dos padrões de bandas usando agrupamento por UPGMA, mostrou a formação de 5 grupos com padrões genômicos semelhantes em porcentagens de similaridades que variaram desde 70 até 100%.
- Foram obtidos no mínimo duas espécies ou gêneros novos.
- Possíveis estirpes com capacidade de dessulfurização, sendo os isolados: I-09, I-15, II-17 e III-32 como mais promissores.

8. Sugestões para trabalhos futuros

- Verificar condições que otimizem o crescimento das bactérias, propiciando, assim, maior eficiência do processo.
- Estudar as vias metabólicas das estirpes com capacidade de dessulfurização para possível patenteamento pela PETROBRÁS.
- Contribuir para a futura utilização da biodessulfurização em substituição à hidrodessulfurização, em alguma escala, pelas refinarias, diminuindo assim os custos dos combustíveis menos poluentes e mais eficientes, tanto custo para a refinaria quanto custo final para o consumidor.
- Contribuir, de modo indireto, para a diminuição da poluição ambiental, seja pelo incentivo ao uso de um combustível com menor teor de enxofre, seja porque tecnologia de BDS é menos poluente do que a de HDS, pelo uso de parâmetros físicos, como temperatura e pressão utilizados no processo, controlados.
- Estreitar as relações com a indústria petrolífera a fim de expandir nossas pesquisas microbiológicas para outras áreas de interesse das refinarias.
- Obter espécies bacterianas de fácil cultivo, com crescimento na presença de plasmídeos específicos da via “4S”.
- Utilizar microrganismos com capacidade degradativa de compostos poliaromáticos contendo enxofre em processos de biorremediação.

9. Referências bibliográficas

ALVES, L.; MESQUITA, E.; GÍRIO, F. M. (1999). Dessulfurização Bacteriana de Combustíveis Fósseis. *Boletim de Biotecnologia*, nº 62.

AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE. (1983). Land Treatment Practice in the petroleum industry, report prepared by Environmental Research and Technology Inc, Washington, DC.

BALBA, M.T.; AL-DAHER, R.; Al-Awadhi, N.; Chino, H.; Tsuji, H. (1998). Bioremediation of oil-contaminated desert soil: The Kuwait experience. *Env. Int.* 24 (1/2): 163–173

BLOCK, R.; KABRICK, R.; STROO, H.; SWETT, G. (1992). Bioremediation of petroleum contaminated soils – why does it not work sometimes? A Spring National meeting: American Institute of Chemical Engineers, New Orleans, USA, paper 13A.

BONIEK, D. (2008). Isolamento de Estirpes Bacterianas com Capacidade de Dessulfurização do Dibenzotiofeno, Provenientes de Amostras de Solo do Continente Antártico. Monografia de conclusão de curso. *Universidade Federal de Ouro Preto.*, 43p.

BOSSERT, I.D.; BARTHA, R. (1986). Structure–biodegradability relationships of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 37: 490–497.

CASTORENA, G. C.; SUÁREZ, I.; VALDEZ, G.; AMADOR, L.; FERNÁNDEZ, S. (2002). *FEMS Microbiol. Lett.*, 215: 157 – 161.

CHEN, H.; ZHANG, W.J.; CHEN, J.M.; CAI, Y.B.; LI, W. (2008). Desulfurization of various organic sulfur compounds and the mixture of DBT + 4,6 – DMDBT by *Mycobacterium* sp. ZD – 19. *Bioresour. Technol.* 99: 3630 – 3634.

CONSTANTI, M.; GIRALT, J.; BORDONS, A. (1994). Desulfurization of dibenzothiophene by bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 10:510 - 516.

CONSTANTI, M., GIRALT, J., BORDONS, A. (1996). Degradation and desulfurization of dibenzothiophene sulfone and other sulfur compounds by *Agrobacterium* MC501 and a mixed culture. *Enzyme Microb. Technol.*, 19: 214-219.

DAHLBERG, M.; ROHRER, R.L.; FAUTH, D.J.; SPRECHER, R.; OLSON, G.J. (1993) Biodesulfurization of Dibenzothiophene sulfone by *Arthrobacter* sp. and studies with oxidized Illinois N°6 coal. *Fuel*, 72:1645-1649.

DE FATIMA; W.M.J.; SETTI, L.; LANZARINI, G.; PIFFERI, G. (1996). Dibenzothiophene biodegradation by a *Pseudomonas* sp. In poorly degradable organic solvents. *Process Biochem.* 31: 711-717.

DENIS LAROSE, C.; LABBÉ, D.; BERGERON, H.; JONES, A. M.; GREER, C. W.; AL-HAWARI, J.; GROSSMAN, M. J.; SANKEY, B. M. AND LAU, P. C. K. (1997). Conservation of plasmid-encoded dibenzothiophene desulfurization genes in several *Rhodococci*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 2915-2919.

DENOME, S.A.; OLSON, E. S.; YOUNG, K.D. (1993). Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2837-2843.

DENOME, S. A.; OLSON, E. S.; YOUNG, K. D. (1994). Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 2837-2843.

DEVLEIGH, W.; VERSTRAETE, W. (1996). Formation of nonbioavailable organic residue in soil: Perspectives for site remediation. *Biodegradation* 7: 471-485.

DUARTE, G. F.; ROSADO, A. S.; SELDIN, L.; ARAÚJO, W.; VAN ELSAS, J. D. (2001). Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (*dsz*) genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 1052-1062.

EATON, R.W.; NITTEAUER, J.D. (1994). Biotransformation of benzothiophene by isopropylbenzene degrading bacteria. *J. Bacteriol.* 176: 3992-4002.

EDWARDS, U.; ROGALL, T.; BLÖCKER, H.; EMDE, M.; BÖTTGER, E. C. (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.*17: 7843-7853.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1994). Landfarming In: How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A guide for Corrective Action Plan reviews (EPA 510-B-94-003 and EPA 510-B-95-007).

GALLANGHER, J. R.; OLSON, E. S.; STANLEY, D. C. (1993). Microbial desulfurization of dibenzothiophene: a sulfur-specific pathway. *FEMS Microbiol. Lett.*, 107: 31-36.

GENOU, G.; DE NAEYER, F.; VAN MEENEN, P.; VAN DER WERT, H.; DE NIJS, W.; VERSTRAETE, W. (1994). Degradation of oil sludge by landfarming – a case study at Ghent Harbour. *Biodegradation* 5: 37–46.

GUPTA, N.; ROYCHOUDHURY, P. K.; DEB, J.K. (2005). Biotechnology of desulfurization of diesel: prospects and challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 356 – 366.

GRAY, K. A.; POGREBINSKY, O.; MRACHKO, G. T.; SQUIRES, C. H. (1996). Biochemical characterization of the biodesulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 - potential role in fossil fuel desulfurization (conference abstract). *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.*, 212 Meet., Pt.1, p. BIOL 054.

GROSSMAN, M. J.; LEE, M.K.; PRINCE, R.C.; GARRETT, K.K.; GEORGE, G.N.; PICKERING, I.J. (1999). Microbial desulfurization of a crude oil middle-distillate fraction: analysis of the extent of sulfur removal and the effect of removal on remaining sulfur. *Appl Environ Microbiol* 65:181–188

HARMSSEN, J. (1991). Possibilities and limitations of landfarming for cleaning contaminated soils. In: Hinchee RE & Ollenbuttel RF (Eds), *On site Bioreclamation* (pp 255–272).

HARMSSEN, J.; VELTHORST, H.J.; BENNEHEY, IPAM. (1994). Cleaning of residual concentrations with an extensive form of landfarming. In Hinchee RE, Anderson DB, Blaine FB & Sayles GD (Eds), *Applied Biotechnology for Site Remediation* (pp. 84– 91). Lewis Publishers, Boca Raton, USA.

HEJAZI, R.F.; HUSAIN, T.; KHAN, F.I. (2003). Landfarming operation of oily sludge in arid region-human health risk assessment. *J. Hazard. Materi.* B99: 287–302.

HEUER, H.; SMALLA, K. (1997). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities, p. 353-373. In J.D. van Elsas, E.M.H. Wellington, J. Trevors (eds.), *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, In., New York, N.Y.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STANLEY, J. T.; WILLIAM, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore, USA. William and Wilkins.

HOU, C. T., LASKIN, A. Microbial conversion of dibenzothiophene. *Develop. Ind. Microbiol.*, **17**, 351-362 (1976).

IZUMI, Y., OHSHIRO, T., OGINO, H., HINE, Y., SHIMAO, M. (1994). Selective desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 223-226

KARGI, F. (1987). Biological oxidation of thionthrene, thioxanthene and dibenzothiophene by the thermophilic organism *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biotechnol. Lett.* 9:478-482.

KASCHUK, G., HUNGRIA, M., ANDRADE, D.S., CAMPO, R.J. (2006). Genetic diversity of rhizobia associated with common bean grown under the no-tillage and conventional systems in South Brazil. *Appl. Soil Ecol.*, 32: 210-220.

KAYSER, K.J., BIELAGA-JONES, B.A.; JACKOWSKY, K; ODUSAN, O.; KILBANE, J.J. (1993). Utilization of organosulphur compounds by axenic and mixed cultures of *Rhodococcus rhodochromus* IGTS8. *J. Gen. Microbiol.* 139: 3123-3129.

KILBANE, J. J., JACKOWSKY, K. (1992). Biodesulfurization of water-soluble coal-derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. *Biotechnol. Bioeng.*, 40:1107-1114.

KILBANE, J.J.; LE BORGNE, S. (2004). Petroleum biorefining: the selective removal of sulfur, nitrogen, and metals. In: Vazquez-Duhalt R, Quintero-Ramirez R, editors. *Petroleum Biotechnology, Development and Perspectives*. Elsevier; p. 29–65.

KIM, H. Y.; KIM, T. S.; KIM, B. H. (1990). Degradation of organic sulfur compounds the reduction of dibenzothiophene to biphenyl and hydrogen sulfide by *Desulfovibrio desulfuricans* Mb. *Biotechnol. Lett.* 12: 757-760.

KLUBEK, B.; SCHMIDT, C.; BURNHAM, H. (1998). Characterization of soil bacteria that desulfurize organic sulphur compounds. 2. Optimization of sulphur removal from dibenzothiophene sulphone, benzene sulphonic acid, selected Illinois coals. *Microbios.*, 93. 17-34).

KODAMA, K.; NAKATANI, S.; UMEHARA, K.; SHIMIZU, K.; MINODA, Y.; YAMADA, K. (1970). Microbial conversion of petro – sulfur compounds. Part III. Isolation and identification of products from dibenzothiophene. *Agric. Biol. Chem.*, 34, 1320 – 1324.

KODAMA, K.; UMEHARA, K.; SHIMIZU, K.; NAKATANI, S.; MINODA, Y.; YAMADA, K. (1973). Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway. *Agric. Biol. Chem.*, 37, 45 – 50.

KONISHI, J.; ISHII, Y.; ONAKA, T.; OKUMURA, K.; SUZUKI, M. (1997). Thermophilic carbon-sulfur-bond-targeted biodesulfurization. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3164-3169.

KRAWIEC, S. (1990). Bacterial desulfurization of thiophenes: screening techniques and some speculations regarding the biochemical and genetic bases. *Journal of Industrial Microbiology.*, 31: 103-114.

KROPP, K.G.; GONÇALVES, J.A.; ANDERSSON, J.T.; FEDORAK, P.M. (1994). Microbial mediated formation of benzonaphthothiophenes from benzo-b-thiophenes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3624-3631

KROPP, K. G.; ANDERSSON, J.T.; FEDORAK, P.M. (1997). Bacterial transformations of 1,2,3,4-tetrahydrodibenzothiophene and dibenzothiophene. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3032-3042.

LABORDE, A.L.; GIBSON, D.T. (1977). Metabolism of dibenzothiophene by a *Beijerinckia* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 783-790.

LEE, M.K.; SENIUS, J.V.; GROSSMAN, M.J. (1995). Sulfur-specific microbial desulfurization of sterically hindered analogs of dibenzothiophene. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4362-4366.

LI, F.L.; XU, P.; MA, C.Q.; LUO, L.L.; WANG, X.S. (2003). Deep desulfurization of hydrodesulfurization-treated diesel oil by a facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium* sp. X7B. *FEMS Microbiol Lett* 142: 65–70

LINGUIST, L.; PACHECO, M. (1999). Enzyme-based diesel desulfurization process offers energy, CO₂ advantages. *Oil Gas J* 22:45–48.

LIZAMA, H. M., WILKINS, I. A.; SCOTT, T. C. (1995). Dibenzothiophene sulfur can serve as the sole electron acceptor during growth by sulfate-reducing bacteria. *Biotechnol. Lett.*, 17, 113-116

MAILA, M.P. (2002). Bioremediation through landfarming of a diesel contaminated site. Report prepared by Division of Water Environment & Forestry Technology, CSIR, Pretoria, SA, Report No. *ENV-P-C*. 2002-055.

MAILA, M.P.; CLOETE, T.E. (2004). Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: Are simplicity and cost – effectiveness the only advantages? *Reviews in Environmental Science and Bio/ Technology*. 3: 349 – 360.

MALIK, K.A. (1978). Microbial removal of organic sulfur from crude oil and the environment: some new perspectives. *Process Biochem.* 13: 10-12.

MALINA, G.; GROTENHUIS, J.T.C.; RULKENS, W.H. (2002). Vapour extraction/bioventing sequential treatment of soil contaminated with volatile and semivolatile hydrocarbon mixtures. *Bioremed. J.* 6: 159–176.

MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINNER, F. (1999). Soil Lipase activity – a useful indicator of oil biodegradation. *Biotechnol. Tech.* 13: 859–863.

MARGESIN, R.; LABBÉ, D.; SCHINNER, F.; GREER, C. W.; WHYTE, L. G. (2003). Characterization of Hydrocarbon-Degrading Microbial Populations in Contaminated and Pristine Alpine Soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 3085-3092.

MARIJKE, M.A.;VAN VLERKEN, F. (1998). Chances for biological techniques in sediment remediation. *Wat. Sci. Tech.* 37(6–7): 345–353.

MIQUELETTO, P. B. (2007). Isolamento e caracterização de estirpes bacterianas com capacidade de degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, presentes em amostras de solo contaminadas com petróleo. Monografia de conclusão de curso. *Universidade Federal de Ouro Preto.*, 51p.

MOHEBALI, G.; BALL, A.S.; RASEKH, B.; KAYTASH, A. (2007). Biodesulfurization potential of a newly isolated bacterium, *Gordonia alkanivorans* RIPI90A. *Enzyme and Microbial Technology.*40: 578 – 584.

MONTICELLO, D.J.; FINNERTY, W.R. (1985). Microbial desulfurization of fossil fuels. *Ann. Ver. Microbiol.* 39: 371-389.

MONTICELLO, D. J. 1998. Riding the fossil fuel biodesulfurization wave. *Chemtech.*, 28: 38-45.

MORGAN, P.; WATKINSON, R.J. (1989). Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment, *CRC Critic. Rev. Biotechnol.* 8(4): 305–332.

NAKATANI, S.; AKASAKI, T.; KODAMA, K.; MINODA, Y.; YAMADA, K. (1968). Microbial conversion of petro-sulfur compounds. Part II. Culture conditions of dibenzothiophene-utilizing bacteria. *Agric. Bioi. Chem.*, 32,1205-1211.

NEKODZUKA, S.; TOSHIKI, N.; NAKAJIMA-KAMBE, T.; NOBURA, N.; LU, J.; NAKAHARA, Y. (1997). Specific desulfurization of dibenzothiophene by *Mycobacterium* strain G3. *Biocatal Biotransform* 15:21-27.

OHSHIRO, T.; HINE, Y.; IZUMI, Y. (1994). Enzymatic desulfurization of dibenzothiophene by a cell free system of *Rhodococcus erythropolis* D-1. *FEMS Microbiol Lett* 118: 341–344.

OHSHIRO, T.; HIRATA, T.; IZUMI, Y. (1995). Microbial desulfurization of dibenzothiophene in the presence of hydrocarbon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 249-252.

OHSHIRO T.; IZUMI Y. (1999). Microbial desulfurization of organic sulfur compounds in petroleum. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 63:1-9.

OMORI, T.; MONNA, L.; SAIKI, Y.; KODAMA, T. (1992). Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. Strain SY1. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 911-915.

OMORI, T.; MONNA, L.; SAIKI, Y.; KODAMA, T. (1992). Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. Strain SY1. *Appl Environ Microbiol.* 58:911–5.

ORR, W.L. (1978). Oil sand and oil shale chemistry. Chemie, New York.

PATT, T.E.; COLE, G.C.; HANSON, R.S. (1976). *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *International journal of systematic bacteriology.* 26: 226-229.

PICADO, A.; NOGUEIRA, A.; BAETA-HALL, L.; MENDONÇA, E.; DE FÁTIMA RODRIGUES, M.; DO CÉU SÁÁGUA, M.; MARTINS, A.; ANSELMO, A.M. (2001). Landfarming in a PAH contaminated soil. *J. Environ. Sci. Health.* A36(9): 1579–1588.

POPE, D.F.; MATHEWS, J.E. (1993). Environmental regulations and technology: Bioremediation using land treatment concept. Ada, OK: US EPA, *Environmental Research Laboratory*. EPA/600/R-93/164.

PRESCOTT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. (1996). Microbiology; 3th ed.; Wm C. Brown Publishers, U.S.A.

PURDY, R.F.; LEPO, J.E.; WARD, B. (1993). Biodesulfurization of organic-sulfur compounds. *Curr Microbiol.* 27:219–22.

RHEE, S.K.; CHANG, J.H.; CHANG, H.N. (1998). Desulfurization of dibenzothiophene and diesel oils by a newly isolated *Gordonia* strain, CYKS1. *Appl Environ Microbiol.* 64:2327–31.

RUBINOS, D.A.; VILLASUSO, R.; MUNIATEGUI, S.; BARRAL, M.T.; FIERROS, F.D. (2007). Using the Landfarming Technique to Remediate Soils Contaminated with Hexachlorocyclohexane Isomers. *Water Air Soil Pollut.* 181: 385 – 399.

SATO, H.; CLARK, D. P. (1995). Degradation of dibenzothiophene sulphoxide and sulphone by *Arthrobacter* strain DBTS2. *Microbios*, 83, 145-159 (1995). Sato, H. and Clark, D. P., Degradation of dibenzothiophene sulphoxide and sulphone by *Arthrobacter* strain DBTS2. *Microbios*, 83, 145-159.

SCHMIDT, M.; SIEBERT, W.; BAGNALL, K.W. (1973). “The chemistry of sulphur, selenium, tellurium and polonium” Pergamon Texts in Inorganic Chemistry, vol.15, Pergamon Press, Oxford.

SETTI, L.; ROSSI, M.; LANZARINI, G.; PIFFERI, P.G. (1993). Barrier and carrier effects of n-dodecane on the anaerobic degradation of benzothiophene by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biotech. Lett.* 15: 527-530.

SPEIGHT, J.G.(1980). The chemistry and technology of petroleum. Dekker, New York.

Speight, J.G. (1981). The desulfurization of heavy oils and residua. Dekker, New York

STOCCO, P.; DOS SANTOS, J. C. P.; VARGAS, V.P.; HUNGRIA, M. 2008. Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiossantes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. R. Bras. Ci. Solo, 32: 1107-1120.

TANAKA, Y.; MATSUI, T.; KONISHI, J.; MARUHASHI, K.; KURANE, R. (2002). Biotransformation of benzothiophene and dibenzothiophene by a newly isolated *Rhodococcus* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 325-328

THANGARAJ, K.; KAPLEY, A.; PUROHIT, H.J. (2007). Characterization of diverse *Acinetobacter* isolates for utilization of multiple aromatic compounds. *Bioresour. Technol.* 99, 2488–2494.

VAN AFFERDEN, M.; SCHACHT, S.; KLEIN, J.; TRÜPER, H.G. (1990). Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium* sp. DO. *Arch. Microbiol.* 153:324-328.

VAN AFFERDEN, M.; TAPPE, D.; BEYER, M.; TRÜPER, H.G.; KLEIN, J. (1993). Biochemical mechanisms for the desulfurization of coal-relevant organic sulfur compounds. *Fuel.* 72: 1635-1643.

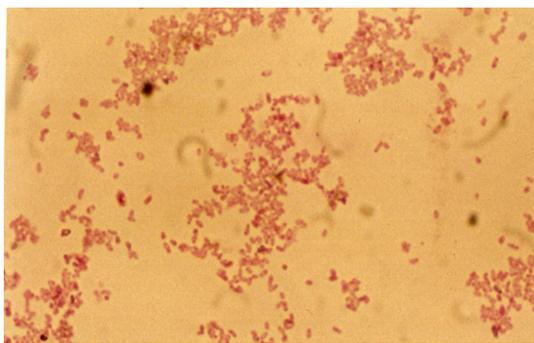
VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Molecul Biol Rev.* 67:503–49.

WANG, P.; KRAWIEC, S. (1994). Desulfurization of dibenzothiophene to 2-hydroxybiphenyl by some newly isolated bacterial strains. *Arch Microbio.*, 161:266– 271.

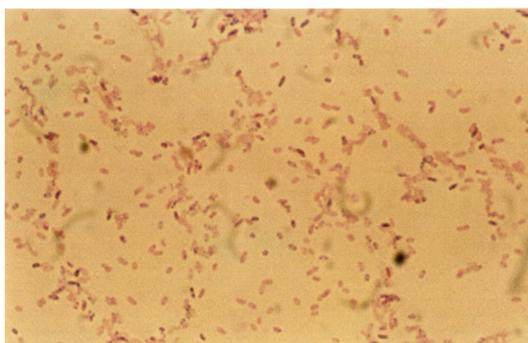
YAMADA, K.; MINODA, Y.; KODAMA, K.; NAKATANI, S.; AKASAKI, T. (1968). Microbial conversion of petro-sulfur compounds. Part 1. Isolation and identification of dibenzothiophene-utilizing bacteria. *Agric. BioI. Chern.*, 32, 840-845

ANEXO

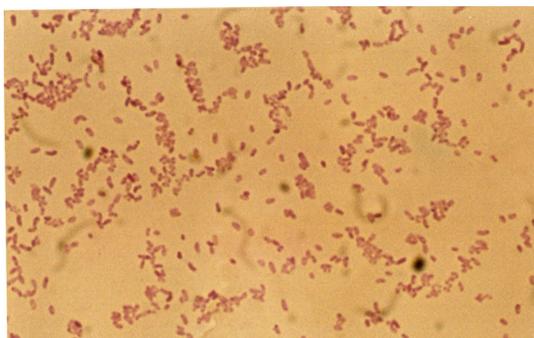
Lâminas de coloração diferencial de Gram



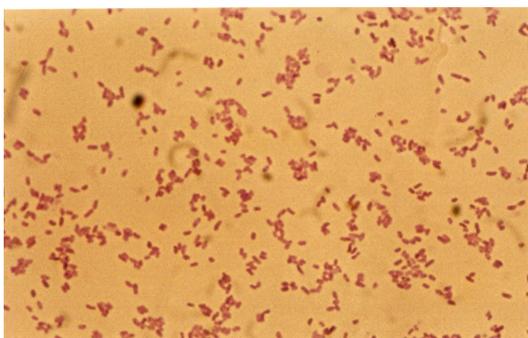
Amostra: I- 1



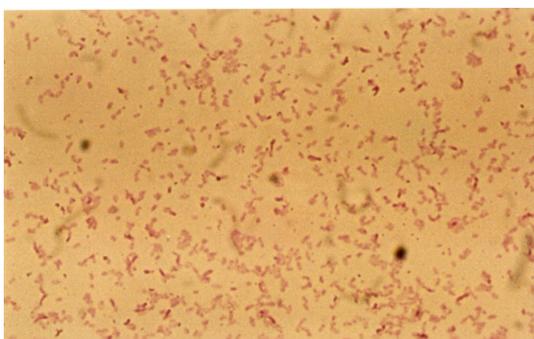
Amostra: I- 2



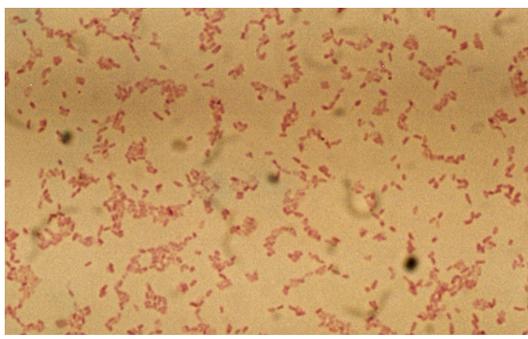
Amostra: I- 3



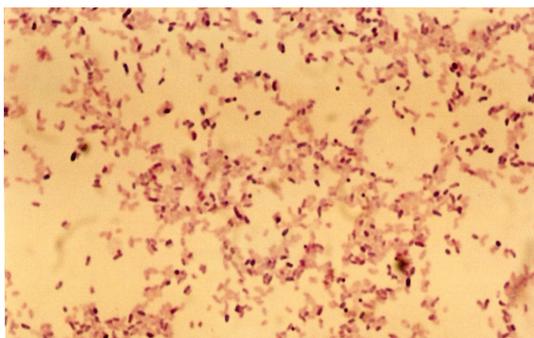
Amostra: I- 5



Amostra: I- 7



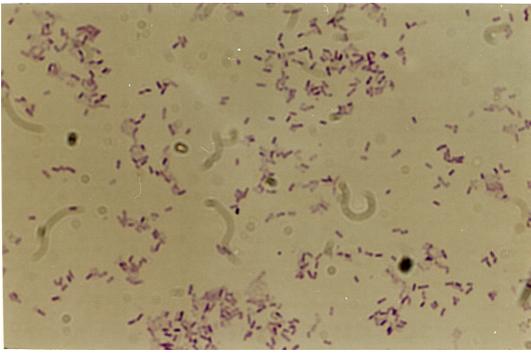
Amostra: I- 8



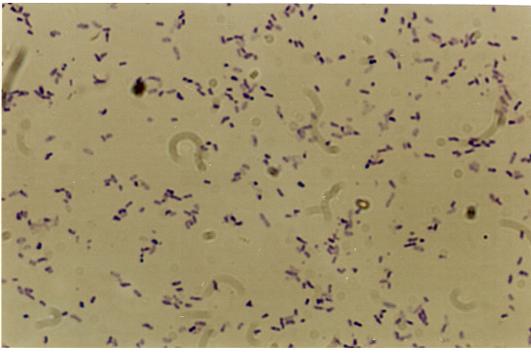
Amostra: I- 9



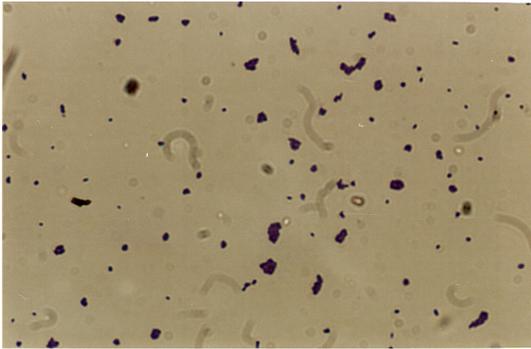
Amostra: I- 10



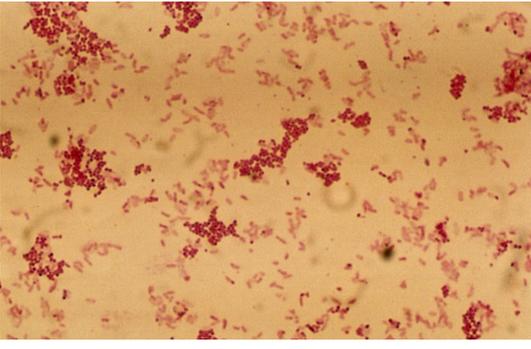
Amostra: I- 11



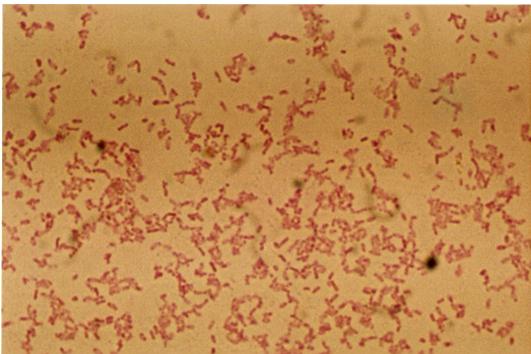
Amostra: I - 12



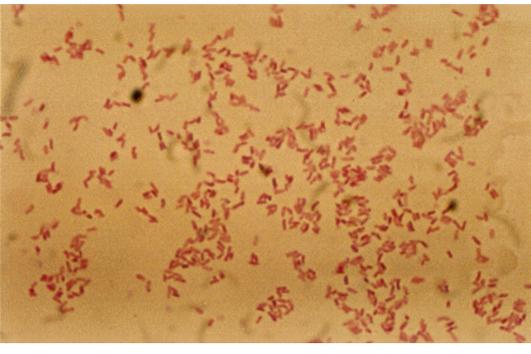
Amostra: I- 13



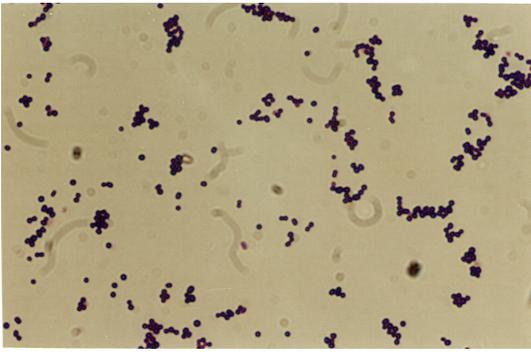
Amostra: I- 14



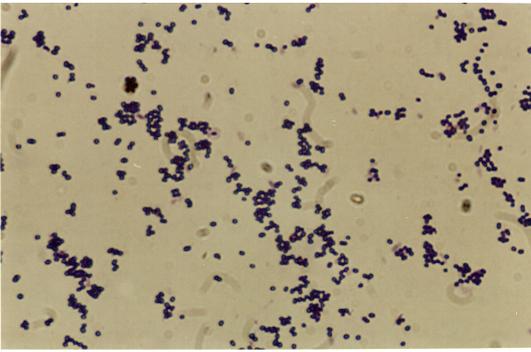
Amostra: I- 15



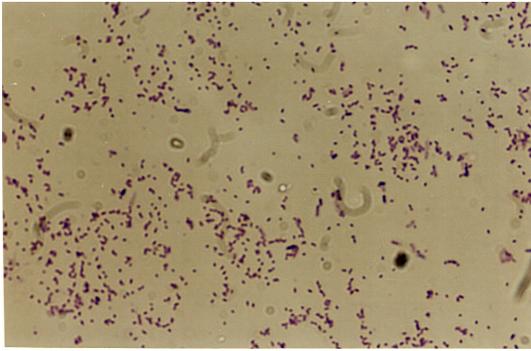
Amostra: I- 16



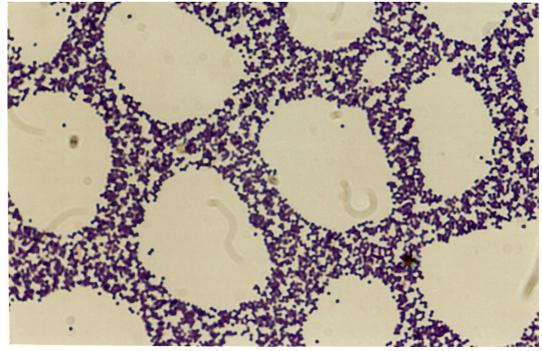
Amostra: II- 17



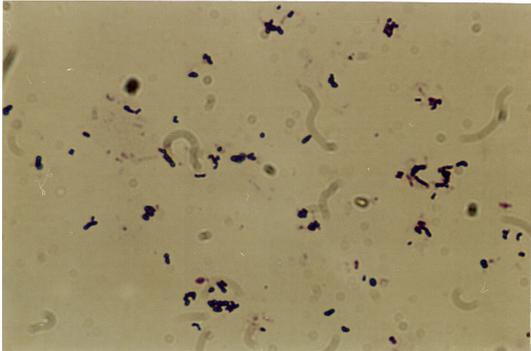
Amostra: II- 18



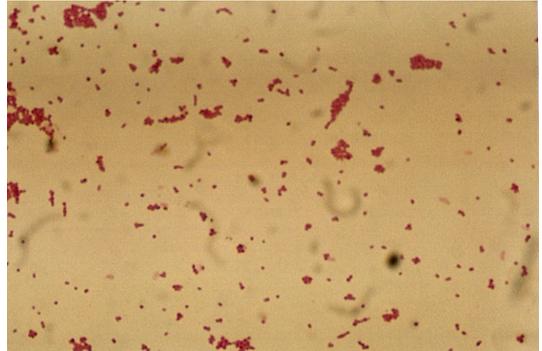
Amostra: II- 20



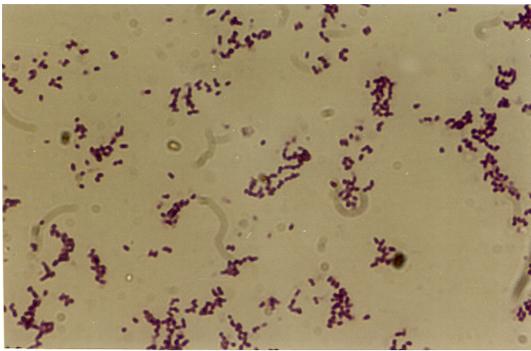
Amostra: III- 24



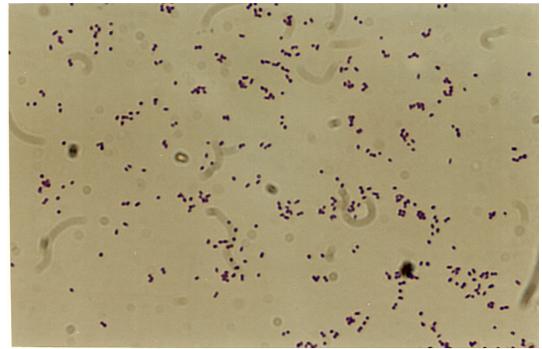
Amostra: III- 25



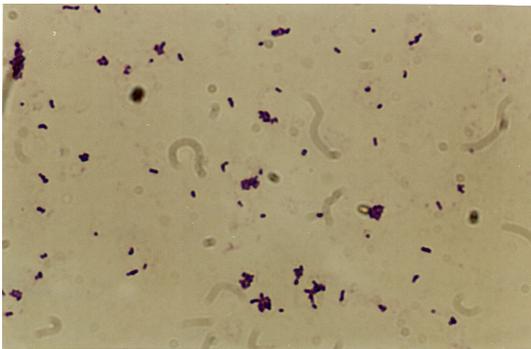
Amostra: III- 26



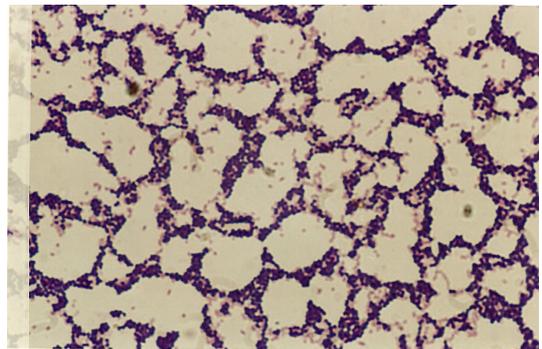
Amostra: III- 27



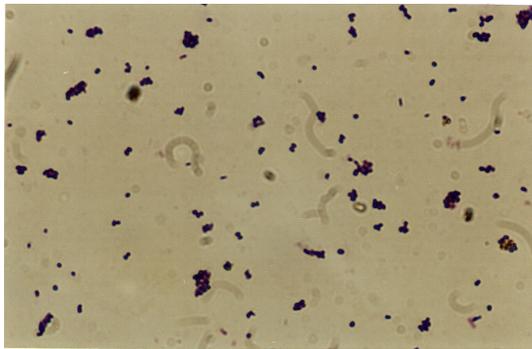
Amostra: III- 28



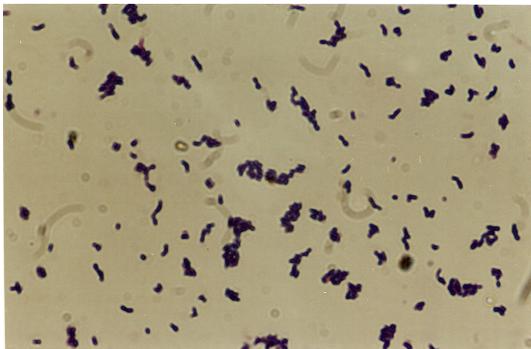
Amostra: III- 30



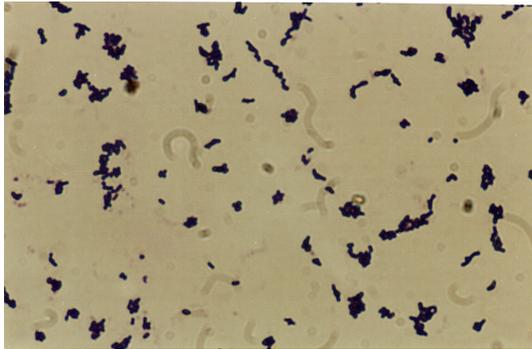
Amostra: III- 31



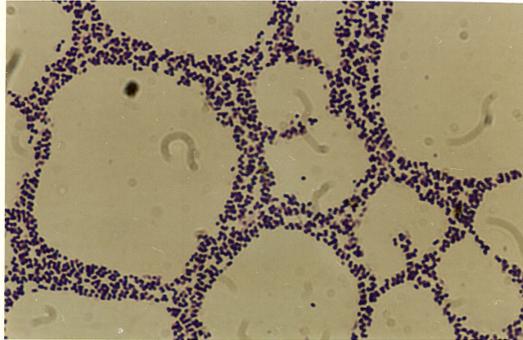
Amostra: III- 32



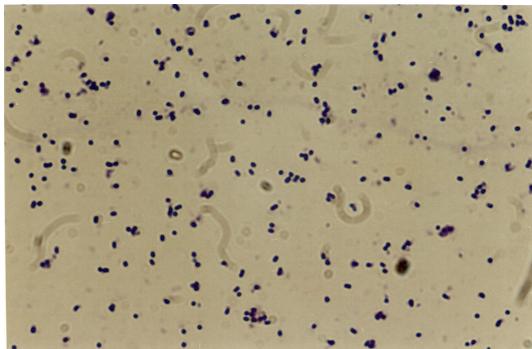
Amostra: III- 33



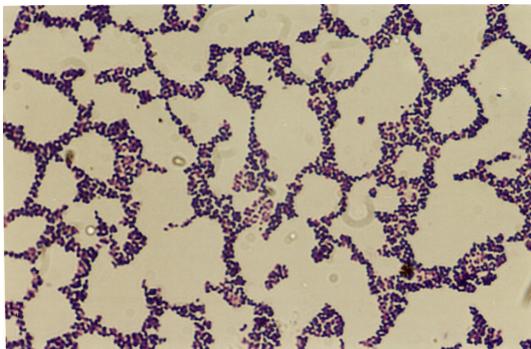
Amostra: III- 35



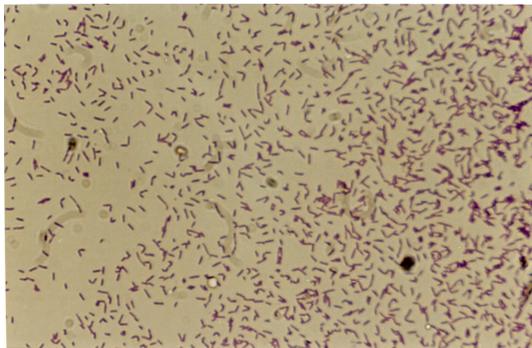
Amostra: IV - 37



Amostra: V- 43



Amostra: VI- 46



Amostra: VI- 49

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)