



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

**Douglas Boniek Silva Navarro**

**BIOPROSPECÇÃO DE ESTIRPES BACTERIANAS COM  
CAPACIDADE DE DESSULFURIZAÇÃO EM AMOSTRAS DE SOLO  
E SEDIMENTOS DO CONTINENTE ANTÁRTICO**

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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gabriela Frois Duarte

Ouro Preto, MG

2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**N322b**      **Navarro, Douglas Boniek Silva.**

Bioprospecção de estirpes bacterianas com capacidade de dessulfurização em amostras de solo e sedimentos do Continente Antártico [manuscrito] /

Douglas Boniek Silva Navarro - 2010.

xx, 101f. : il., color; graf.; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Frois Duarte.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.  
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Mestrado em Engenharia Ambiental.

Área de concentração: Saneamento Ambiental.

1. Continentes - Teses. 2. Dessulfurização - Teses. 3. Solos - Teses.  
4. Sedimentos - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 66.094.522.091.8(9)

Catálogo: [sisbin@sisbin.ufop.br](mailto:sisbin@sisbin.ufop.br)

*“A verdadeira viagem ao conhecimento não consiste em buscar novas paisagens, mas sim em ter novos olhos”*

*Marcel Proust*

*Aos verdadeiros amigos que fizeram parte  
desta história e que tornaram possível  
a realização deste trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

A mãe *Goretti* e a minha irmã *Tatiana* por sempre terem me apoiado nas minhas decisões.

Aos meus familiares por sempre se preocuparem em meu bem estar em Ouro Preto. Obrigado *Julinha, Cássia e Helenita*.

A *Dra. Gabriela Duarte* pela sua orientação neste trabalho.

Ao *Dr. Alexandre Rosado* por ter cedido amostras de solo do Continente Antártico e pelos dados de coleta, proporcionando o início deste trabalho.

A *Dra. Silvana Queiroz* pela presença, por ter acompanhado o meu crescimento desde a graduação e pela pessoa que você demonstrou ser. Muito obrigado!

A *Dra. Raquel Peixoto* (LEMM) por ter sido responsável pela realização da técnica do sequenciamento do DNA dos isolados, e por sempre estar disposta a somar com os seus valiosos conselhos.

Ao *Dr. Sérgio Aquino* pelo apoio concedido.

Ao *Dr. Hermínio Nalini* por disponibilizar o seu laboratório para que as análises químicas de solo e sedimentos fossem realizadas.

Aos técnicos do laboratório *Regina, Marly e Luís* por todo apoio e por tornar os nossos dias de trabalho mais agradáveis.

As amigas *Débora e Camila* pelo apoio, pela companhia nos momentos trágicos e ao mesmo tempo engraçados. Obrigado por tudo aquilo que vocês representaram para mim durante o nosso tempo de convivência. Temos muitas histórias para rirmos durante décadas... Somos vencedores!

A secretária *Fernanda*, que chegou junto comigo no PROAGUA, e desde então sempre esteve disposta a nos ajudar da melhor forma possível. Obrigado pelo carinho e atenção!

Aos amigos de pós-graduação: *Paloma, Darllan, Betânia, Marco Paulo, Rafael, Henrique, Flávia, David e Mari* pela ajuda e pelos momentos divertidos durante os intervalos das aulas.

A japonesa *Bruna Bannoki* pela amizade e paciência em me ajudar com os temidos cálculos de físico-química.

As eternas biólogas que sempre me incentivaram a me aventurar neste mundo acadêmico e pela torcida para que eu me tornasse um mestrando: *Lilian, Jaqueline, Sueli, Sílvia, Luciana, Érika, Vívian!*

A *Sonaly* pela convivência durante o nosso tempo de mestrado, pelas histórias engraçadas com os moradores estranhos que surgiram neste intervalo, pelo apoio psicológico necessário para quem vive no stress deste mundo acadêmico e pela companhia nos momentos calóricos durante os lanches. Valeu!

A conterrânea *Débora Cristiane* pela divertida convivência, principalmente depois que se decidiu aventurar na microbiologia.

Aos colegas do laboratório de microbiologia pela convivência e pelas divertidas viagens aos congressos no nordeste: *Carol Loque, Iara, Mari, Laura, Francisco, Victor Lagôa, Zabelê, Heloísa, Cérebro, Keici, Rose, Palitin, Jorge, Leo, Fernanda e Ivan.*

Aos colegas de outros laboratórios que sempre estiveram dispostos a ajudar. Obrigado *Lívia, Bruna, Carlúcio Thaísa e Adriana.*

A UFOP, pela concessão da bolsa de mestrado.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xv
LISTA DE NOTAÇÕES .....	xvii
RESUMO .....	xx
ABSTRACT .....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Relevância e Justificativa .....	1
1.2. O Continente Antártico.....	2
1.3. A presença das gramíneas <i>Deschampsia antarctica</i> e <i>Colobanthus quitensis</i> no Continente Antártico .....	5
2. OBJETIVOS.....	7
2.1. Objetivo Geral .....	7
2.2. Objetivos Específicos .....	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	8
3.1. Problemática ambiental da queima de combustíveis fósseis .....	8
3.2. Métodos de dessulfurização .....	9
3.3. Hidrodessulfurização .....	9
3.4. Dessulfurização por líquidos iônicos.....	10
3.5. Biodessulfurização.....	11
3.6. Biodessulfurização degradativa.....	11
3.7. Biodessulfurização anaeróbia .....	13
3.8. Via específica de biodessulfurização.....	13
3.9. Microbiologia do gênero <i>Rhodococcus</i> .....	16
3.10. Biologia molecular da dessulfurização específica.....	16
3.11. Pesquisas sobre o melhoramento da via específica de dessulfurização .....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1. Delineamento experimental.....	20
4.2. Coleta das amostras .....	22
4.3. Isolamento das bactérias e condições de cultivo .....	25
4.4. Caracterização dos isolados.....	26
4.4.1. Caracterização fenotípica .....	26

4.4.2. Caracterização bioquímica .....	27
4.4.3. Caracterização metabólica: observação da perda da capacidade de utilização do DBT como fonte de enxofre, após sucessivas passagens em meio rico TSB.....	27
4.5. Ensaio de Gibb's (Teste Confirmativo).....	28
4.6. Curva de crescimento dos isolados selecionados .....	28
4.7. Curva de quantificação da produção do 2-HBP .....	30
4.8. Curva-padrão do 2-HBP .....	30
4.9. Análise química das amostras de solo e sedimentos .....	32
4.10. Caracterização genotípica.....	33
4.10.1. Extração de DNA de culturas puras .....	33
4.10.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) das culturas puras .....	33
4.10.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) do tipo BOX .....	34
4.10.5. Sequenciamento do DNA .....	36
4.10.6. Análise filogenética .....	37
5. RESULTADOS .....	38
5.1. Enumeração das populações bacterianas isoladas das amostras coletadas no Continente Antártico .....	38
5.2. Caracterização fenotípica .....	39
5.3. Caracterização bioquímica e metabólica .....	42
5.4. Ensaio de Gibb's.....	45
5.5. Curva de crescimento dos isolados selecionados .....	46
5.5. Cálculo do tempo de geração (g) do isolado A8-2.....	52
5.6. Análise quantitativa do teor do metal enxofre presente nas amostras de solo e sedimentos .....	54
5.7. Curvas de quantificação da produção do 2-HBP pelos isolados em função do seu crescimento.....	55
5.8. Caracterização Genotípica.....	60
5.8.1. Amplificação de fragmento do DNAr 16S .....	60
5.8.2. Amplificação de sequência genômica repetitiva BOX.....	61
5.8.3. Análise de similaridade dos perfis genômicos dos isolados.....	61
5.8.4. Purificação e quantificação do produto de PCR - DNAr 16S .....	62
5.8.5. Sequenciamento do DNA dos isolados selecionados .....	63
5.8.6. Análise Filogenética .....	64
6. DISCUSSÃO .....	67

7. CONCLUSÃO.....	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76
9. ANEXOS.....	88

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1:** Atividades desenvolvidas no continente Antártico que requerem o uso de combustíveis fósseis: transporte de combustíveis dos navios, tanques de estocagem nas bases, transporte por helicópteros.....4
- Figura 3.1:** Via de degradação do DBT, Via de Kodama, com a clivagem da ligação carbono-carbono (Gupta *et al.*, 2005).....12
- Figura 3.2:** Via de dessulfurização “4S” – Nesta via, o enxofre é removido na forma de sulfato, permanecendo intacta a estrutura carbonada (Gupta *et al.*, 2005).....14
- Figura 4.1:** Fluxograma evidenciando o delineamento experimental na fase do desenvolvimento metodológico adotado.....21
- Figura 4.2:** Imagem a esquerda representa a Baía do Almirantado, inserida da Ilha Rei Jorge, no Continente Antártico. Imagem a direita ampliada, representa a Pensínsula Keller, e as respectivas regiões de ponto de coletas: Ipanema, Punta Plaza e Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF). *Fonte: Google Earth (acesso em 10/02/2010)*.....24
- Figura 4.3:** Imagem da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) mostrando os pontos de amostragem de solo 6, 7 e 3, representando as amostras 19, 20 e 21, respectivamente. Estas amostras coletadas no ano de 2009 estão contaminadas com hidrocarbonetos totais de petróleo e situam-se próximas aos tanques de armazenagem de combustíveis (*Foto: Rosado, 2009*).....25
- Figura 4.4:** Curva padrão construída para a quantificação em ppm do 2-HBP formado a partir dos dados obtidos pela leitura da absorbância a 610nm.....32
- Figura 5.1:** Teste metabólico dos isolados A3-14, A3-15, A3-16, A3-17, A6-6, A6-7, A6-8, A6-9, A7-11, A7-13 em caldo BSM suplementado com DBT verificando a possível perda da capacidade de dessulfurização, após serem submetidos a sucessivas passagens em meio rico (TSB).....41

**Figura 5.2:** Teste metabólico dos isolados A8-4, A11-2, A11-3, A11-4, A12-1, A12-3, A12-4, A13-1 em caldo BSM suplementado com DBT verificando a possível perda da capacidade de dessulfurização, após serem submetidos a sucessivas passagens em meio rico (TSB).....42

**Figura 5.3:** Teste metabólico dos isolados A13-2, A13-5, A14-1, A14-4, A14-6, A15-1, A15-2, A15-2 em caldo BSM suplementado com DBT verificando a possível perda da capacidade de dessulfurização, após serem submetidos a sucessivas passagens em meio rico (TSB).....42

**Figura 5.4:** Teste metabólico dos isolados A19-1, A19-2, A20-1, A20-2, A20-3, A20-4, A20-5, A21-1, A21-2, A21-3 em caldo BSM suplementado com DBT verificando a possível perda da capacidade de dessulfurização, após serem submetidos a sucessivas passagens em meio rico (TSB).....43

**Figura 5.5:** Teste metabólico dos isolados A7-10, A7-12, A8-1, A8-2, A8-3, A11-1, A13-3, A13-4, A14-3, A14-5, A18-1 em caldo BSM suplementado com DBT verificando a possível perda da capacidade de dessulfurização, após serem submetidos a sucessivas passagens em meio rico (TSB).....44

**Figura 5.6:** Resultado positivo para o “Ensaio de Gibb’s” aos quais os sete isolados (A7-10, A8-1, A8-2, A11-1, A13-4, A14-3, A14-5) e o controle negativo foram submetidos, evidenciando a formação do 2-HBP (produto da via metabólica específica de dessulfurização) através da coloração azul formada após o tempo de 30 minutos de incubação, a uma temperatura de 30°C.....45

**Figura 5.7:** Curva de crescimento do isolado A7-12 em caldo BSM suplementado com DBT. As medidas de densidade óptica a 600nm (luz visível) foram realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo de 60 horas.....47

**Figura 5.8:** Curva de crescimento do isolado A8-1 em caldo BSM suplementado com DBT. As medidas de densidade óptica a 600nm (luz visível) foram realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo de 60 horas.....47

<b>Figura 5.9:</b> Curva de crescimento do isolado A11-1 em caldo BSM suplementado com DBT. As medidas de densidade óptica a 600nm (luz visível) foram realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo de 60 horas.....	48
<b>Figura 5.10:</b> Curva de crescimento do isolado A13-4 em caldo BSM suplementado com DBT. As medidas de densidade óptica a 600nm (luz visível) foram realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo de 60 horas.....	49
<b>Figura 5.11:</b> Curva de crescimento do isolado A14-3 em caldo BSM suplementado com DBT. As medidas de densidade óptica a 600nm (luz visível) foram realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo de 60 horas.....	49
<b>Figura 5.12:</b> Curva de crescimento do isolado A14-5 em caldo BSM+ DBT. As medidas de densidade óptica a 600nm (luz visível) foram realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo de 60 horas.....	50
<b>Figura 5.13:</b> Curva de crescimento do isolado A8-2, baseado no cultivo de células viáveis, evidenciando as fases do crescimento microbiano.....	52
<b>Figura 5.14:</b> Curva de crescimento e curva de produção do 2-HBP do isolado A7-12, em caldo BSM suplementado com DBT e em caldo BSM suplementado com DBT e o Reagente de Gibb's, respectivamente. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro a 600nm e 610nm respectivamente, em intervalos de tempo de 4 horas.....	56
<b>Figura 5.15:</b> Curva de crescimento e curva de produção do 2-HBP do isolado A8-1, em caldo BSM suplementado com DBT e em caldo BSM suplementado com DBT e o Reagente de Gibb's, respectivamente. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro a 600nm e 610nm respectivamente, em intervalos de tempo de 4 horas.....	57
<b>Figura 5.16:</b> Curva de crescimento e curva de produção do 2-HBP do isolado A8-2, em caldo BSM suplementado com DBT e em caldo BSM suplementado com DBT e o Reagente de Gibb's, respectivamente. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro a 600nm e 610nm respectivamente, em intervalos de tempo de 2 horas.....	57

**Figura 5.17:** Curva de crescimento e curva de produção do 2-HBP do isolado A11-1, em caldo BSM suplementado com DBT e em caldo BSM suplementado com DBT e o Reagente de Gibb's, respectivamente. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro a 600nm e 610nm respectivamente, em intervalos de tempo de 4 horas.....58

**Figura 5.18:** Curva de crescimento e curva de produção do 2-HBP do isolado A13-4, em caldo BSM suplementado com DBT e em caldo BSM suplementado com DBT e o Reagente de Gibb's, respectivamente. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro a 600nm e 610nm respectivamente, em intervalos de tempo de 4 horas.....58

**Figura 5.19:** Curva de crescimento e curva de produção do 2-HBP do isolado A7-12, em caldo BSM suplementado com DBT e em caldo BSM suplementado com DBT e o Reagente de Gibb's, respectivamente. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro a 600nm e 610nm respectivamente, em intervalos de tempo de 4 horas.....59

**Figura 5.20:** Curva de crescimento e curva de produção do 2-HBP do isolado A14-5, em caldo BSM suplementado com DBT e em caldo BSM suplementado com DBT e o Reagente de Gibb's, respectivamente. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro a 600nm e 610nm respectivamente, em intervalos de tempo de 4 horas.....59

**Figura 5.21:** Eletroforese em gel de agarose (1% p/v) evidenciando os produtos de PCR com 1500pb amplificados com iniciadores para o DNAr 16S dos isolados. Canaletas: **1**, Marcador Molecular; **2**, Branco; **3**, Isolado A7-12 ; **4**, Isolado A8-1; **5**, Isolado A8-2 ; **6**, Isolado A11-1; **7**, Isolado A13-4; **8**, Isolado A14-3; **9**, Isolado A14-5.....60

**Figura 5.22:** Eletroforese em gel de acrilamida (6% p/v) evidenciando os padrões de diversidade genômica obtidos através de experimentos de PCR com iniciadores repetitivos BOX. Canaletas: **1**, Marcador Molecular; **2**, Isolado A7-12 ; **3**, Isolado A8-1; **4**, Isolado A8-2 ; **5**, Isolado A11-1; **6**, Isolado A13-4; **7**, Isolado A14-3; **8**, Isolado A14-5.....61

**Figura 5.23:** Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, baseado na matriz de similaridade de DICE.....62

**Figura 5.24:** Árvore filogenética construída pelo método de Máxima Parsimônia.....65

**Figura 5.25:** Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor-Joining.....66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1:</b> Enumeração, descrição da origem, localização e data de coleta das amostras coletadas no Continente Antártico.....	21
<b>Tabela 4.2:</b> Tempo decorrido (dias e horas) do ensaio para construção das curvas de crescimento em função dos grupos de inóculos G1 e G2.....	27
<b>Tabela 4.3:</b> Equivalência das concentrações conhecidas do 2-HBP com a absorbância obtida em espectrofotômetro a 610nm.....	29
<b>Tabela 4.4:</b> Reagentes utilizados para a preparação da mistura de reação da PCR para a amplificação do gene DNAr 16S.....	32
<b>Tabela 4.5:</b> Reagentes utilizados para a preparação da mistura de reação da PCR, para a amplificação das seqüências repetitivas do tipo BOX contidas no genoma.....	33
<b>Tabela 5.1:</b> Enumeração de populações bacterianas isoladas das amostras de solo e sedimentos do Continente Antártico.....	38
<b>Tabela 5.2:</b> Resultados de coloração de Gram, descrição morfológica e arranjo colonial e presença de inclusões de enxofre dos isolados a partir das amostras de solo e sedimento do Continente Antártico.....	39/40
<b>Tabela 5.3:</b> Conversão dos valores de absorbância em ppm obtidos dos isolados após 60 horas de seu crescimento.....	46
<b>Tabela 5.4:</b> Estimativa das células viáveis do isolado bacteriano A8-2 em intervalos de plaqueamento de 2 horas, a partir do tempo de 12 horas após a inoculação em caldo BSM suplementado com DBT.....	51
<b>Tabela 5.5:</b> Análise quantitativa do metal enxofre (mg/Kg) nos solos coletados no Continente Antártico, através de análise feita em ICP/AES.....	54

**Tabela 5.6:** Concentração de HPT's em três pontos e profundidades do solo da área onde se localizam os tanques de armazenamento de combustível da EACF.....55

**Tabela 5.7:** Quantificação em ng/ $\mu$ L do DNA amplificado pela reação de PCR e purificado, através do uso do espectrofotômetro Nanovue (GE).....63

## LISTA DE NOTAÇÕES

2-HBP – 2-hidroxibifenil

BDS – Biodessulfurização

BSA – Soro Albumina Bovina

BSM – “Basic Salt Medium”

D.O. – Densidade Óptica

DBT – Dibenzotiofeno

DBTO – Dibenzotiofeno sulfóxido

DBTO<sub>2</sub> – Dibenzotiofeno sulfona

DEGEO – Departamento de Geologia

DNAr 16S – Ácido Desoxirribonucléico da porção 16S ribossomal

dNTP – Desoxirribonucleotídeo

EACF – Estação Antártica Comandante Ferraz

ECB – “Energy Biosystems Corporation”

EPA – Agência de Proteção Ambiental Americana (USA)

FMN – Flavina Mononucleotídeo oxidado

FMNH<sub>2</sub> – Flavina Mononucleotídeo reduzido

HBPS – 2-hidroxibifenil-2-sulfinato

HDS – Hidrodessulfurização

HTP's – Hidrocarbonetos Totais do Petróleo

ICP/AES – Espectrômetro de Emissão Atômica Via Plasma

IGT – Instituto de Tecnologia de Gás

IL's – Líquidos Iônicos

IMPPG – Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes

LBEM – Laboratório de Biodiversidade e Ecologia Microbiana

LEMM – Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular

LGqA – Laboratório de Geoquímica Ambiental

MDa – Mega Dalton

NAD – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo oxidado

NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzido

NCBI – “National Center of Biotechnology Information”

NTG – 1 metil-3nitro-1nitrosoguanidina

pb – Pares de bases

p/v – peso por volume

PAH’s – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

PASH’s – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos contendo enxofre

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial Hidrogeniônico

PPM – Partes Por Milhão

Psi – Libra por polegada quadrada

RFLP – “Restriction Fragment Length Polymorphism”

RNAr16S - Ácido Ribonucléico da porção 16S ribossomal

RPM – Rotações por Minuto

SO<sub>2</sub> – Dióxido de enxofre

*sox/dsz* – Genes envolvidos na biodessulfurização

TAE – Solução Tampão com Tris-Acetato-EDTA

*Taq* – *Termophilus aquaticus* (*Taq* DNA polimerase)

TBE – Solução tampão com Tris-Borato-EDTA

TSA – “Trypticase Soy Agar”

TSB – “Trypticase Soy Broth”

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

UPGMA - “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean”

USP – Universidade de São Paulo

UV – Ultra-Violeta

v/v – volume por volume

## RESUMO

A presença natural do enxofre no meio ambiente e nos combustíveis fósseis justifica a ocorrência tanto de espécies bacterianas, quanto de genes específicos, associados ao processo de biodessulfurização. Esta tecnologia, baseada no metabolismo dos microrganismos, consiste na retirada do enxofre presente nas cadeias dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH's), visando minimizar as emissões de óxidos sulfurosos na atmosfera, no processo de refino, além de evitar a formação e precipitação da chuva ácida no meio ambiente. Este trabalho teve como objetivo investigar a presença dos microrganismos dessulfurizadores, a partir de amostras de solos rizosféricos e não-rizosféricos, contaminados com petróleo e não-contaminados e em solos oligotróficos coletadas no Continente Antártico. Para isso, foram obtidos isolados bacterianos os quais foram submetidos a testes de capacidade de dessulfurização, em função da formação do produto final do metabolismo microbiano, o 2-hidroxibifenil, evidenciando a cinética do processo de dessulfurização do dibenzotiofeno através de técnicas espectrofotométricas. Além disso, também foram utilizadas técnicas moleculares de extração de DNA, BOX-PCR e sequenciamento de DNA, no intuito de se obter um perfil genômico e filogenético da comunidade microbiana cultivável presente nestas amostras. Deste modo, foram obtidos 50 isolados com capacidade de utilizar o dibenzotiofeno como fonte energética, independente da rota metabólica, sendo que a maioria apresentou forma de cocos (68%) com coloração Gram-positiva (44%). Após a seleção dos isolados, através do ensaio de Gibb's, obteve-se 7 isolados com metabolismo de dessulfurização, sendo que a partir da curva de crescimento, em função da formação do 2-hidroxibifenil, verificou-se que uma estirpe possuía altos índices de dessulfurização, em relação aos demais isolados. O sequenciamento revelou que os 7 isolados pertencem aos gêneros *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., e à espécie *Pseudomonas corrugata*.

**Palavras-chave:** Continente Antártico, Biodessulfurização, DBT, Solo e Sedimentos.

## ABSTRACT

The presence of sulfur in the natural environment and fossil fuels justifies the occurrence of both bacterial species, and specific genes involved in the process of biodesulfurization. This technology, based on the metabolism of microorganisms, consists of removing the sulfur present in chains of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) to minimize emissions of sulfur oxides in the atmosphere, in the refining process, and prevent the formation and precipitation of acid rain in the environment. This work aimed to investigate the occurrence the microorganisms with desulfurization ability, from samples of soil rhizosphere and bulk soil contaminated with oil and non-contaminated and oligotrophic soils collected from the Antarctic Continent. For this reason was tested the growth of selected isolates with desulfurization capacity, due to the formation of the end product of microbial metabolism, 2-hydroxibiphenyl, showing the kinetics of the desulfurization process of dibenzothiophene by spectrophotometric techniques. In addition, molecular techniques were used for DNA extraction, BOX-PCR and DNA sequencing in order to obtain a profile of genomic and phylogenetic culturable microbial community present in these samples. Thus, was obtained 50 isolates with the ability to use dibenzothiophene as an energy source, most of which had the form of cocci (68%) with Gram-positive cell wall (44%). After the selection of isolates, by testing Gibb's, obtained a 7 isolates with desulfurization metabolism, and the growth curve, due to the formation of 2-hydroxybiphenyl showed only a strain with high levels of desulfurization, for other strains. The sequencing revealed that the 7 isolates belong to the genus *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., and the species *Pseudomonas corrugata*.

**Keywords:** *Antarctic Continent, Biodesulfurization, DBT, Soil and Sediments.*

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Relevância e Justificativa

O enxofre é considerado o terceiro elemento mais abundante nos combustíveis fósseis, petróleo e carvão, e estes podem apresentar uma grande variedade de compostos sulfurosos, seja na forma orgânica ou inorgânica. Diante disso, a combustão do petróleo rico em enxofre emite óxidos sulfurosos para a atmosfera resultando, portanto, na poluição do ar e na formação da chuva ácida.

De modo geral, a quantidade de enxofre do petróleo sem refino está em torno de 0,03-7,89% (p/v) (Shennan, 1996), mas dependendo da fração destilada utilizada para produzir os combustíveis comerciais, a concentração do enxofre pode aumentar em até 5.000ppm (Folsom *et al.*, 1999). Diante deste impasse ambiental e biotecnológico, foi desenvolvida uma tecnologia baseada na capacidade metabólica dos microrganismos que pudesse beneficiar as duas vertentes: a biodessulfurização.

A tecnologia de biodessulfurização do petróleo representa a oportunidade de minimizar o custo deste produto, uma vez que a retirada do enxofre usando métodos químicos e físicos é bastante onerosa. É considerada também uma solução para diminuir os problemas ambientais causados pela chuva ácida, além de outras implicações sobre a saúde humana que está relacionada com as emissões de óxidos sulfurosos na atmosfera (Ohshiro & Izumi, 1999).

Sendo assim, o processo de biodessulfurização consiste na utilização de microrganismos dotados de um aparato genético e enzimático especializado na remoção dos átomos de enxofre ligados à cadeia de hidrocarbonetos do petróleo, sem que ocorra a degradação do esqueleto de carbono da molécula, característica desejável no melhoramento do combustível, para que não ocorra queda da sua octanagem, ou seja, do seu valor energético (Monticello, 2000).

É de extrema importância biotecnológica a seleção de novas estirpes microbianas com a capacidade de dessulfurizar combustíveis fósseis, sem diminuição do valor energético dos mesmos e, que o faça, com taxas de dessulfurização e estabilidade em ambiente industrial o mais elevada possível. Apesar disso, somente nas duas últimas décadas verificou-se um aumento do interesse da comunidade científica em relação à

biodessulfurização, principalmente pelos norte-americanos e canadenses, sendo essa uma área de estudos ainda bastante recente.

Neste contexto, a possibilidade da exploração de um ambiente com características tão extremas e relativamente pouco exploradas, como o Continente Antártico, lançam perspectivas acerca da aquisição de novos microrganismos, produtos e processos biotecnológicos, que possam ser utilizados pela indústria petrolífera para que se implante novas tecnologias biológicas no melhoramento de combustíveis e produtos petrolíferos.

Apesar desta busca por novos microrganismos e novas rotas metabólicas para o processo de biodessulfurização, não é de interesse biotecnológico obter microrganismos com tal capacidade, mas que apresente crescimento psicrófilico, pois este fato pode atuar como um empecilho para a ocorrência deste processo em escala industrial, uma vez que os microrganismos com crescimento psicrófilico apresentam um metabolismo lento e, além disso, seria necessário o desenvolvimento de mecanismos que simulassem as condições de temperaturas antárticas. Assim, caberia selecionar e explorar o potencial de biodessulfurização de microrganismos psicrotolerantes e com uma alta capacidade metabólica à temperatura mesofílica, justamente por apresentar esta versatilidade em seu metabolismo de crescimento.

Desta forma, os microrganismos psicrotolerantes únicos e genotipicamente diferenciados, que podem conter novas vias metabólicas para o processamento de moléculas químicas, como o dibenzotiofeno (DBT), se tornaram alvos desse estudo para a descoberta de novas estirpes dessulfurizadoras presentes no continente Antártico.

## **1.2. O Continente Antártico**

A Antártica é uma das maiores regiões remanescentes no planeta, entretanto, no último século, as atividades humanas vêm influenciando de maneira crescente o ecossistema deste continente. É sabido que as principais atividades desenvolvidas no continente gelado ao sul do globo são as pesquisas científicas, o turismo e a pesca (Aislabie *et al.*, 2004).

O clima local está entre os fatores que mais condicionam o número e o tipo de microrganismos presentes no solo da Antártica. Além disso, as baixas temperaturas representam o fator de seleção da diversidade microbiana, sendo encontrados, em sua

grande maioria, microrganismos psicotolerantes e psicofílicos do domínio *Archaea* (Franzmann, 1996).

Uma vez que as regiões marinhas e livres de gelo são consideradas particularmente vulneráveis à contaminação acidental pelo óleo, as diversas formas de hidrocarbonetos presentes no petróleo constituem, potencialmente, as maiores fontes de poluição por estes compostos orgânicos nos solos e sedimentos antárticos.

A presença de contaminantes químicos de origem antropogênica representa um fator adicional de stress que afeta bruscamente a composição da microbiota presente no solo contaminado, e estas mudanças são observadas em solos e sedimentos das diferentes áreas do mundo e do continente Antártico (Aislabie *et al.*, 2001).

Apesar de existirem várias pesquisas acerca da contaminação por hidrocarbonetos nos ecossistemas marinhos da Antártica, pouco se sabe sobre o impacto da contaminação terrestre dessa região por PAH's. Os solos e sedimentos são facilmente passíveis de contaminação através de derrames acidentais de óleo, principalmente nas áreas próximas às estações científicas, onde são comuns a estocagem de combustível e o reabastecimento de aviões e veículos utilizados para o transporte de carga e pessoal, (Figura 1.1). Estas operações são de extrema importância, porém implicam em riscos ambientais (Cormack *et al.*, 2008).



**Figura 1.1:** Atividades desenvolvidas no continente Antártico que requerem o uso de combustíveis fósseis: transporte de combustíveis dos navios, tanques de estocagem nas bases, transporte por helicópteros.

Embora exista a possibilidade de contaminações acidentais na Antártica, e que a presença desses hidrocarbonetos representem um fator de pressão seletiva, favorecendo a comunidade microbiana presente nestes locais, há que se destacar também, que os microrganismos com capacidade de metabolizar os PAH's podem também ser encontrados em ambientes livres de contaminação, associados à rizosferas de gramíneas nativas, em solos oligotróficos, ou em ambientes próximos à fauna local.

Muitos pesquisadores concluíram que as comunidades microbianas encontradas em solos da Antártica são quantitativamente semelhantes à microbiota encontrada em outros solos de ambientes frios extremos. Em um estudo publicado por (Smith *et al.*, 2000), é evidenciada a presença de microrganismos pertencentes ao filo Actinobacteria (*Rhodococcus* sp., *Microsphaera* sp., *Blastococcus* sp., *Sporichthya* sp.), quando estes foram identificados por métodos dependentes de cultivo. Além disso, utilizando a mesma metodologia, foi observada a presença de membros do filo Firmicutes, como *Bacillus* spp. (Johnson *et al.*, 1978), *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, e *Agrobacterium* (Smith *et al.*, 2006).

(Aislabie *et al.*, 2006b), através de uma caracterização do DNA ribossomal 16S, utilizando a técnica de RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”), seguida de posterior sequenciamento destes amplicons, obteve os seguintes grupos microbianos presentes em uma região da Antártica conhecida como Ilha Vitória (77°S): Bacteroides, Actinobacteria, Proteobacteria, Acidobacteria, Firmicutes e Cyanobacteria.

### **1.3. A presença das gramíneas *Deschampsia antarctica* e *Colobanthus quitensis* no Continente Antártico**

A Antártica é um dos habitats naturais que apresenta condições extremas de temperatura em todo o mundo, especialmente para as plantas. Estas condições ambientais específicas têm restringido a composição de espécies nativas de angiospermas a apenas dois grupos *Deschampsia antarctica*, da família Poaceae e *Colobanthus quitensis*, da família Caryophyllaceae (Alberd *et al.*, 2002). Estas gramíneas crescem principalmente nas proximidades das colônias de pingüins e nos abrigos de grandes mamíferos, onde elas se dispõem em grupos fechados maiores ou menores (Smith, 2003). *D. antarctica* e *C. quitensis* também são comumente encontradas em regiões da Argentina e do Chile, e devido à sua relativa ampla distribuição ecológica, estes dois grupos de plantas vasculares têm sido objeto de estudos em muitas áreas da biologia: ecologia, taxonomia, fisiologia, microbiologia ambiental e biologia molecular (Smith, 2003; Wanowska *et al.*, 2005).

Em se tratando de uma abordagem que associa duas grandes áreas do conhecimento, como a botânica e a microbiologia, é importante que se tenha claro o conceito de rizosfera, pois é uma região onde se concentra a maior quantidade de microrganismos associados às plantas. Por definição, a rizosfera consiste na esfera de ação entre a raiz e o solo (Lynch, 1990), ou seja, a rizosfera é a zona biologicamente ativa do solo, contornando a região da raiz da planta (Singh *et al.*, 2004). Apesar do solo ser um ambiente oligotrófico, a rizosfera é considerada um “*hot spot*” de diversidade, ou seja, um local de concentração de crescimento microbiano no ecossistema vegetal, pois nessa região ocorre a liberação de exudatos das raízes da planta ricos em nutrientes como carboidratos, e vitaminas liberadas do tecido radicular (Lynch, 2002).

As bactérias que requerem aminoácidos para o crescimento ocorrem em maior número na rizosfera do que em solo livre de raiz (Avery *et al.*, 2003). Em contrapartida, os

produtos do metabolismo microbiano que são liberados na rizosfera estimulam o crescimento das plantas, ocorrendo assim uma troca de nutrientes no sistema radicular. A rizosfera, portanto, é um sistema biológico extremamente complexo e rico em nutrientes para os microrganismos, o que torna esse habitat de grande importância para a bioprospecção de bactérias de interesse biotecnológico, incluindo os dessulfurizadores.

Diante deste contexto, este trabalho evidencia uma amostragem, clássica e molecular, da presença de microrganismos com capacidade de dessulfurização do DBT em solos rizosféricos e não-rizosféricos, contaminados com petróleo e não-contaminados e em solos oligotróficos visando à obtenção de informações fisiológicas, bioquímicas e genéticas sobre a microbiota indígena psicotolerante cultivável, com o intuito de se obter novas estirpes para uso na indústria do petróleo.

Do ponto de vista da Engenharia Ambiental, a obtenção de novas estirpes com capacidade de realizar a biodessulfurização poderá levar a aprimoramentos no processo industrial de dessulfurização do petróleo e conseqüentemente minimizar o aporte de compostos de enxofre na atmosfera diminuindo consideravelmente o impacto ambiental causado pelo consumo do petróleo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Analisar a composição da comunidade bacteriana dessulfurizadora, psicrotolerante e cultivável, presente em amostras de solo provenientes do Continente Antártico, através de metodologias microbiológicas clássicas e moleculares.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Isolar e cultivar estirpes bacterianas com capacidade de dessulfurização do dibenzotiofeno, a partir de amostras de solo e sedimentos do Continente Antártico;
- Caracterizar morfológica, bioquímica e metabolicamente os isolados obtidos em meios de cultura contendo dibenzotiofeno como única fonte de enxofre;
- Verificar a capacidade de retirada específica do elemento enxofre, pelos isolados obtidos (via específica de dessulfurização), através da formação do produto metabólico 2-hidroxibifenil;
- Verificar se existe ou não a relação entre o crescimento dos isolados bacterianos e a formação do 2-hidroxibifenil;
- Identificar filogeneticamente as estirpes que utilizarem a via específica de dessulfurização “4S” como rota metabólica para o uso do DBT como fonte de enxofre.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Problemática ambiental da queima de combustíveis fósseis

A queima de combustíveis fósseis ricos em enxofre emite para a atmosfera grandes quantidades de óxidos sulfurosos, o que pode causar efeitos adversos na saúde, no meio ambiente e na economia (EPA, 2006). Dentre os óxidos sulfurosos, o dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ) é o mais abundante e está sendo emitido na baixa atmosfera. Além disso, o  $\text{SO}_2$  pode ser a causa da grande formação de partículas de sulfato. Essas partículas têm em média  $2,5\mu\text{m}$  que podem ser transportadas para dentro dos pulmões e causar graves doenças respiratórias (Schmidt *et al.*, 1973; World Bank, 1999, Atlas *et al.*, 2001).

O dióxido de enxofre pode também reagir com o ar úmido e provocar a formação de nuvens com baixíssimo pH, o que leva à formação da chuva ácida (Monticello *et al.*, 1985) com a precipitação de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . A chuva ácida pode acelerar a corrosão de monumentos históricos, e, além disso, se este ácido for transferido ao solo, ele age prejudicando as folhagens, diminuindo o pH dos lagos e ameaçando a vida marinha (EPA, 2006).

Desde 1979, o Canadá, os Estados Unidos e algumas nações européias têm seguido muitos acordos de redução e de monitoramento da emissão de  $\text{SO}_2$ . A maioria desses acordos tem como meta o melhoramento de combustíveis, porque ele é um dos maiores responsáveis pela emissão do  $\text{SO}_2$  (McFarland, 1999).

Em 1993, um acordo para diminuir a poluição do ar (“Clean Air Act”) proibiu a venda e o fornecimento de óleo diesel com concentrações de enxofre maiores que 500ppm. Já em 1998, a União Européia estabeleceu uma meta de que o teor de enxofre contido nos combustíveis deveria ser de 350 e 50ppm para os anos de 2000 e 2005, respectivamente (Knudsen *et al.*, 1999). Iniciativas parecidas tiveram os Estados Unidos e o Canadá visando à redução do teor de enxofre nos combustíveis, pois em 2006 novas leis estabeleceram a diminuição de 500ppm e 350ppm para valores ainda menores de 30 e 15ppm, respectivamente (Avidan *et al.*, 2001; EC, 2006). Sendo assim, os Estados Unidos propuseram como meta, um teor de no máximo 10ppm de enxofre nos combustíveis para o ano de 2010 (Kilbane, 2006).

De modo geral, dois diferentes métodos podem ser usados para diminuir o impacto da emissão de óxidos sulfurosos a partir de combustíveis fósseis: o tratamento de pré-

combustão e o de pós-combustão. O primeiro tipo de tratamento traz mais vantagens por reduzir a emissão de óxidos sulfurosos independentemente do tipo de processo de combustão. Isso porque no tratamento de pré-combustão, a dessulfurização pode ocorrer em vários pontos durante o processo e a qualidade do monitoramento é relativamente fácil (Kilbane, 1989; Reichmuth, 2002).

A maior parte do enxofre presente no combustível fóssil pode ser removida facilmente. Porém há uma porção refratária correspondente aos componentes orgânicos contendo enxofre, que é de difícil remoção usando métodos químicos e físicos. Estes métodos geralmente são onerosos devido à infraestrutura necessária, equipamentos e condições de operação dos mesmos, além de produzirem quantidade considerável de CO<sub>2</sub>. Outros métodos mais eficazes e menos onerosos, como a biodessulfurização (BDS), têm mostrado excelentes resultados para a remoção do enxofre em condições moderadas.

### **3.2. Métodos de dessulfurização**

Há vários métodos de dessulfurização para remover o enxofre dos combustíveis fósseis. Dentre eles, a hidrodessulfurização (HDS) é considerada atualmente como uma das mais importantes. Porém, a dessulfurização por líquidos iônicos (IL's) e os métodos biológicos também têm mostrado um excelente potencial para substituírem a HDS ou serem usados concomitantemente em futuros sistemas de refino (Izumi *et al.*, 1994)

A dessulfurização microbiológica é um método ecologicamente vantajoso que remove o enxofre das moléculas orgânicas a baixas temperaturas e pressão sem diminuir o valor energético do combustível.

### **3.3. Hidrodessulfurização**

A hidrodessulfurização é uma tecnologia usada nas refinarias brasileiras que reduz o teor de enxofre (<15 ppm) no destilado ou combustível fóssil. Geralmente a remoção do enxofre orgânico dos combustíveis fósseis é difícil, porque este só pode ser separado das moléculas orgânicas quando as ligações químicas são quebradas. Para que ocorra essa quebra das ligações, são necessárias altas temperaturas e pressões. Desta forma,

dependendo do tipo do hidrocarboneto e da eficiência de dessulfurização desejada, a HDS pode ocorrer a 200-425°C e 150-250 psi (Izumi *et al.*, 1994; Monticello, 1998).

Embora as concentrações do enxofre retirado do dibenzotiofeno (DBT) sejam maiores quando o combustível fóssil é submetido ao processo de HDS (Monticello, 1998), e esta tecnologia ter sido comercialmente usada por um longo tempo, ela traz consigo inúmeras desvantagens. Dentre elas pode-se destacar que para a remoção dos componentes refratários do enxofre, a HDS requer altas temperaturas e pressões por um longo tempo o que implica em altos custos (McHale, 1981). Outra desvantagem refere-se ao fato da HDS remover apenas os átomos de enxofre ligados aos grupos “tiols”, sulfetos e dissulfetos eficientemente. No entanto, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH’s) contendo enxofre, os PASH’s, como o DBT, são bastante resistentes à HDS devido à natureza aromática (Monticello, 1998). Além disso, no processo de HDS, ocorre uma reação de hidrogenação com os componentes hidrofóbicos da molécula, que por sua vez reduz os valores caloríficos do combustível (Hernández-Maldonado & Yang, 2004). E por fim, apesar da HDS ser considerada um método efetivo para a dessulfurização dos combustíveis fósseis, o custo desta tecnologia é extremamente alto. (Atlas *et al.*, 2001) estimaram que o custo da diminuição do enxofre de 500 a 200ppm é de aproximadamente um cento de dólar por galão. E que para reduzir de 200 a 50ppm, a HDS poderia custar quatro vezes mais caro.

### **3.4. Dessulfurização por líquidos iônicos**

Os líquidos iônicos (IL’s) são sais orgânicos em estado líquido a temperaturas abaixo de 100°C. Os IL’s são usados como substitutos de solventes orgânicos, porque eles não têm valores de pressão de vapor abaixo de sua temperatura de decomposição, e, além disso, eles podem ser utilizados por terem diferentes propriedades dependendo da sua estrutura (Earle *et al.*, 2006).

A dessulfurização por IL’s é baseada na teoria de extração do átomo de enxofre por processos químicos moderados (Freemantle, 2004), muito embora não esteja muito bem definido o método mais eficaz para este processo.

Atualmente, há um aumento na tendência de dessulfurização em combustíveis fósseis por IL’s. A proposta de pesquisa em IL’s nas futuras refinarias é economizar a

energia que a dessulfurização requer, e diminuir o CO<sub>2</sub> produzido que está associado a outros processos de dessulfurização, como a HDS (Earle *et al.*, 2006).

### **3.5. Biodessulfurização**

Uma opção alternativa e extremamente vantajosa para a remoção do enxofre no combustível fóssil é através do uso de métodos biológicos. Os microrganismos requerem o enxofre para o seu crescimento e para suas atividades biológicas, estando ele presente nas células bacterianas, em torno de 0,5-1% do seu peso seco (Guobin *et al.*, 2006). O enxofre presente nos organismos vivos ocorre na estrutura de muitas enzimas e em seus cofatores, como a coenzima A, tiamina e a biotina, em aminoácidos e em proteínas (cisteína, metionina e pontes dissulfetos) (Stoner *et al.*, 1990; Kertesz, 1999; Caro, 2007). Os microrganismos dependentes dessas enzimas e das vias metabólicas podem ter a habilidade de adquirir o enxofre necessário por diferentes formas. Sendo assim, muitos microrganismos podem consumir metal enxofre e os grupos tiofênicos, como o DBT, e reduzir o enxofre presente no combustível.

Neste contexto, o processo de biodessulfurização é potencialmente uma tecnologia vantajosa, pois permite a retirada do átomo de enxofre em temperaturas e pressão moderadas. Portanto, ele é considerado como um processo que retém mais energia, uma vantagem em relação à HDS. Além disso, em atividades biológicas, as enzimas biocatalistas estão envolvidas, portanto, a biodessulfurização seria um processo altamente seletivo (Denome *et al.*, 1994), ao contrário da IL's.

Desta forma, existem três diferentes tipos de processos de biodessulfurização, que são descritos como: Degradativo, Anaeróbio e Específico. Dentre estes processos, o da biodessulfurização específica tem atraído mais o interesse das refinarias de combustíveis.

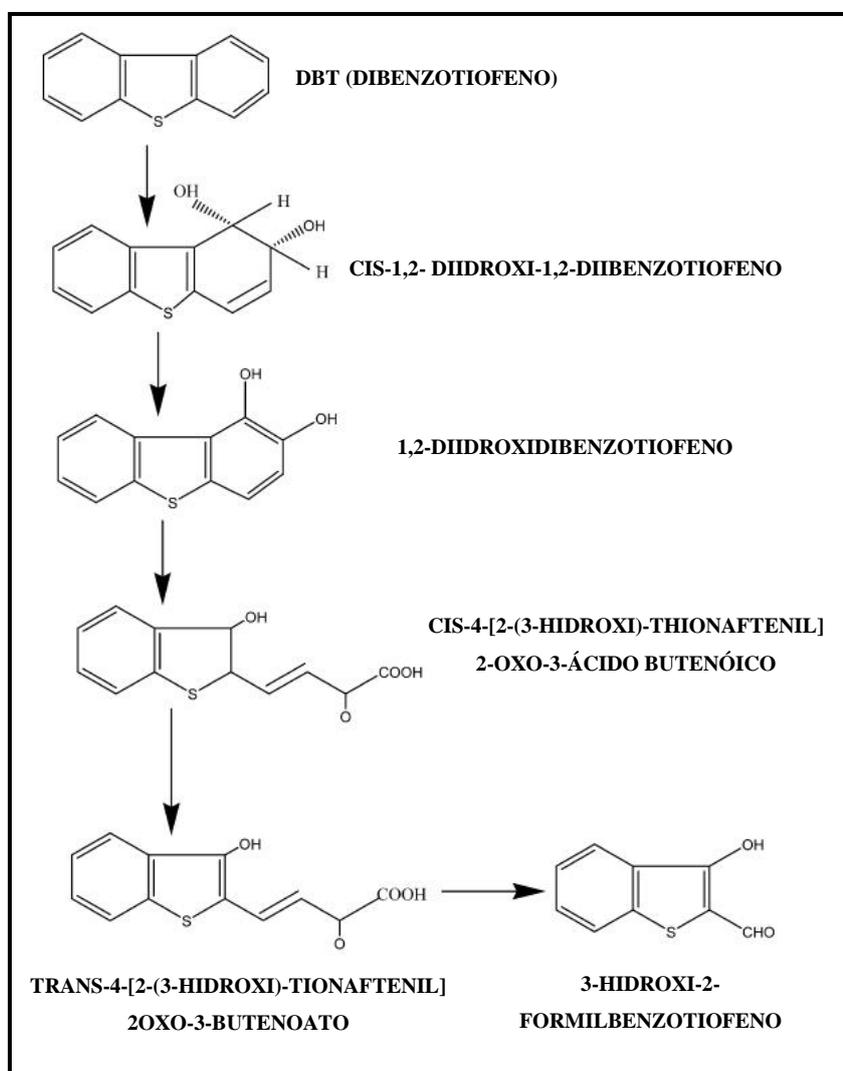
### **3.6. Biodessulfurização degradativa**

O primeiro passo para o desenvolvimento do processo de BDS é um isolamento eficiente de espécies bacterianas com a habilidade de consumir o DBT, como recurso energético, sendo que a origem destes microrganismos pode partir de amostras ambientais. Porém, os primeiros ensaios para a BDS não foram eficientes porque a espécie dos isolados bacterianos não removia especificamente o enxofre do DBT. Isso ocorreu pelo

fato dos isolados usarem os grupos tiofênicos de modo concomitante com o consumo do carbono ligado a eles (Laborde & Gibson, 1977; Malink, 1980).

Muitos outros microrganismos apresentaram capacidade de metabolizar o DBT e o carbono, em uma série de oxidações, transformando-os em compostos solúveis em água (Kodama *et al.*, 1970, 1973; Yamada *et al.*, 1968; Monticello *et al.*, 1985). A partir de então, observou-se que a acumulação dos compostos solúveis inibia o crescimento bacteriano e a oxidação do DBT.

A oxidação e a degradação do carbono dos anéis aromáticos do DBT, por ação de enzimas, ocorrem através de uma via metabólica conhecida como via de Kodama (McFarland *et al.*, 1998), a qual consiste de três etapas, sendo hidroxilação, clivagem do anel aromático e hidrólises (Gupta & Roychoudhury, 2005), (Figura 3.1).



**Figura 3.1:** Via de degradação do DBT, Via de Kodama, com a clivagem da ligação carbono-carbono (Gupta *et al.*, 2005).

Muitos gêneros diferentes têm demonstrado a capacidade de desenvolver esta via degradativa, em particular o gênero *Pseudomonas* (Hartdegen *et al.*, 1984). Em 1985, Monticello e colaboradores mostraram que a via de Kodama para a degradação do DBT estava associada a um plasmídeo, de aproximadamente 55MDa, em pelo menos duas espécies de *Pseudomonas*: *P. alcaligenes* e *P. putida*.

### **3.7. Biodessulfurização anaeróbia**

Muitas estirpes anaeróbias têm demonstrado a habilidade de remover o enxofre orgânico presente no DBT. (Kim *et al.*, 1990) investigaram a dessulfurização específica por *Desulfovibrio desulfuricans*. Esta espécie anaeróbica degrada 42% do DBT e as análises dos metabólitos produzidos provaram que esta estirpe é capaz de converter o DBT a bifenil e H<sub>2</sub>S. Além disso, muitos microrganismos anaeróbicos como o *Desulfomicrobium scambium* e o *Desulfovibrio longreachii* têm sido descritos pela habilidade de dessulfurizar, porém, cerca de apenas 10% do DBT dissolvido em querosene (Yamada *et al.*, 2001).

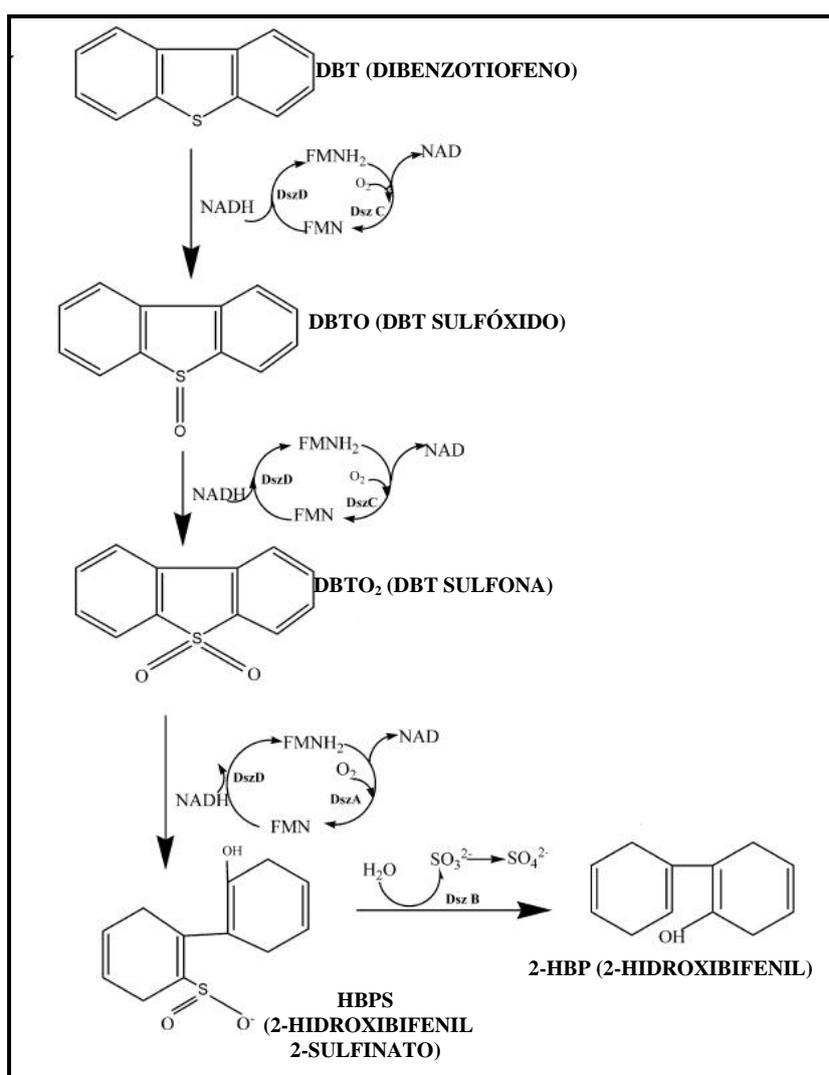
Sob condições anaeróbicas, a formação de compostos prejudiciais ao meio ambiente é mínima, a partir da oxidação dos hidrocarbonetos (McFarland, 1999). Esta grande vantagem pode ser um incentivo para a continuidade nas pesquisas sobre a biodessulfurização anaeróbica. Porém, a manutenção dos processos anaeróbicos é extremamente difícil e as atividades específicas da maioria dos isolados têm mostrado ser pouco eficiente para o DBT (Armstrong *et al.*, 1995).

### **3.8. Via específica de biodessulfurização**

O processo de remoção do enxofre pela via de Kodama ocorre através de uma via destrutiva do DBT, e não através de uma via específica de remoção do átomo de enxofre contido no hidrocarboneto modelo. Portanto, foram feitas tentativas para se isolar uma

gama de microrganismos aeróbios e anaeróbios das estirpes que poderiam remover o enxofre de um modo não-destrutivo (Stevens & Burgess, 1987).

Kilbane (1989) propôs uma via oxidativa hipotética de dessulfurização, na qual o enxofre do DBT poderia ser removido de maneira específica. A via foi chamada de Via “4S”, em referência aos quatro compostos intermediários formados (sulfóxido, sulfona, sulfonato, sulfato), sendo que esta via ocorre através de oxidações consecutivas do DBT (Figura 3.2), que é metabolizado a 2-HBP (2-hidroxibifenil), via DBT-sulfóxido (DBTO), DBT-sulfona (DBTO<sub>2</sub>), e 2-hidroxibifenil-2-sulfonato (HBPS).



**Figura 3.2:** Via de dessulfurização “4S” – Nesta via, o enxofre é removido na forma de sulfato, permanecendo intacta a estrutura carbonada (Gupta *et al.*, 2005)

O DBT é dessulfurizado por uma clivagem seletiva da ligação carbono-enxofre, resultando em uma acumulação de 2-HBP e  $\text{SO}_4^{-2}$ . Esta clivagem específica da ligação carbono-enxofre é fundamental para o processo de dessulfurização microbiana, sendo que o enxofre é removido na forma de sulfato, mas o carbono e o valor calorífico são mantidos intactos na molécula de 2-HBP (Ohshiro & Izumi, 1999).

Muitos outros pesquisadores tentaram isolar microrganismos que removeriam o enxofre de maneira não-destrutiva a partir do hidrocarboneto. (Afferden *et al.*, 1990) isolaram o *Brevibacterium* sp., o qual, durante o seu crescimento, consumia o DBT como única fonte de carbono e enxofre. No entanto, quando a via metabólica utilizada por esta bactéria para o consumo do DBT foi estudada, descobriu-se que ela era diferente da via de Kodama, e também da via “4S”. Desta forma, esta estirpe transformava o DBT em DBTO e a seguir em DBTO<sub>2</sub>, e o enxofre removido do DBTO<sub>2</sub> era convertido a benzoato e então mineralizado a água e dióxido de carbono (Afferden *et al.*, 1990).

As pesquisas realizadas mostraram que não houve uma especificidade natural da oxidação das ligações carbono e enxofre. Em função disso, em 1990 o Instituto de Tecnologia de Gás (IGT) da cidade de Chicago, EUA, tentou desenvolver novas estirpes através de uma seleção por agentes mutagênicos. Nesta tentativa, o IGT usou uma amostra de solo contaminada com hidrocarbonetos sulfurosos, contendo microrganismos indígenas. Esta amostra foi então colocada em um biorreator de fluxo contínuo onde foi exposta a agentes mutagênicos (NTG -1 metil-3 nitro-1 nitrosoguanidina).

Depois de alguns meses, foi observado um grupo de espécies que sobreviveram à ação mutagênica ocorrida no biorreator. Estas espécies mostraram uma capacidade específica de quebra das ligações carbono-enxofre, sendo capazes de remover cerca de 90% do enxofre orgânico contido naquela amostra. Este novo grupo de microrganismos originado foi chamado de IGTS7 (Kilbane, 1990, Kilbane 1992b; ATCC, 2007). O nome IGTS7 foi dado pelo fato de terem sido formados sete tipos diferentes de colônias nas populações analisadas. Dentre elas, duas apresentaram uma capacidade de dessulfurização, apesar de estarem em baixa população e apresentarem uma velocidade lenta de crescimento, sendo elas o *Rhodococcus rhodochrous* e o *Bacillus sphaericus*. Deste modo, estas duas novas estirpes mutantes, foram nomeadas de *R. rhodochrous* IGTS8 e de *B. sphaericus* IGTS9.

Desde então, muitos gêneros e espécies têm sido descritos por apresentarem capacidade específica de dessulfurização, incluindo *Corynebacterium* sp. SY1, (Omori *et*

*al.*, 1992), *Rhodococcus* sp. SY1 (Omori *et al.*, 1992); *Rhodococcus* sp. 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* sp. MC501 (Constanti *et al.*, 1996), *Rhodococcus* sp. B1 (Denis – Larose *et al.*, 1997); *Mycobacterium* sp. G3 (Nekodzuka *et al.*, 1997), *Paenibacillus* sp. (Konishi *et al.*, 1997); *Gordona* sp. CYKS1 (Rhee *et al.*, 1998); *Rhodococcus* sp. ECRD1 (Grossman *et al.*, 1999), *Mycobacterium* sp. (Li *et al.*, 2003). Porém, como se pôde observar, a grande maioria das bactérias com capacidade de dessulfurização específica pertence ao gênero *Rhodococcus*.

### **3.9. Microbiologia do gênero *Rhodococcus***

O gênero *Rhodococcus* pertence ao filo e à classe de Actinobacteria, ordem dos Actinomycetos e família dos Nocardeaceae (NCBI, 2007). Os microrganismos pertencentes a este gênero são Gram-positivos, aeróbios obrigatórios, catalase positivos, parcialmente sensíveis a lisozima, não-móveis e não apresentam endosporos. Além disso, eles possuem uma variedade de plasmídeos circulares pequenos ou grandes e também lineares (Dosomer *et al.*, 1988; Kayser, 2002). O tempo de crescimento do *Rhodococcus* requer em torno de 2 a 3 três dias para a observação em meio sólido e a temperatura padrão para o seu crescimento é, em média, de 30°C. Os membros deste gênero são quimiorganotróficos e têm um tipo de metabolismo oxidativo.

Dentre as estirpes do grupo das IGTS8, a que tem sido mais estudada é a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, isolada por Kilbane e Bielaga (1990), e devido à sua ótima capacidade de dessulfurização, essa estirpe está sendo usada pela companhia norte-americana “Energy Biosystems Corporation” (EBC) para o desenvolvimento de um sistema de biodessulfurização em escala industrial.

Em 1997, a análise da seqüência nucleotídica do DNA ribossomal 16S desta espécie foi depositada no banco de dados “GenBank”, sob o número de acesso AF001265. Porém, esta estirpe já foi patenteada e em muitas publicações ela ainda é citada como *R. erythropolis* IGTS8 (Bressler *et al.*, 1998; ATCC, 2007; NCBI, 2007).

### **3.10. Biologia molecular da dessulfurização específica**

Desde o isolamento e a identificação da *R. erythropolis* IGTS8, as pesquisas acerca da biologia molecular desta estirpe, e também de outras relacionadas com o processo de biodessulfurização, estão sendo desenvolvidas com o objetivo de se ter um maior controle da maquinaria enzimática e genética da remoção específica do enxofre (Denome *et al.*, 1993; Monticello, 2000, Abbad-Andaloussi *et al.*, 2003; Kilbane *et al.*, 2007).

Com isso, várias questões foram abordadas sobre este tipo de biotecnologia, como, por exemplo, se a remoção específica do enxofre é controlada pelo DNA genômico ou se há plasmídeos envolvidos neste processo; Os genes poderiam ser transmitidos para outras estirpes bacterianas; Qual é o tamanho do gene responsável pela dessulfurização? O processo é controlado por mais de um gene; Qual seria o papel que cada um dos genes desempenharia na via metabólica?

(Denome *et al.*, 1993) isolaram o plasmídeo de alto peso molecular que continha o gene originalmente denominado pSOX para a estirpe IGTS8. E os resultados dos testes realizados nesta estirpe mostraram que os genes de dessulfurização realmente estão localizados neste plasmídeo nesta estirpe.

Os genes de dessulfurização e as enzimas codificadas foram inicialmente chamados como *sox* (para “sulphur oxidation”). Mais tarde, a abreviação *sox* foi substituída por *dsz* (para “desulfurization”) (Denome *et al.*, 1994). Os genes *dsz* e suas proteínas foram comparados com outros genes e enzimas cujas seqüências estão depositadas em alguns bancos de dados como o “GenBank” e o “Swiss-Prot”. As pesquisas não mostraram uma homologia significativa, e, assim, foi deduzido que os genes de dessulfurização *dszA*, *dszB* e *dszC* são codificados por enzimas específicas (Piddington *et al.*, 1995). Denis-Larose e colaboradores (1997) estudaram os três genes *dsz* da estirpe *R. erythropolis* IGTS8, e constataram que estes estavam localizados em um plasmídeo de 150kb. Anteriormente, esta informação era de que este plasmídeo continha apenas 120kb (Denome *et al.*, 1994).

Neste contexto, os estudos sobre esta via também revelaram um sistema multienzimático com três atividades distintas (Gray *et al.*, 1996). As três primeiras enzimas, DszD, DszC, DszA, (Figura 3.2) são do tipo monoxigenases, catalizando as transformações do DBT, através de sucessivas oxidações a DBT-sulfona e depois a 2-hidroxi-bifenil-2 ácido sulfônico (Gray *et al.*, 1996). A dessulfatase (DszB) é responsável pela formação do HBP a partir do HPB-sulfato. A natureza multienzimática da via “4S” e a exigência dos cofatores (NADH e FMNH<sub>2</sub>) impedem que as reações de oxidação ocorram quando não há a presença de todas as enzimas necessárias no processo de

biodessulfurização (Monticello, 1998). Vale ressaltar que as enzimas envolvidas nessa via (DszA, DszB e DszC) são codificadas pelos três genes, *dszA*, *dszB* e *dszC*, respectivamente, e são suficientes para a conversão do DBT a 2-HBP (Oshiro & Izumi, 1999).

### **3.11. Pesquisas sobre o melhoramento da via específica de dessulfurização**

Durante os últimos dez anos, as pesquisas sobre o melhoramento da eficiência da dessulfurização têm crescido bastante. Esta pesquisa tem focado em três áreas: isolamento de novas estirpes com alta atividade específica para a gama de compostos contendo enxofre existente, isolamento de novas estirpes com alta tolerância aos hidrocarbonetos e isolamento de novas estirpes capazes de dessulfurizar os compostos abaixo das condições termofílicas.

Até o ano de 2006, ainda não havia sido descoberto nenhum microrganismo com a habilidade de dessulfurizar os compostos benzotiofênicos com substituintes alquil, como o 2-n-hexil-DBT. Recentemente, uma espécie Gram-negativa, *Sphingomonas subartica*, foi isolada no Japão, e constatou-se que a mesma possui a habilidade de dessulfurizar o DBT de forma eficiente para os parâmetros industriais, (Gunam *et al.*, 2006).

Em se tratando de dessulfurização do petróleo, há muitos compostos diferentes que têm efeitos inibitórios em algumas estirpes competentes para este processo. A *Pseudomonas* spp. foi considerada uma espécie ideal para a biodessulfurização do petróleo, porque ela é tolerante a solventes orgânicos e possui rápida velocidade de crescimento (Constanti *et al.*, 1993).

A partir dessas propriedades observadas, os genes *dszABC* de *R. erythropolis* foram clonados em *P. putida* Idaho, com o intuito de se construir um microrganismo geneticamente modificado para dessulfurização e com tolerância ao solvente. Quando esta estirpe foi colocada em contato com compostos sulfurosos dissolvidos no solvente, notou-se que a *P. putida* modificada foi capaz de dessulfurizar o DBT com uma eficiência de 86% em 10% (v/v) do solvente em apenas 6 horas. Entretanto, não foi observada nenhuma redução do DBT, quando este experimento foi repetido em *R. erythropolis* e *P. putida* Idaho sem nenhuma modificação genética (Tao *et al.*, 2006)

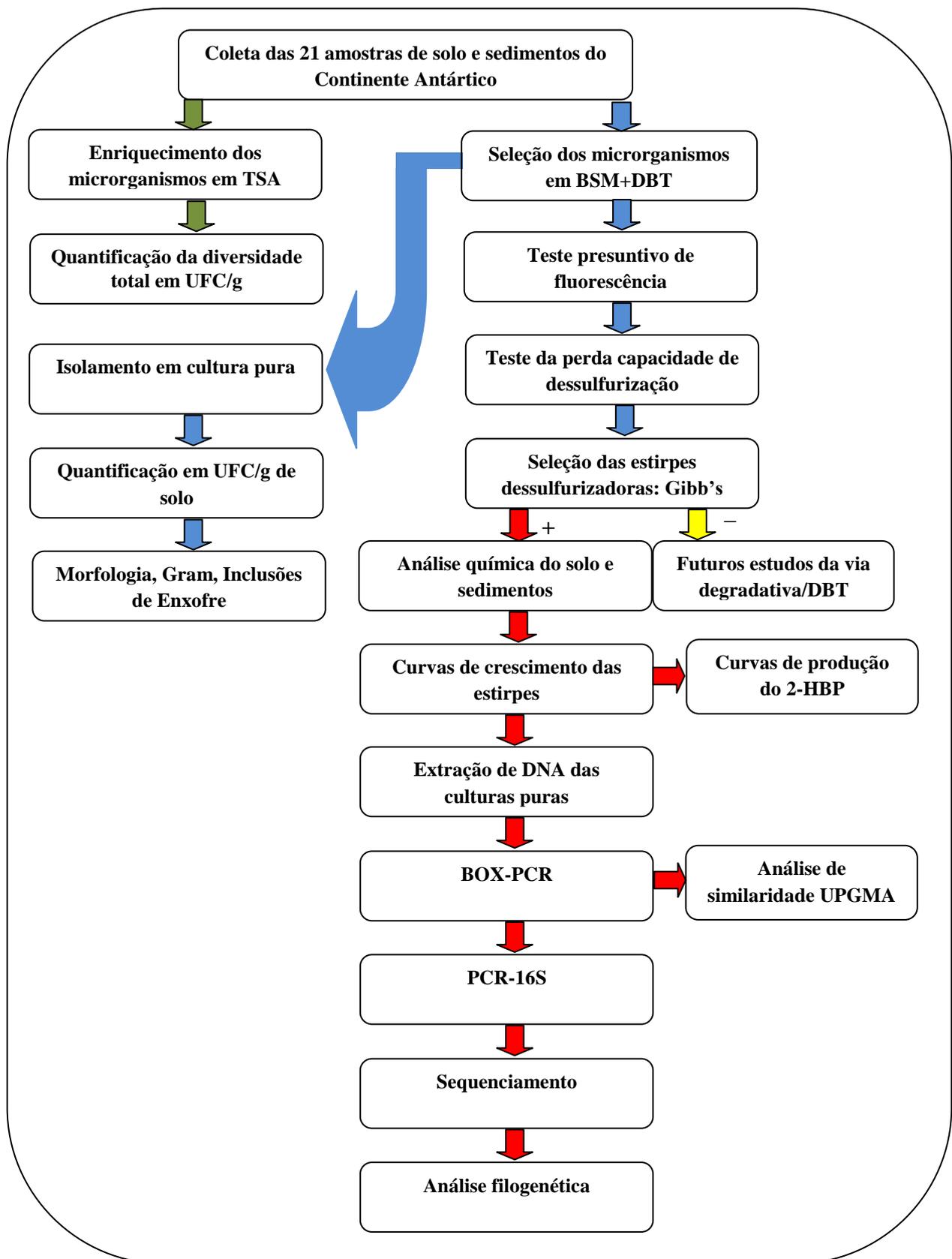
Recentemente, foi constatado o fato de que, para que o processo biotecnológico de dessulfurização por microrganismos ocorra de forma mais eficiente, são necessárias baixas condições termofílicas, o que leva a um aumento da taxa de biodessulfurização do DBT. Caso contrário, operando em altas temperaturas, este processo estaria mais próximo da tecnologia de HDS.

Atualmente, tem sido observada uma corrida pelos pesquisadores norte-americanos, em busca do desenvolvimento em escala industrial do processo de biodessulfurização, visando principalmente às vantagens econômicas que este tipo de biotecnologia oferece. Porém, a aplicação desta tecnologia em escala industrial ainda se encontra em nível de estudos, restando apenas uma instalação piloto, sob os cuidados da companhia norte-americana “Energy Biosystems Corporation”, para o desenvolvimento de novas pesquisas com o objetivo de alcançar o mercado industrial.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Delineamento experimental**

Com o objetivo de sintetizar todos os passos que foram seguidos durante a execução da metodologia, optou-se por criar um fluxograma (Figura 4.1), de forma que se possa visualizar de uma maneira ampla e geral, o delineamento experimental contido nas metodologias adotadas neste trabalho.



**Figura 4.1:** Fluxograma evidenciando o delineamento experimental na fase do desenvolvimento metodológico adotado.

## 4.2. Coleta das amostras

As amostras de solo e sedimentos foram coletadas no período de janeiro e fevereiro de 2007 e fevereiro de 2009 pelo professor Dr. Alexandre Soares Rosado (LEMM/IMPPG/UFRJ). Foram escolhidas áreas randômicas e passíveis de contaminação com petróleo para a coleta, na Baía do Almirantado, localização da base brasileira no Continente Antártico. As amostras foram embarcadas em um navio a uma temperatura de -20°C e armazenadas à mesma temperatura no Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os estudos tiveram início assim que estas amostras foram entregues ao Laboratório de Biodiversidade e Ecologia Microbiana (LBEM), sob a coordenação da professora Dra. Gabriela Frois Duarte, da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Como resultado destas coletas, obteve-se 21 amostras de solo e sedimentos de diversas localizações no Continente, Tabela 4.1.

As regiões de amostragem, sobretudo das amostras livres de contaminação com hidrocarbonetos, se localizam nas regiões de Punta Plaza e Ipanema que estão inseridas na Península Keller, Baía do Almirantado, que por sua vez estão no interior da Ilha Rei Jorge, Continente Antártico, Figura 4.2.

Já as coletas das amostras contaminadas com hidrocarbonetos totais de petróleo, foram realizadas exclusivamente na região da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF), sendo que a amostragem foi feita em pontos próximos aos tanques de armazenagem de combustíveis, Figura 4.3. É importante destacar que a área contaminada é composta por uma camada superficial de cascalhos e silte, sendo que os pontos de amostragem estão sobre um lençol freático com aproximadamente 0,6 a 1,5 metros de profundidade. Além disso, esta contaminação abrange uma área de cerca de 100m (paralelo ao litoral) por 50m (transversal) e 1m de profundidade, totalizando, portanto, um volume de 5000m<sup>3</sup> de solo.

**Tabela 4.1:** Enumeração, descrição da origem, localização e data de coleta das amostras coletadas no Continente Antártico.

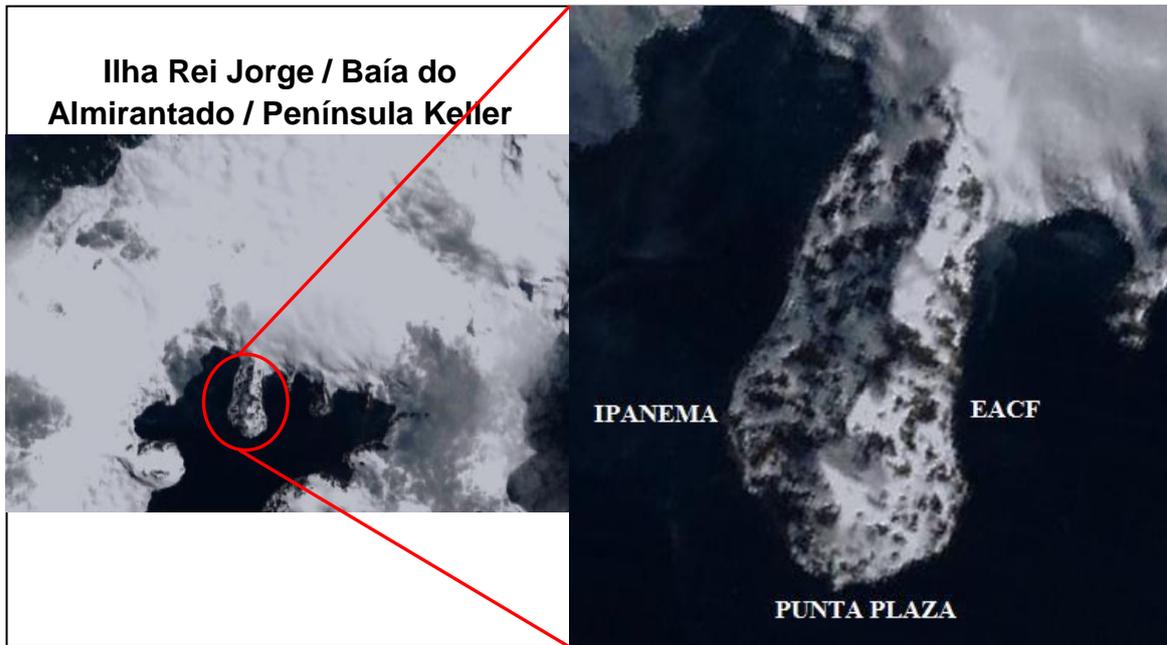
<i>Amostras</i>	<i>Origem</i>	<i>Localização</i>	<i>Data de coleta</i>
Amostra 01	Pinguineira	Punta Plaza	12/02/07
Amostra 02	Campo de Musgos	Punta Plaza	18/02/07
Amostra 03	Sedimento da Costa Oceânica	Ipanema	31/01/07
Amostra 04	Pinguineira	Ipanema	31/01/07
Amostra 05	Solo da Costa Oceânica	Punta Plaza	31/01/07
Amostra 06	Rizosfera <i>C. quitensis</i>	Punta Plaza	28/02/07
Amostra 07	Rizosfera <i>D. antarctica</i>	Punta Plaza	27/01/07
Amostra 08	Rizosfera <i>C. quitensis</i>	Ipanema	27/02/07
Amostra 09	Rizosfera <i>D. antarctica</i>	Punta Plaza	28/02/07
Amostra 10	Rizosfera <i>D. antarctica</i>	Ipanema	27/02/07
Amostra 11	Solo da Costa Oceânica	Ipanema	03/02/07
Amostra 12	Campo de Musgos	Punta Plaza	21/02/07
Amostra 13	Pinguineira	Punta Plaza	16/02/07
Amostra 14	Campo de Musgos	Punta Plaza	27/02/07
Amostra 15	Rizosfera <i>C. quitensis</i>	Punta Plaza	16/02/07
Amostra 16	Solo da Costa Oceânica	Punta Plaza	21/01/07
Amostra 17	Campo de Musgos	Ipanema	12/02/07
Amostra 18	Rizosfera <i>D. antarctica</i>	Punta Plaza	27/01/07
Amostra 19****	Ponto de Amostragem 06	EACF	Fevereiro/2009
Amostra 20****	Ponto de Amostragem 07	EACF	Fevereiro/2009
Amostra 21****	Ponto de Amostragem 03	EACF	Fevereiro/2009

\**C. quitensis* = *Colobanthus quitensis*

\*\**D. antarctica* = *Deschampsia antarctica*

\*\*\*EACF = *Estação Antártica Comandante Ferraz*

\*\*\*\* *Amostras contaminadas com petróleo*



**Figura 4.2:** Imagem a esquerda representa a Baía do Almirantado, inserida na Ilha Rei Jorge, no Continente Antártico. Imagem a direita ampliada, representa a Pensínsula Keller, e as respectivas regiões de ponto de coletas: Ipanema, Punta Plaza e Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF). *Fonte: Google Earth (acesso em 10/02/2010).*



**Figura 4.3:** Imagem da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) mostrando os pontos de amostragem de solo 6, 7 e 3, representando as amostras 19, 20 e 21 (Tabela 4.1), respectivamente. Estas amostras coletadas no ano de 2009 estavam contaminadas com hidrocarbonetos totais de petróleo e situavam-se próximas aos tanques de armazenagem de combustíveis (Foto: Rosado, 2009).

### **4.3. Isolamento das bactérias e condições de cultivo**

O isolamento de culturas bacterianas teve início com o cultivo dos microrganismos presentes no solo e sedimentos em meio rico e seletivo, sendo este último, suplementado com o organosulfurado dibenzotiofeno, como única fonte de enxofre para a geração de energia. A partir de cada amostra, foi retirada uma porção de 10g e esta foi colocada em um frasco Erlenmeyer contendo 10g de pedriscos e 95mL de solução tampão de pirofosfato de sódio ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , Vetec) a 0,1% (p/v), devidamente esterilizada. Os Erlenmeyers foram agitados durante 20 minutos (Agitador Mod 109, Nova Ética), a 200rpm em temperatura de 27°C, para homogeneização da suspensão da amostra. Cada suspensão obtida foi então submetida a uma diluição seriada até  $10^{-7}$  e alíquotas dessas diluições foram plaqueadas em meio TSA (“Trypticase Soy Agar”, Merck) com o objetivo de amostrar a diversidade total de microrganismos presentes. Após 24 horas de crescimento, à 27°C, foi feita a contagem das colônias obtidas (UFC/mL) em meio rico.

O plaqueamento em meio seletivo seguiu o mesmo protocolo descrito no parágrafo anterior, no entanto as suspensões oriundas das diluições foram inoculadas em placas de

Petri contendo meio de cultura BSM, “Basic Salt Medium” (0,2% (v/v) de glicerol, 4g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 4g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 2g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,2g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,001g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,001g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 17g de ágar bacteriológico, 1 litro de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada (Denome *et al.*, 1994) suplementado com DBT (Acros Organics) a 0,1mM (Duarte *et al.*, 2001; Guobin *et al.*, 2006), com o objetivo de selecionar apenas as estirpes capazes de utilizar o DBT como única fonte de enxofre.

Após a incubação das placas a 27°C e contagem após um período de 60 horas, as colônias isoladas foram repicadas para tubos de ensaio com caldo BSM suplementado com DBT a 0,1mM, para enriquecimento, e aquelas que continuaram apresentando crescimento foram repicadas para frascos de penicilina contendo ágar BSM acrescido de DBT a 0,1mM, para a preservação dos microrganismos. Estes frascos foram estocados a 4°C, para utilização rápida, e eram repicados esporadicamente, para manutenção.

#### **4.4. Caracterização dos isolados**

##### **4.4.1. Caracterização fenotípica**

Colônias individuais crescidas em placas de BSM suplementado com DBT, de cada isolado em cultura pura, foram identificadas através de técnicas clássicas e moleculares. 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 motilidade, forma e arranjo colonial, coloração diferencial de Gram para determinação do tipo de parede celular, e presença de inclusões de enxofre. Para a observação das inclusões de enxofre, lâminas foram confeccionadas a partir das culturas em caldo, fixadas com uma fina camada de ágar e observadas em microscópio óptico na objetiva de contraste de fase.

As lâminas coradas pela técnica de Gram foram posteriormente fotografadas em câmara acoplada ao microscópio óptico.

#### **4.4.2. Caracterização bioquímica**

A caracterização bioquímica, de interesse nesse estudo, está relacionada à verificação da capacidade de utilização do enxofre presente no DBT através de uma via específica de dessulfurização, levando à formação de um produto metabólico fluorescente, o 2-HBP. Para isso, foi realizado um teste bioquímico de produção de fluorescência, considerado presuntivo para a determinação da capacidade dos isolados de dessulfurizar o DBT.

Sendo assim, as colônias isoladas em meio seletivo foram transferidas para uma placa de microtitulação contendo BSM suplementado com DBT 0,1 mM, e em seguida incubadas a 27°C. Após o crescimento, constatado através de turvação, as placas foram observadas sob luz U.V. (absorbância a 254nm) para a observação da formação de fluorescência emitida pela produção do 2-HBP, como consequência da presença de enzimas específicas da via de dessulfurização “4S” (Krawiec, 1990).

#### **4.4.3. Caracterização metabólica: observação da perda da capacidade de utilização do DBT como fonte de enxofre, após sucessivas passagens em meio rico TSB**

Partindo do princípio que os genes de dessulfurização conhecidos até hoje são plasmidiais, esta metodologia foi realizada com o intuito de se observar uma possível perda da capacidade de dessulfurização pelas estirpes isoladas, relacionada com uma possível perda do plasmídeo no caso de crescimento bacteriano sem a presença do agente seletivo.

Uma vez isoladas em meio seletivo, as culturas bacterianas, quando inoculadas em meio rico, podem perder as capacidades fenotípicas conferidas por genes presentes em plasmídeos, devido à eliminação dos mesmos para fins de economia energética celular.

Sendo assim, este ensaio sugere uma possível relação entre a localização de genes de dessulfurização, se presentes, através da observação da perda dessa capacidade específica, após passagens sucessivas de uma cultura bacteriana, proveniente de meio seletivo, em meio rico.

Para isso, o crescimento dos isolados selecionados em caldo BSM suplementado com DBT foram mensurados por D.O., em espectrofotometria a um comprimento de onda

de 600nm, após o tempo de 60 horas. Logo após, estes isolados foram inoculados em caldo TSB e incubados a 27°C durante 24 horas. Após este tempo de incubação, este procedimento foi repetido duas vezes para eliminar qualquer vestígio do caldo seletivo. Em seguida, estes mesmos isolados foram reinoculados em caldo BSM suplementado com DBT, incubados à mesma temperatura. Este procedimento foi também repetido duas vezes para eliminar qualquer vestígio do caldo TSB e após o tempo de crescimento de 60 horas, foram medidas as D.O's a um comprimento de onda de 600nm.

#### **4.5. Ensaio de Gibb's (Teste Confirmativo)**

A atividade de dessulfurização foi observada usando-se o reagente de Gibb's (2,6-dicloroquinona-4-cloramida, Sigma). O reagente de Gibb's tem a propriedade de reagir com grupos aromáticos como o 2-HPB, em um pH de 8,0, formando um complexo de cor azul, que pode ser monitorado por espectrofotômetro a um comprimento de onda de 610nm.

O ensaio de Gibb's (Kayser *et al.*, 1993) foi escolhido com o objetivo de selecionar as estirpes dessulfurizadoras e monitorar a atividade de dessulfurização dessas culturas. A produção cumulativa do 2-HPB foi determinada por uma alíquota retirada ao final de 60 horas de crescimento bacteriano em caldo BSM suplementado com DBT.

Portanto, o ensaio foi realizado utilizando 5mL da cultura microbiana, que foi colocada em um tubo Falcon de 15mL, onde o pH foi ajustado para 8,0 com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 10% (p/v), e então 50µL do reagente de Gibb's (10mg mL<sup>-1</sup> em solução de etanol) foi adicionado à cultura. Esta solução foi incubada por 30 minutos a uma temperatura de 30°C, no qual ocorre a produção azul da solução, caso seja detectada a presença do 2-HPB. Em seguida, a solução foi centrifugada durante 5 minutos para a remoção das células, e a absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotometria a um comprimento de onda de 610nm (Thermo Scientific/BioMate<sup>TM</sup>).

#### **4.6. Curva de crescimento dos isolados selecionados**

Para gerar as curvas de crescimento dos isolados em meio seletivo, cada um deles foi repicado em frasco Erlenmeyer contendo 30mL de caldo BSM suplementado com DBT

e os mesmos foram incubados a uma temperatura de 27°C durante 12 horas. Após essa etapa, as suspensões bacterianas tiveram seu crescimento quantificado através da medida da turbidez desta cultura usando-se espectrofotômetro (Thermo Scientific/BioMate™), sendo este calibrado em um comprimento de onda de 600nm na faixa visível (Guobin *et al.*, 2006)

Para a construção da curva, dois grupos de inóculo, sendo Grupo 1 (G1) e Grupo 2 (G2), foram criados com o intuito de obter todas as leituras espectrofotométricas do ensaio, diurnas e noturnas, acompanhando assim todo o crescimento bacteriano até a fase estacionária.

Desta forma, as estirpes referentes ao G2 foram inoculadas 12 horas após o inóculo referente ao G1. Logo, após 24 horas de crescimento, as leituras foram realizadas com as estirpes referentes ao inóculo G2, concomitantemente com as leituras do inóculo G1, Tabela 4.2.

**Tabela 4.2:** Tempo decorrido (dias e horas) do ensaio para construção das curvas de crescimento em função dos grupos de inóculos G1 e G2.

<i>Dias</i>	<i>1º dia</i>	<i>2º dia</i>	<i>3º dia</i>
<i>Horário das leituras</i>	<i>Grupo 1 (G1)</i>	<i>Grupo (G2)/Grupo (G1)</i>	<i>Grupo 2 (G2)</i>
8:00h	T12	T24h / T36h	T50h
10:00h	T14	T26h / T38h	T52h
12:00h	T16	T28h / T40h	T54h
14:00h	T18	T30h / T42h	T56h
16:00h	T20	T32h / T44h	T58h
18:00h	T22	T34h / T46h	T60h

As medidas foram feitas em intervalos de 2 horas até o tempo final de 60 horas (Rashtchi *et al.*, 2006), com a retirada de uma alíquota de 1mL de cada Erlenmeyer, começando pelas primeiras 12 horas após a inoculação (T<sub>0</sub>). Sendo assim, as medidas dos tempos foram representadas da seguinte forma: T<sub>12</sub> (12h), T<sub>14</sub> (14h), T<sub>16</sub> (16h), T<sub>18</sub> (18h), T<sub>20</sub> (20h), T<sub>22</sub> (22h), T<sub>24</sub> (24h), T<sub>26</sub> (26h), T<sub>28</sub> (28h), T<sub>30</sub> (30h), T<sub>32</sub> (32h), T<sub>34</sub> (34h), T<sub>36</sub> (36h), T<sub>38</sub> (38h), T<sub>40</sub> (40h), T<sub>42</sub> (42h), T<sub>44</sub> (44h), T<sub>46</sub> (46h), T<sub>48</sub> (48h), T<sub>50</sub> (50h), T<sub>52</sub> (52h),

T<sub>54</sub> (54h), T<sub>56</sub> (56h), T<sub>58</sub> (58h) e T<sub>60</sub> (60h). As alíquotas retiradas foram submetidas à agitação em vórtex no momento de cada leitura, para homogeneização da suspensão bacteriana.

#### **4.7. Curva de quantificação da produção do 2-HBP**

A conversão do DBT em 2-HPB foi monitorada através da metodologia do Ensaio de Gibb's. Desta forma, a dessulfurização e a produção do 2-HPB foram dependentes do crescimento celular, uma vez que o DBT fornece um elemento essencial para o metabolismo bacteriano, e prosseguiram assim em paralelo com o aumento da biomassa.

Para isso, alíquotas de 5mL foram amostradas durante o crescimento celular dos isolados em caldo BSM suplementado com DBT, em intervalos de 4 horas até o tempo final de 60 horas. Para a detecção crescente do 2-HPB, estas alíquotas foram submetidas ao mesmo protocolo descrito no Ensaio de Gibb's e posteriormente, a sua absorvância foi mensurada em espectrofotometria e convertida a ppm, com base nas concentrações conhecidas de 2-HPB utilizadas para a construção da curva-padrão.

#### **4.8. Curva-padrão do 2-HBP**

A curva-padrão tem a função de estabelecer uma relação entre os valores das variáveis dependentes e independentes, além de validar alguns tipos de leitura, sobretudo os métodos espectrofotométricos.

No gráfico cartesiano linear construído, são correlacionadas as concentrações de soluções padrões conhecidas do constituinte analisado, no caso o 2-HBP. Esta análise instrumental oferece a possibilidade de se experimentar um grande intervalo de concentrações, e isto significa que os resultados obtidos são calculados e os erros aleatórios avaliados de uma maneira individual para cada concentração.

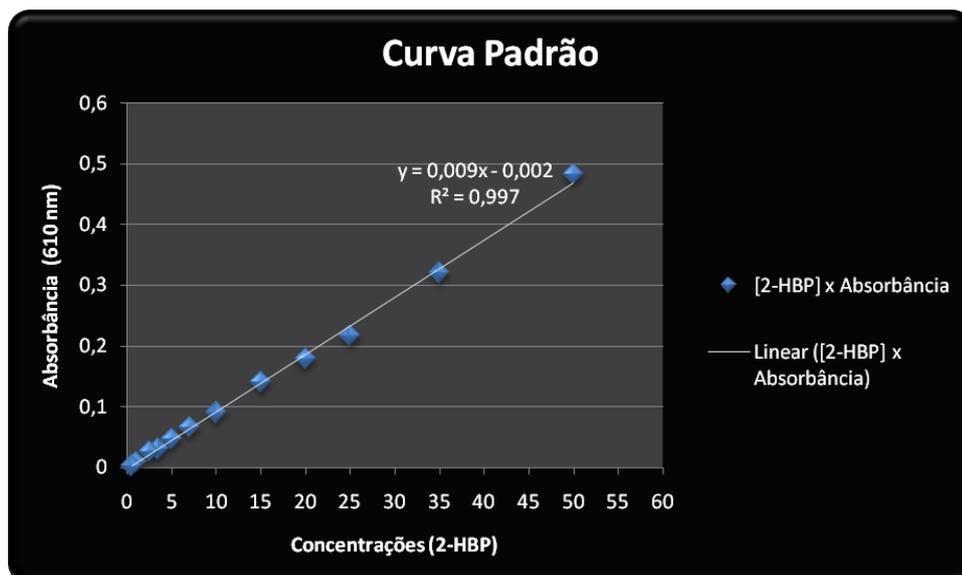
Os padrões de calibração são medidos em espectrofotômetro sob as mesmas condições daquelas a serem utilizadas para o teste da solução desconhecida, sendo esta o sobrenadante da cultura bacteriana. Uma vez obtido o gráfico de calibração, a concentração do analito (2-HBP) foi constatada através da interpolação dos dados obtidos nas leituras espectrofotométricas.

Para que os dados sejam confiáveis, o resultado da curva deve ser uma reta, caso o método analítico adotado esteja realmente obedecendo a lei fundamental dos métodos fotométricos, conhecida como *Lei de Lambert-Beer*, onde o valor do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) deve ser superior a 0,99.

Sendo assim, a construção da curva-padrão de formação do 2-HBP foi realizada então, através do uso de concentrações conhecidas do 2-HBP em solução de etanol a 20% (v/v), e assim, obteve-se os parâmetros listados na Tabela 4.3 que posteriormente gerou a curva mostrada na Figura 4.4.

**Tabela 4.3:** Equivalência das concentrações conhecidas do 2-HBP com a absorbância obtida em espectrofotômetro a 610nm.

<i>Concentrações do 2-HBP (mg/L)</i>	<i>Absorbância a 610nm</i>
0,5	0,003
1,0	0,009
2,5	0,026
3,5	0,031
5	0,047
7	0,066
10	0,091
15	0,141
20	0,179
25	0,217
35	0,321
50	0,483



**Figura 4.4:** Curva padrão construída para a quantificação em ppm do 2-HBP formado a partir dos dados obtidos pela leitura da absorbância a 610nm.

#### 4.9. Análise química das amostras de solo e sedimentos

As análises dos elementos químicos, sobretudo o enxofre presente nas amostras dos solos e sedimentos que apresentaram a presença de microrganismos dessulfurizadores, foram realizadas no Laboratório de Geoquímica Ambiental (LGqA) inserido no Departamento de Geologia (DEGEO/UFOP). Essa técnica visou obter um espectro dos metais presentes nestas amostras, e principalmente a presença do elemento enxofre, que pode estar sob outras formas químicas, como sulfatos ou sulfetos. Sendo assim, a metodologia adotada foi definida pelo Prof. Dr. Hermínio Nalini e está descrita a seguir.

Inicialmente as amostras foram peneiradas para a retirada da matéria orgânica presente e processadas até a granulometria de talco. Em seguida, elas foram submetidas à técnica de digestão ácida por Água-Régia concentrada (HCl/HNO<sub>3</sub>, na proporção de 3:1 respectivamente), para que os metais de interesse fossem extraídos do solo analisado (Pereira *et al.*, 2007).

Nesta técnica então, utilizou-se o ácido clorídrico e o ácido nítrico juntamente com uma massa  $1g \pm 0,1mg$  de amostra de solo e sedimento a uma temperatura de 90°C, o que gerou a liberação do óxido nitroso gasoso como produto da reação. Assim, a solução gerada da digestão foi filtrada e o seu volume foi completado com água Milli-Q para um

balão volumétrico de 50mL e então foi submetido à leitura do “Espectrômetro de Emissão Atômica Via Plasma (ICP-AES).

#### **4.10. Caracterização genotípica**

##### **4.10.1. Extração de DNA de culturas puras**

Para a extração de DNA das culturas puras selecionadas pelo Ensaio de Gibb's foi usado um protocolo simplificado de extração de DNA baseado em lise térmica (Moore *et. al.*, 2004). Para isso, as colônias dos isolados em ágar BSM suplementado com DBT foram coletadas com o auxílio de uma alça de repicagem e em seguida foram ressuspendidas em 100µL de água de farmácia estéril em microtubos de 600µL estéreis e livres de DNA. Em seguida, esta suspensão foi levada ao banho-maria a uma temperatura de 97°C durante 10 minutos. Logo após, as amostras lisadas foram centrifugadas a 15.000 x g por 15 minutos para separar o DNA presente no sobrenadante dos restos celulares decantados. O DNA extraído foi armazenado em um microtubo estéril de 600µL e estocado a -20°C.

##### **4.10.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) das culturas puras**

As reações de amplificação por PCR ocorreram na presença dos iniciadores EpsilonF (5`-GAG AST TGA TCM TGG CTC AG-3`) e 1541R (5`-AGG AGG TGA TCA GCC-3`) (Embley, 1991), específicos para a amplificação do gene DNAr 16S de microrganismos do domínio *Bacteria*.

O objetivo dessa análise será a utilização posterior dos produtos de PCR obtidos para o sequenciamento do genoma amplificado dos isolados e a identificação taxonômica e filogenética destes. Nesta PCR, o produto esperado era de aproximadamente 1500pb e as misturas de reação, feitas em um ambiente livre de DNA, com os respectivos volumes, foram listadas na Tabela 4.4.

Após a adição de todos os reagentes, estes foram transferidos para microtubos e em seguida, foi adicionada à mistura de reação, 0,5µL da amostra a ser analisada.

**Tabela 4.4:** Reagentes utilizados para a preparação da mistura de reação da PCR para a amplificação do gene DNAr 16S.

<i>Componentes</i>	<i>Volume por reação</i>	<i>Concentração por reação</i>
Água Milli – Q	15,85µL	-
Tampão	2,5µL	1x
MgCl <sub>2</sub>	2,0µL	2,0mM
Primer Epsilon F	1,25µL	500nM
Primer 1541 R	1,25µL	500nM
dNTP's	0,5µL	0,8mM
BSA	1,0µL	0,2mg/L
<i>Taq</i> polimerase	0,15µL	0,02u/mL

A amplificação foi realizada em um termociclador automático (Biocycler<sup>TM</sup>) seguindo o programa de 3 minutos a 94°C (desnaturação inicial); 30 ciclos de 60 segundos a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 55°C (ligação dos “primers”) e 1 minuto a 72°C (extensão); 7 minutos a 72° C (extensão final). Após a amplificação, as amostras foram armazenadas a 4°C. Os produtos de amplificação foram analisados através de gel de agarose 1% (p/v), através de coloração por SybrSafe DNA Gel Stain (Invitrogen), em TAE 0,5% (p/v), durante 30 minutos a uma voltagem de 100V, seguida de observação sob luz U.V. e registro fotográfico.

#### **4.10.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) do tipo BOX**

O experimento de BOX-PCR foi realizado utilizando iniciadores de sequências genômicas repetitivas do tipo BOX de aproximadamente 154pb, diferenciando os isolados em nível de estirpe (Versalovic *et al.*, 1994). Este tipo de reação amplia as regiões conservadas e repetitivas do DNA.

(De Bruijn *et al.*,1996) demonstraram que a metodologia de BOX-PCR, é extremamente rápida e eficaz para distinguir as estirpes relacionadas e que possuem características fenotípicas similares.

Sendo assim, apesar do fato desta ferramenta diferenciar os isolados em nível de estirpe, este ensaio foi adotado como critério de pré-seleção dos isolados para o sequenciamento, uma vez que, se eles apresentarem o mesmo padrão de bandas significa dizer que estes são estirpes da mesma espécie, não sendo necessário assim, sequenciar todas as estirpes de uma mesma espécie.

Todavia, se eles apresentarem padrões de bandas diferentes, indica que eles são de estirpes diferentes, porém eles podem ser de uma mesma espécie, e esta informação será apenas comprovada com o sequenciamento.

Portanto, apenas aqueles isolados que apresentaram um padrão de bandas diferentes foram sequenciados. O iniciador utilizado foi o BOX A1R (CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G) e a mistura para a PCR foi preparada usando os seguintes volumes, Tabela 4.5.

**Tabela 4.5:** Reagentes utilizados para a preparação da mistura de reação da PCR, para a amplificação das seqüências repetitivas do tipo BOX contidas no genoma.

<i>Componentes</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração estoque</i>
Água Milli – Q	15,75µL	-
Tampão	2,5µL	10x
MgCl <sub>2</sub>	3,75µL	25mM
dNTPs	0,5µL	10mM
Primer Box	0,5µL	127nmol
<i>Taq</i> polimerase	0,25µL	5u/µL

O volume da reação foi completado com 0,5 µL de DNA das amostras, resultando em um volume final de 25 µL. A reação de PCR foi realizada de acordo com o seguinte programa: 7 minutos a 94°C para a desnaturação; 35 ciclos sendo 94°C por 1 minuto, 53°C

por 1 minuto, 65°C por 8 minutos e a etapa de extensão final a 65°C por 16 minutos (Versalovic, *et al.*,1994). Após a amplificação, os produtos foram armazenados a 4°C. Posteriormente, os mesmos foram submetidos à eletroforese em gel de acrilamida a 6% (p/v) corado com prata, durante 2 horas a uma voltagem de 100 V, em TBE 1,0% (p/v). Os resultados foram observados e registrados por meio de fotografias.

#### **4.10.4. Análise de similaridade dos perfis genômicos dos isolados UPGMA**

Para a determinação da similaridade dos perfis genômicos dos isolados obtidos após a eletroforese dos produtos de PCR resultantes da amplificação de sequências 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).

#### **4.10.5. Sequenciamento do DNA**

O sequenciamento do DNA das estirpes selecionadas foi realizado a partir dos produtos das amplificações (PCR) utilizando os iniciadores das extremidades (5`-GAG AST TGA TCM TGG CTC AG-3`) e 1541R (5`-AGG AGG TGA TCA GCC-3`) (Embley, 1991) Os produtos de PCR resultantes foram então purificados usando o “Kit Ultra Clean PCR Cleanup, MOBIO”, seguindo o protocolo proposto pelo fabricante. Posteriormente estes amplicons foram quantificados em espectrofotômetro especializado para este tipo de análise (Nanovue, GE). Cada reação de sequenciamento foi realizada em um sequenciador automático MEGABACE. As sequências obtidas foram analisadas nos programas BLASTn ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) e Genbank para o alinhamento das mesmas com sequências depositadas no seu banco de dados.

#### **4.10.6. Análise filogenética**

Para a montagem da árvore filogenética, foram reunidas as sequências de DNA que codificam para o RNAr 16S dos 7 isolados nesse estudo e suas respectivas espécies de referência obtidas no Banco de dados GenBank.

Todas as sequências foram alinhadas usando o programa CLUSTALW (Aiyar, 2000) inserido no pacote de programas MEGA 4.0. (Tamura *et al.*, 2007). Após o alinhamento, as sequências foram editadas, usando o software de edição do MEGA 4.0, com o objetivo de padronizar seus tamanhos, evitando a ocorrência de “gaps” muito extensos. As sequências devidamente alinhadas e editadas foram então submetidas a dois métodos de reconstrução filogenética, para comparação de resultados, sendo estes o método Neighbor-Joining (Gascuel & Steel, 2006), que analisa as distâncias entre todos os pares de sequências, e o método de Máxima Parsimônia, que analisa os caracteres com base na ancestralidade comum. Ambos os métodos consideraram a análise de 500 árvores (“bootstrap”) resultando em uma árvore-consenso.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Enumeração das populações bacterianas isoladas das amostras coletadas no Continente Antártico**

Os valores em UFC/g de solo, obtidos após a contagem dos isolados em meio rico (TSA) e em meio seletivo (BSM suplementado com DBT), estão mostrados na Tabela 5.1. A contagem dos microrganismos totais em meio TSA variou entre  $10^3$  a  $10^8$  UFC/g de solo, sendo observada uma grande variação entre os números das populações encontradas nos diferentes tipos de amostras de solo e sedimentos.

Já as contagens em meio BSM suplementado com DBT apresentaram, de modo geral, valores entre 10 a  $10^4$  vezes menores do que aqueles obtidos nas contagens em meio rico. No entanto, no caso dos microrganismos selecionados de amostras contaminadas com petróleo (Amostra 19, 20 e 21), os isolamentos apresentaram valores de contagem entre 10 e  $10^2$  vezes maiores do que as demais amostras livres de contaminação com óleo.

De uma quantidade inicial de 21 amostras de solo e sedimentos, em 8 amostras não foi observado crescimento em BSM e os ensaios seguintes não foram realizados. As 13 amostras restantes que apresentaram crescimento microbiano positivo em meio seletivo, totalizou uma população de 50 isolados.

Vale ressaltar que foi observada a presença de actinomicetos nas amostras 3, 6 e 7, juntamente com as outras bactérias cultivadas em placa de Petri. No entanto, não houve a possibilidade de realizar a contagem em UFC/g uma vez que estes microrganismos apresentam um crescimento cúbico incrustado no ágar, impossibilitando assim, a contagem destes e um posterior isolamento.

**Tabela 5.1:** Enumeração de populações bacterianas isoladas das amostras de solo e sedimentos do Continente Antártico.

<i>Amostras</i>	<i>UFC/g de solo (TSA)</i>	<i>UFC/g de solo (BSM+DBT)</i>
<b>Amostra 1</b>	10 <sup>5</sup>	AC
<b>Amostra 2</b>	10 <sup>5</sup>	AC
<b>Amostra 3</b>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>
<b>Amostra 4</b>	10 <sup>5</sup>	AC
<b>Amostra 5</b>	10 <sup>5</sup>	AC
<b>Amostra 6</b>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>
<b>Amostra 7</b>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
<b>Amostra 8</b>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>
<b>Amostra 9</b>	10 <sup>3</sup>	AC
<b>Amostra 10</b>	10 <sup>3</sup>	AC
<b>Amostra 11</b>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
<b>Amostra 12</b>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>
<b>Amostra 13</b>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
<b>Amostra 14</b>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>4</sup>
<b>Amostra 15</b>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>
<b>Amostra 16</b>	10 <sup>5</sup>	AC
<b>Amostra 17</b>	10 <sup>5</sup>	AC
<b>Amostra 18</b>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>
<b>Amostra 19</b>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>
<b>Amostra 20</b>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup>
<b>Amostra 21</b>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>

\*AC= ausência de crescimento

## 5.2. Caracterização fenotípica

Para a caracterização fenotípica dos 50 representantes dos isolados provenientes das amostras que apresentaram crescimento em BSM suplementado com DBT, foram realizadas caracterizações quanto à coloração diferencial de Gram, observação da

morfologia, arranjo colonial e presença de inclusões de enxofre, (Tabela 5.2). As lâminas de coloração diferencial de Gram foram registradas por meio de fotografias e estão disponíveis, em anexo ao final desta dissertação, para observação.

**Tabela 5.2:** Resultados de coloração de Gram, descrição morfológica e arranjo colonial e presença de inclusões de enxofre dos isolados a partir das amostras de solo e sedimento do Continente Antártico.

<i>Isolados</i>	<i>Coloração de Gram</i>	<i>Morfologia/Arranjo</i>	<i>Inclusões de S</i>
A3-14	Variável	Cocos e Diplococos	Ausente
A3-15	-	Cocos	Ausente
A3-16	-	Cocos	Ausente
A3-17	Variável	Cocos e Diplococos	Ausente
A6-6	+	Bacilos	Ausente
A6-7	Variável	Bacilos	Ausente
A6-8	+	Bacilos	Ausente
A6-9	Variável	Bacilos	Ausente
A7-10	-	Cocos	Ausente
A7-11	-	Cocos	Ausente
A7-12	Variável	Microbacilos	Ausente
A7-13	-	Cocos	Ausente
A8-1	-	Microbacilos	Ausente
A8-2	-	Microbacilos	Ausente
A8-3	+	Estafilococos	Ausente
A8-4	+	Cocos	Ausente
A11-1	-	Cocos	Ausente
A11-2	-	Estafilococos	Ausente
A11-3	+	Cocos	Ausente
A11-4	+	Cocos	Ausente
A12-1	Variável	Cocos	Ausente
A12-2	+	Cocos	Ausente
A12-3	+	Cocos	Ausente
A12-4	-	Estafilococos	Ausente
A13-1	-	Cocos	Ausente

A13-2	+	Cocos	Ausente
A13-3	-	Cocos	Ausente
A13-4	Variável	Cocos	Ausente
A13-5	-	Cocos	Ausente
A14-1	-	Cocos	Ausente
A14-2	+	Cocos	Ausente
A14-3	-	Microbacilos	Ausente
A14-4	+	Cocos	Ausente
A14-5	-	Microbacilos	Ausente
A15-1	-	Estafilococos	Ausente
A15-2	+	Estafilococos	Ausente
A15-3	-	Cocos	Ausente
A15-4	-	Cocos	Ausente
A18-1	+	Estafilococos	Ausente
A19-1	+	Cocos	Ausente
A19-2	+	Bacilos	Ausente
A20-1	+	Cocos e Diplococos	Ausente
A20-2	+	Cocos	Ausente
A20-3	+	Cocobacilos	Ausente
A20-4	+	Estafilococos	Ausente
A20-5	+	Microbacilos	Ausente
A21-1	+	Bacilos	Ausente
A21-2	-	Bacilos	Ausente
A21-3	-	Bacilos	Ausente
A21-4	+	Bacilos	Ausente

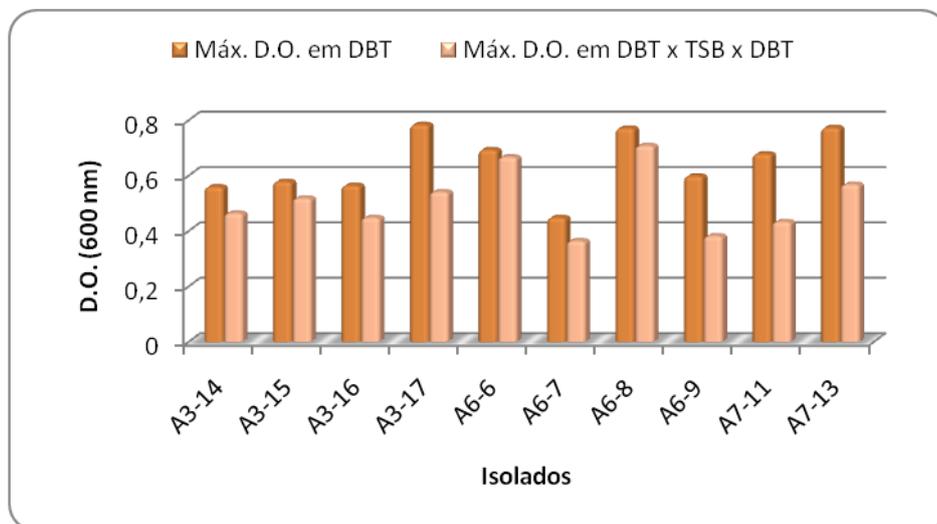
+ : Gram-positivos

- : Gram-negativos

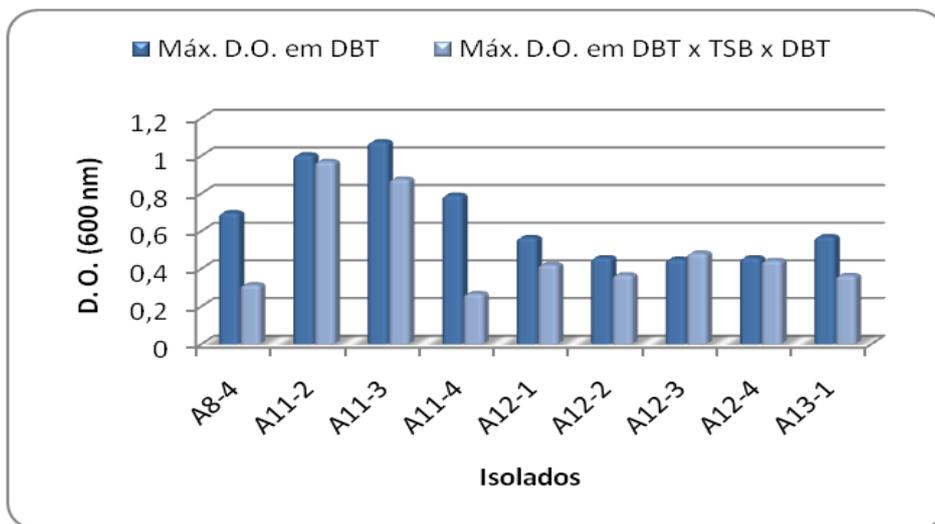
### 5.3. Caracterização bioquímica e metabólica

O teste presuntivo para a detecção de fluorescência emitida pelos isolados em caldo BSM suplementado com DBT, no caso de resultado positivo, sugere a produção do composto 2-HBP na presença das enzimas que catalizam a utilização do DBT pela via 4S. Neste estudo, este teste apresentou resultados negativos, uma vez que os isolados não apresentaram emissão de fluorescência quando submetidos à luz U.V.

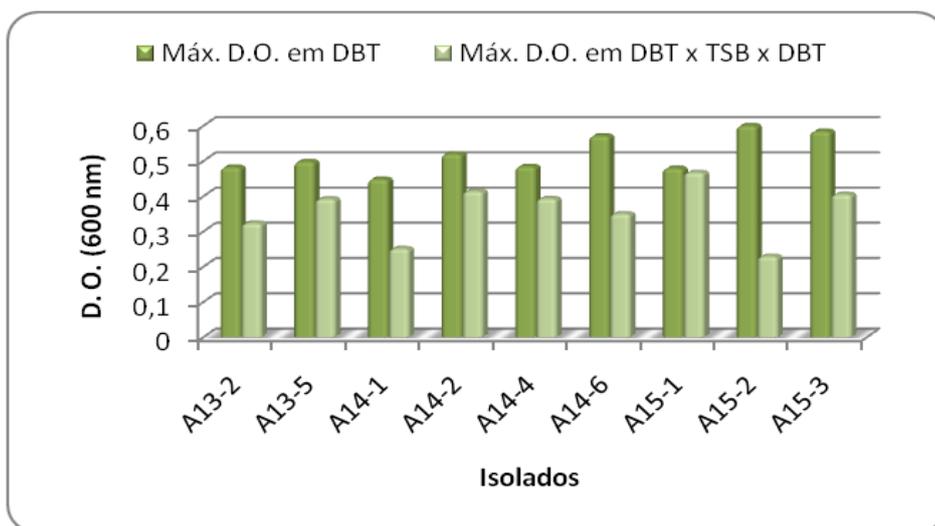
Outro teste realizado, objetivando a observação de uma possível perda da capacidade de dessulfurização pelas estirpes obtidas revelou que, após as sucessivas passagens em meio rico em nutrientes (TSB), de um modo geral, os isolados apresentaram densidade óptica menor da que a observada quando estas foram mensuradas apenas em caldo BSM suplementado com DBT, (Figuras 5.1; 5.2; 5.3; 5.4).



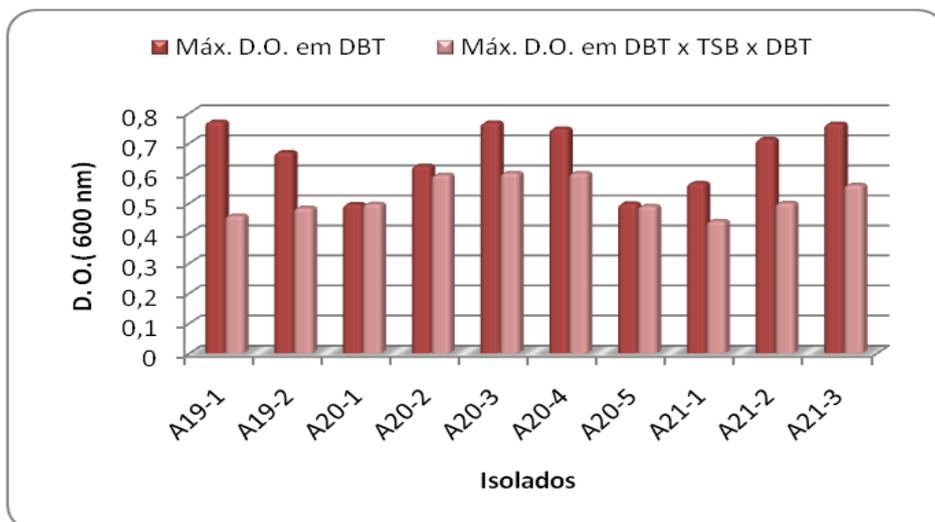
**Figura 5.1:** Teste metabólico dos isolados A3-14, A3-15, A3-16, A3-17, A6-6, A6-7, A6-8, A6-9, A7-11, A7-13 em caldo BSM suplementado com DBT verificando a possível perda da capacidade de dessulfurização, após serem submetidos a sucessivas passagens em meio rico (TSB).



**Figura 5.2:** Teste metabólico dos isolados A8-4, A11-2, A11-3, A11-4, A12-1, A12-3, A12-4, A13-1 em caldo BSM suplementado com DBT verificando a possível perda da capacidade de dessulfurização, após serem submetidos a sucessivas passagens em meio rico (TSB).

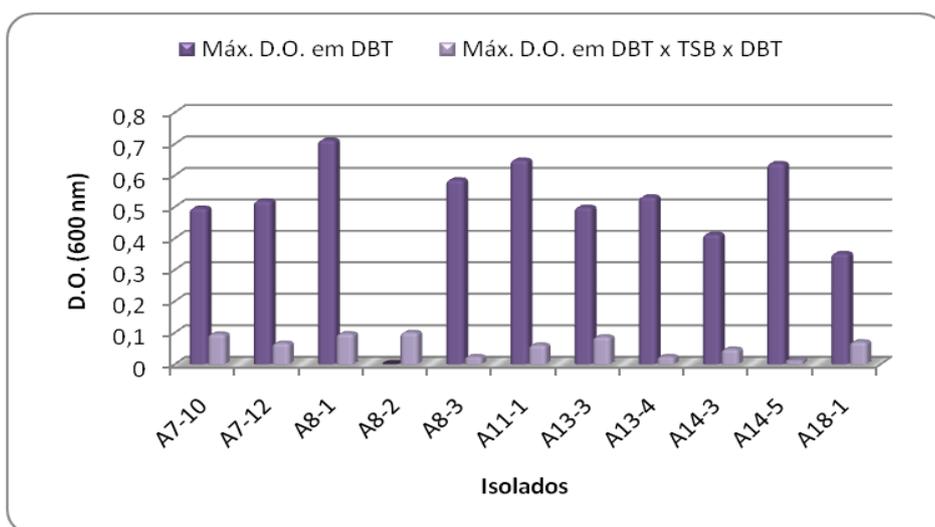


**Figura 5.3:** Teste metabólico dos isolados A13-2, A13-5, A14-1, A14-4, A14-6, A15-1, A15-2, A15-2 em caldo BSM suplementado com DBT verificando a possível perda da capacidade de dessulfurização, após serem submetidos a sucessivas passagens em meio rico (TSB).



**Figura 5.4:** Teste metabólico dos isolados A19-1, A19-2, A20-1, A20-2, A20-3, A20-4, A20-5, A21-1, A21-2, A21-3 em caldo BSM suplementado com DBT verificando a possível perda da capacidade de dessulfurização, após serem submetidos a sucessivas passagens em meio rico (TSB).

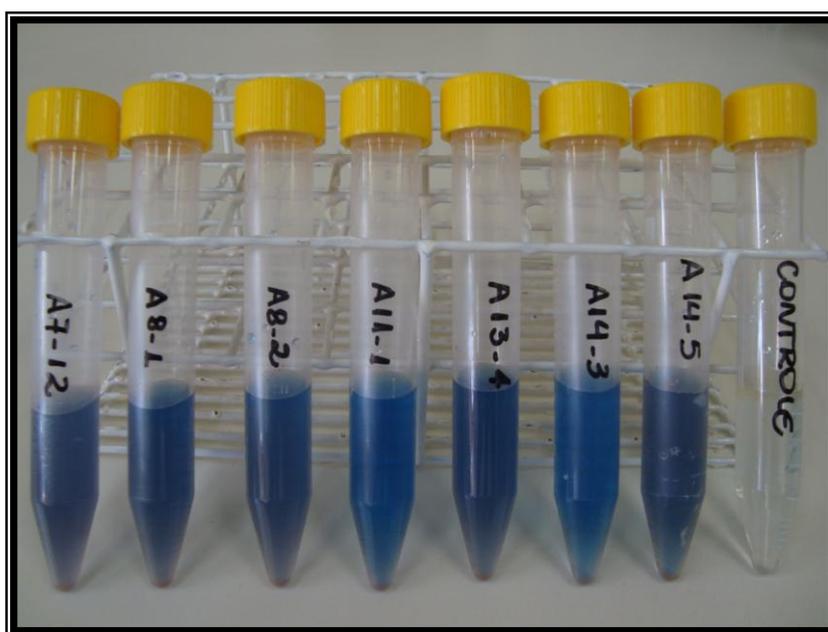
Baseado neste teste pode-se destacar também algumas estirpes que apresentaram valores de densidade óptica abaixo de 0,1 de absorvância após serem cultivadas em meio TSB e reinoculadas em caldo BSM suplementado com DBT (Figura 5.5).



**Figura 5.5:** Teste metabólico dos isolados A7-10, A7-12, A8-1, A8-2, A8-3, A11-1, A13-3, A13-4, A14-3, A14-5, A18-1 em caldo BSM suplementado com DBT verificando a possível perda da capacidade de dessulfurização, após serem submetidos a sucessivas passagens em meio rico (TSB).

#### 5.4. Ensaio de Gibb's

O resultado da atividade de dessulfurização do DBT foi constatado pelo Ensaio de Gibb's, que se mostrou positivo para os isolados A7-12, A8-1, A8-2, A11-1, A13-4, A14-3 e A14-5. Este tipo de ensaio é considerado seletivo e diferencial, uma vez que se podem selecionar as estirpes com capacidade de produção do 2-HBP, que por sua vez é detectado por este reagente produzindo uma forte coloração azul, após a incubação de 30°C, (Figura 5.6).



**Figura 5.6:** Resultado positivo para o “Ensaio de Gibb’s” aos quais os sete isolados (A7-10, A8-1, A8-2, A11-1, A13-4, A14-3, A14-5) e o controle negativo foram submetidos, evidenciando a formação do 2-HBP (produto da via metabólica específica de dessulfurização) através da coloração azul formada após 30 minutos de incubação, à temperatura de 30°C.

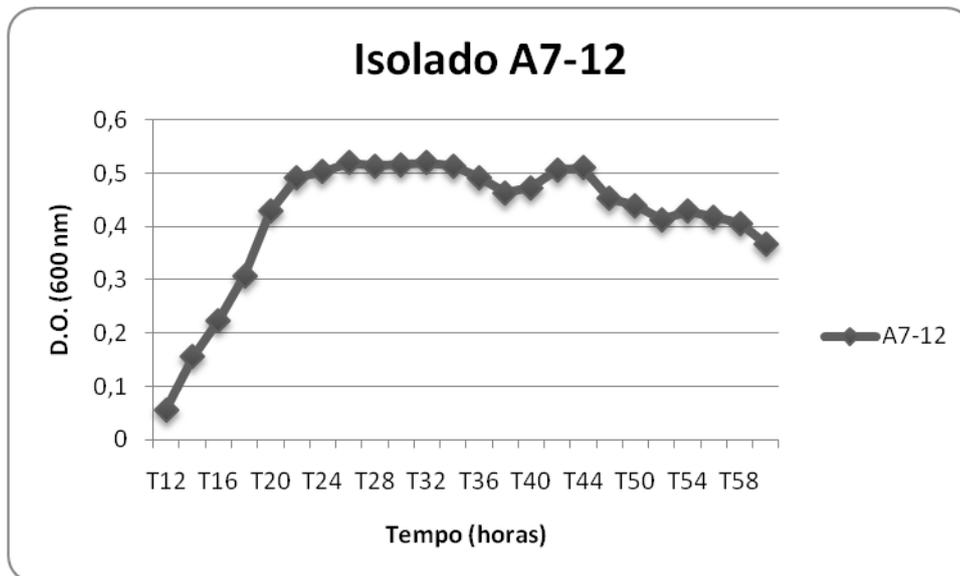
Posteriormente, a solução azul obtida foi lida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 610nm, revelando a absorbância de cada isolado. Em seguida, os valores de absorbância obtidos foram convertidos em ppm através da curva padrão construída, Tabela 5.3.

**Tabela 5.3:** Conversão dos valores de absorvância em ppm obtidos dos isolados após 60 horas de seu crescimento.

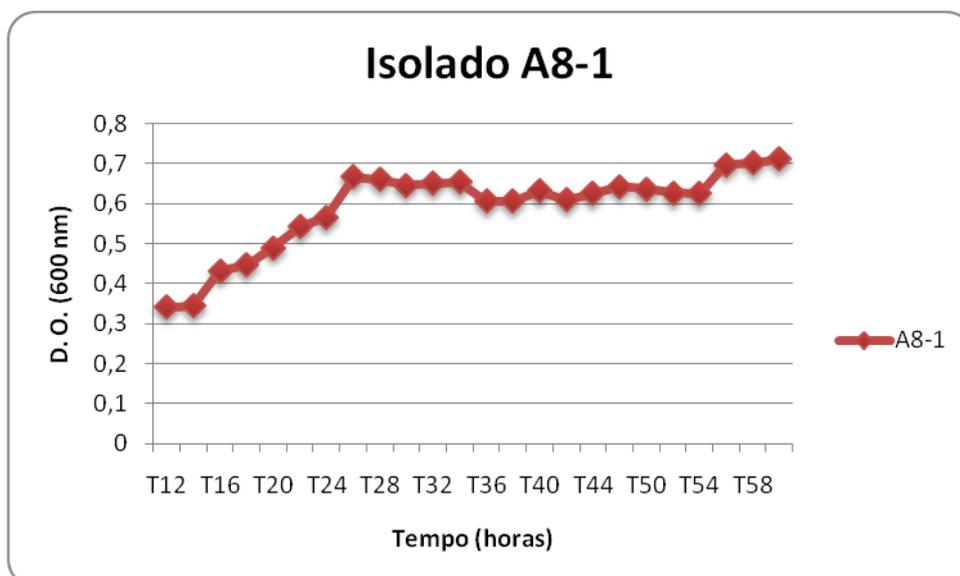
<i>Isolado (após 60h de crescimento)</i>	<i>Absorvância (610 nm)</i>	<i>[2-HBP] (ppm)</i>
A7-12	0,432	48,22 ppm
A8-1	0,28	31,33 ppm
A8-2	0,311	34,77 ppm
A11-1	0,306	34,22 ppm
A13-4	0,374	41,77 ppm
A14-3	0,159	17,88 ppm
A14-5	0,238	26,66 ppm

### **5.5. Curva de crescimento dos isolados selecionados**

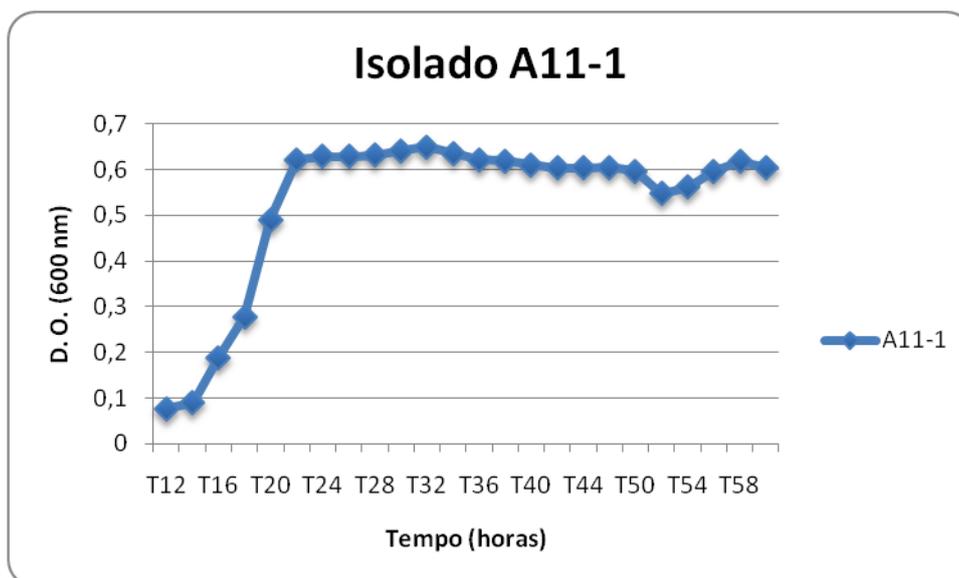
Os sete isolados selecionados pelo Ensaio de Gibb's foram novamente inoculados em caldo BSM suplementado com DBT, e somente após 12 horas de crescimento, as leituras em espectrofotômetro foram iniciadas para a construção das curvas de crescimento. Para uma melhor visualização dos resultados obtidos, os gráficos foram plotados com os seus respectivos isolados individualmente (Figuras 5.7; 5.8; 5.9; 5.10; 5.11; 5.12).



**Figura 5.7:** Curva de crescimento do isolado A7-12 em caldo BSM suplementado com DBT. As medidas de densidade óptica a 600nm (luz visível) foram realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo de 60 horas.



**Figura 5.8:** Curva de crescimento do isolado A8-1 em caldo BSM suplementado com DBT. As medidas de densidade óptica a 600nm (luz visível) foram realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo de 60 horas.



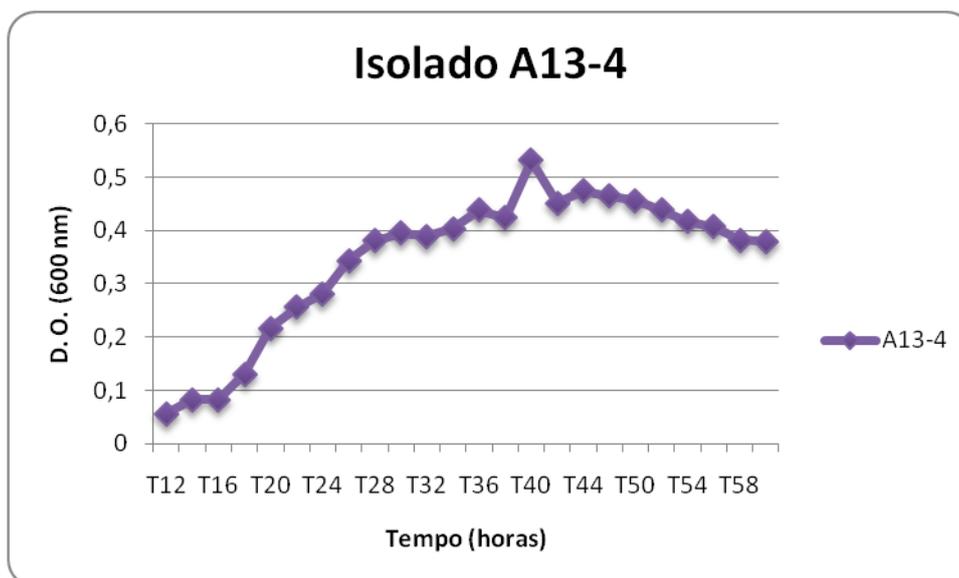
**Figura 5.9:** Curva de crescimento do isolado A11-1 em caldo BSM suplementado com DBT. As medidas de densidade óptica a 600nm (luz visível) foram realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo de 60 horas.

Dentre os sete isolados que foram submetidos à confecção da curva de crescimento, pode-se destacar a estirpe A8-1, A11-1 e o A13-4 que apresentaram uma D.O. superior a 0,6 de absorbância. Já os demais, apresentaram valores de D.O. iguais ou inferiores à 0,5 de absorbância.

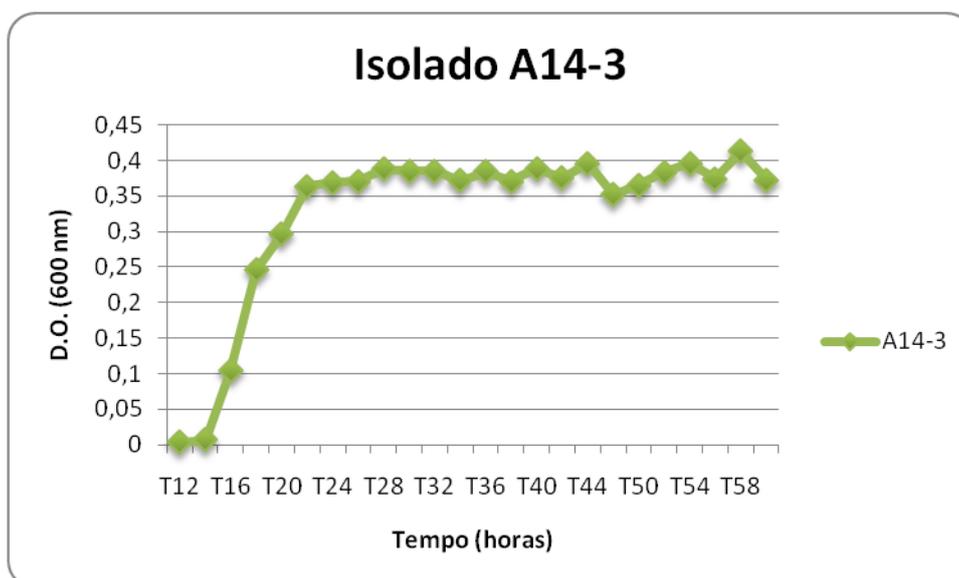
Os isolados A7-12, A11-1 e A14-3 iniciaram o crescimento com uma D.O. baixa, seguida de um rápido crescimento na fase exponencial e eles atingiram a fase estacionária no tempo de 22 horas de crescimento.

A Figura 5.8 mostra que o isolado A8-1, no tempo de início das leituras espectrofotométricas, apresentou uma D.O. em torno de 0,3, não evidenciando uma fase exponencial rápida e, logo após, atingiu a fase estacionária no patamar de 0,65 de absorbância.

O isolado A13-4 (Figura 5.10) apresentou uma característica diferenciada no tempo de 38 horas da fase estacionária, pois mesmo após atingir esta fase após mais de 24 horas de crescimento, ele apresentou um pico de 0,55 de absorbância, no momento em que foi realizado a leitura em espectrofotômetro.

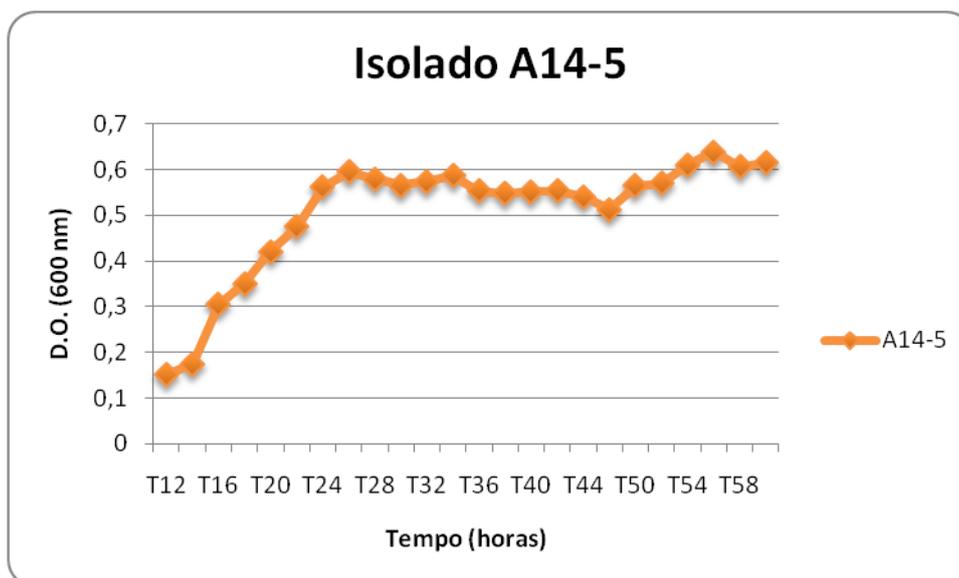


**Figura 5.10:** Curva de crescimento do isolado A13-4 em caldo BSM suplementado com DBT. As medidas de densidade óptica a 600nm (luz visível) foram realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo de 60 horas.



**Figura 5.11:** Curva de crescimento do isolado A14-3 em caldo BSM suplementado com DBT. As medidas de densidade óptica a 600nm (luz visível) foram realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo de 60 horas.

As leituras de D.O. do isolado A14-5 (Figura 5.12) mostraram que ele apresentou uma fase exponencial longa, pois somente no tempo de 28 horas foi que ele iniciou a fase estacionária do seu crescimento, sendo esta em torno de 0,6 de absorvância.



**Figura 5.12:** Curva de crescimento do isolado A14-5 em caldo BSM+ DBT. As medidas de densidade óptica a 600nm (luz visível) foram realizadas 12 horas após a inoculação e foram feitas até o tempo de 60 horas.

O isolado A8-2 (Figura 5.13) apresentou uma característica bastante peculiar, quando comparado com os outros isolados selecionados. Durante as leituras de densidade óptica das estirpes, este isolado em particular não apresentou valores positivos de absorvância, permanecendo no valor zero.

Este comportamento pode ser explicado em função da sua característica fenotípica de ser uma colônia bacteriana transparente, fato este que influenciou na leitura de absorvância. Após ter sido constatado a sua presença no inóculo, quando este foi plaqueado em ágar BSM suplementado com DBT, optou-se por confeccionar uma curva de crescimento baseada na presença de células viáveis naquela cultura.

Desde modo, pode-se observar neste tipo de curva, a fase de declínio celular, uma vez que na fase final do metabolismo microbiano não são observadas a presença de células capazes de se multiplicar.

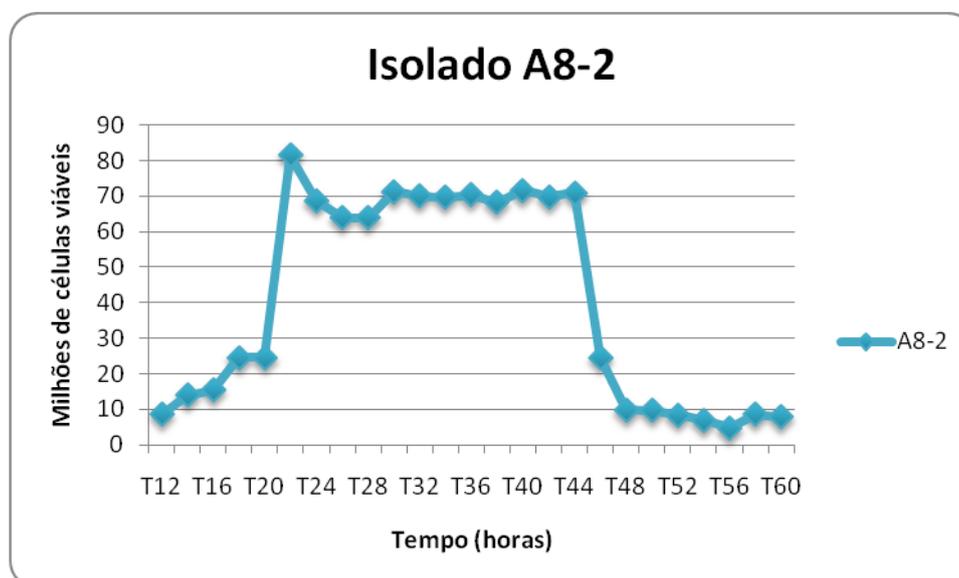
Para a construção específica desta curva, alíquotas da cultura em caldo BSM suplementado com DBT foram coletadas em intervalos de 2 horas, submetidas a uma diluição seriada e posteriormente plaqueadas em ágar BSM suplementado com DBT, na ordem de  $10^{-3}$ . Após a incubação a  $27^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas, a contagem em UFC/mL foi feita e os resultados estão listados na Tabela 5.4. A Figura 5.13 evidencia todas as fases da

curva de crescimento bacteriano: fase *lag*, fase exponencial, fase estacionária, e por último a fase de declínio celular.

**Tabela 5.4:** Estimativa das células viáveis do isolado bacteriano A8-2 em intervalos de plaqueamento de 2 horas, a partir do tempo de 12 horas após a inoculação em caldo BSM suplementado com DBT.

<i>Tempo (horas)</i>	<i>Estimativa das células viáveis (UFC/mL)</i>
T12	$8,5 \times 10^6$
T14	$1,4 \times 10^7$
T16	$1,55 \times 10^7$
T18	$2,45 \times 10^7$
T20	$2,46 \times 10^7$
T22	$8,16 \times 10^7$
T24	$6,88 \times 10^7$
T26	$6,40 \times 10^7$
T28	$6,46 \times 10^7$
T30	$7,12 \times 10^7$
T32	$7,01 \times 10^7$
T34	$6,96 \times 10^7$
T36	$7,04 \times 10^7$
T40	$6,83 \times 10^7$
T42	$7,16 \times 10^7$
T44	$6,98 \times 10^7$
T46	$7,09 \times 10^7$
T48	$2,46 \times 10^7$
T50	$9,8 \times 10^6$
T52	$9,6 \times 10^6$
T54	$8,4 \times 10^6$
T56	$6,9 \times 10^6$
T58	$4,7 \times 10^6$
T60	$8,6 \times 10^6$

O resultado mostra que no tempo de 22 horas de crescimento a estirpe apresentou em torno de 80 milhões de células viáveis para a multiplicação celular. Após a fase estacionária, que permaneceu no patamar de 70 milhões de células, o isolado entrou na fase de declínio celular no tempo de 42 horas. Até o término das leituras, no tempo de 60 horas, o isolado apresentou valores inferiores a 10 milhões de células viáveis.



**Figura 5.13:** Curva de crescimento do isolado A8-2, baseado no cultivo de células viáveis, evidenciando as fases do crescimento microbiano.

### 5.5. Cálculo do tempo de geração (g) do isolado A8-2

Como o isolado A8-2 apresentou um comportamento morfológico peculiar de colônias transparentes, que levou à construção de uma curva de crescimento diferenciada, baseada na estimativa de células viáveis, pode ser realizado o cálculo do tempo de geração desta estirpe.

O tempo de geração (g) é o tempo necessário para que uma população se duplique. Desta forma, para que alguns cálculos pudessem ser feitos, algumas equações foram utilizadas, até que se obtivesse o resultado final do tempo de geração do isolado A8-2.

**Logo:**

$$N = N_0 2^n \Rightarrow n = 3,3 (\log N - \log N_0)$$

$$g = t/n$$

**Onde:**

N= número final de células

$N_0$ = número inicial de células

n= número de gerações

g= tempo de geração

t= horas/minutos de crescimento exponencial

**Logo:**

$$n = 3,3 (\log N - \log N_0)$$

$$n = 3,3 (\log 8,16 \cdot 10^7 - \log 8,5 \cdot 10^6)$$

$$n = 3,3 (\log 8,16 \cdot 10^7) / (\log 0,85 \cdot 10^7)$$

$$n = 3,3 (\log 9,6)$$

$$n = 3,3 (0,983)$$

$$n = 3,241$$

**Assim:**

$$g = t/n$$

$$g = 10 / 3,241$$

$$g = 3,085 \text{ horas}$$

Desta forma, obteve-se como tempo de geração para a estirpe A8-2, o tempo de aproximadamente 3,085 horas.

## 5.6. Análise quantitativa do teor do metal enxofre presente nas amostras de solo e sedimentos

As análises do teor de enxofre das amostras, na qual se obteve resultado positivo para as estirpes com capacidade de dessulfurização, revelou uma quantidade superior de enxofre nas amostras 8 e 11 (Tabela 5.5). Este dado foi baseado no valor do limite de quantificação para este metal, que é da ordem de 10,1mg/kg de solo. Já as demais amostras (7, 13, e 14) apresentaram valores próximos na quantificação do enxofre, porém inferiores a 1000mg/Kg.

**Tabela 5.5:** Análise quantitativa do metal enxofre (mg/Kg) nos solos coletados no Continente Antártico, através de análise feita em ICP/AES.

<i>Amostras de solo</i>	<i>Procedência</i>	<i>Quantificação do S (mg/Kg)</i>
Amostra 7	Rizosfera ( <i>D. antarctica</i> )	940
Amostra 8	Rizosfera ( <i>C. quitensis</i> )	1095
Amostra 11	Solo da Costa Oceânica	1013
Amostra 13	Pinguineira	952
Amostra 14	Campo de musgos	997

Além disso, através de uma pré-análise química já realizada pelos pesquisadores Dr. Charles Greer (Biotechnology Research Centre. NRC. Montreal, Canadá), Dr. Paulo Negrais (Cenpes-Petrobras) e Dra. Vivian Pellizari (USP), foi revelado o teor dos HTP's (Hidrocarbonetos Totais do Petróleo) nos pontos de coleta. Esta amostragem foi também realizada em três profundidades diferentes do solo, mostrando uma variação de concentrações destes HTP's, (Tabela 5.6).

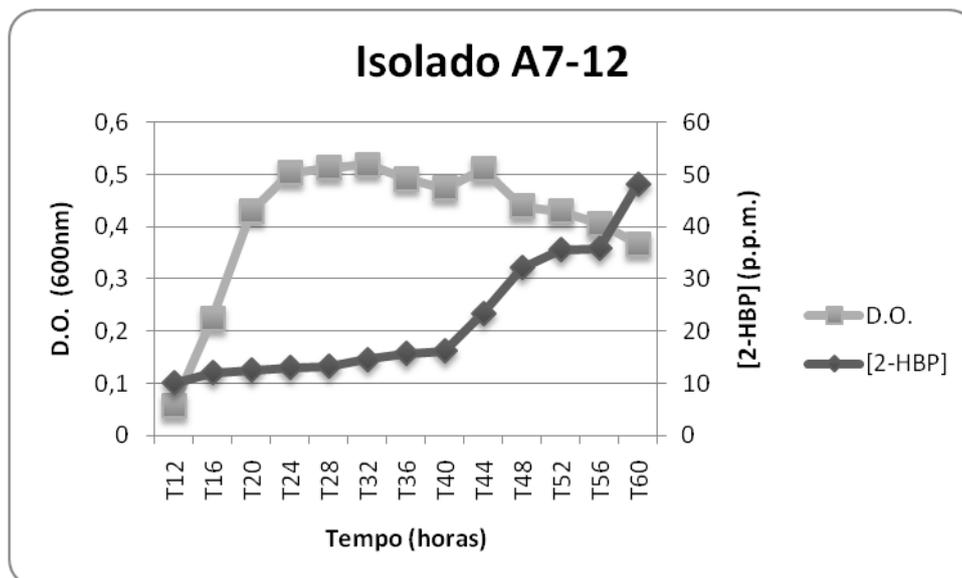
**Tabela 5.6:** Concentração de HPT's em três pontos (Figura 4.2) e profundidades do solo da área onde se localizam os tanques de armazenamento de combustível da EACF.

<i>Ponto de amostragem</i>	<i>Profundidade de amostragem (cm)</i>	<i>Concentração de HTP's (ppm)</i>	<i>Presença de HTPs (cheiro)</i>
Amostragem 03	10	16438	+
	40	20619	+
	80	18505	+
Amostragem 06	10-20	3854	-
	65	6027	-
Amostragem 07	14	5198	+
	34	6501	+

*Fonte: Relatório sobre o projeto de “Biorremediação de Solo contaminado com Hidrocarbonetos na Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF)”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Alexandre Soares Rosado, UFRJ/IMPPG/LEMM, Março de 2009.*

### **5.7. Curvas de quantificação da produção do 2-HBP pelos isolados em função do seu crescimento**

As curvas de produção do 2-HBP, interpostas com as curvas de crescimento dos isolados, revelaram de modo geral, a produção do composto de modo concomitante com o crescimento do microrganismo isolado. Desta forma, os gráficos mostram que o isolado A7-12 (Figura 5.14) foi aquele que apresentou a maior concentração de produção de 2-HBP, sendo esta em torno de 50ppm no momento em que a D.O. apresentou 0,35 de absorvância.

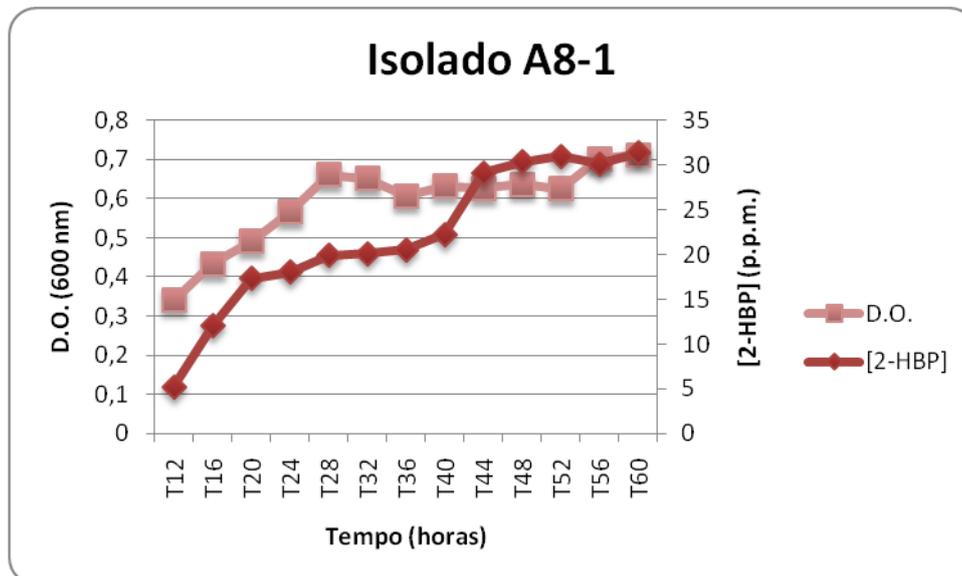


**Figura 5.14:** Curva de crescimento e curva de produção do 2-HBP do isolado A7-12, em caldo BSM suplementado com DBT e em caldo BSM suplementado com DBT e o Reagente de Gibb's, respectivamente. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro a 600nm e 610nm respectivamente, em intervalos de tempo de 4 horas.

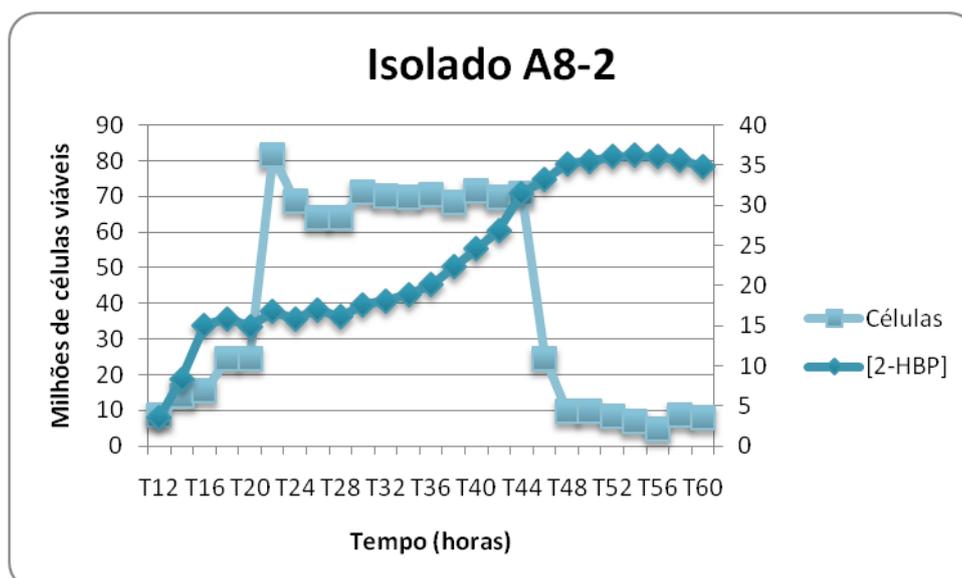
Os isolados A8-1, A8-2, A11-1 e A13-4 mostraram a formação de concentrações de 2-HBP parecidas, sendo que estas variaram entre 30 e 40ppm, com densidades ópticas semelhantes, variando entre 0,6 e 0,7 de absorvância, exceto para o isolado A13-4 que teve uma absorvância de 0,35.

Já o isolado A14-5 apresentou uma concentração de 25ppm de 2-HBP formado, com uma absorvância de 0,6, em um tempo de 60 horas.

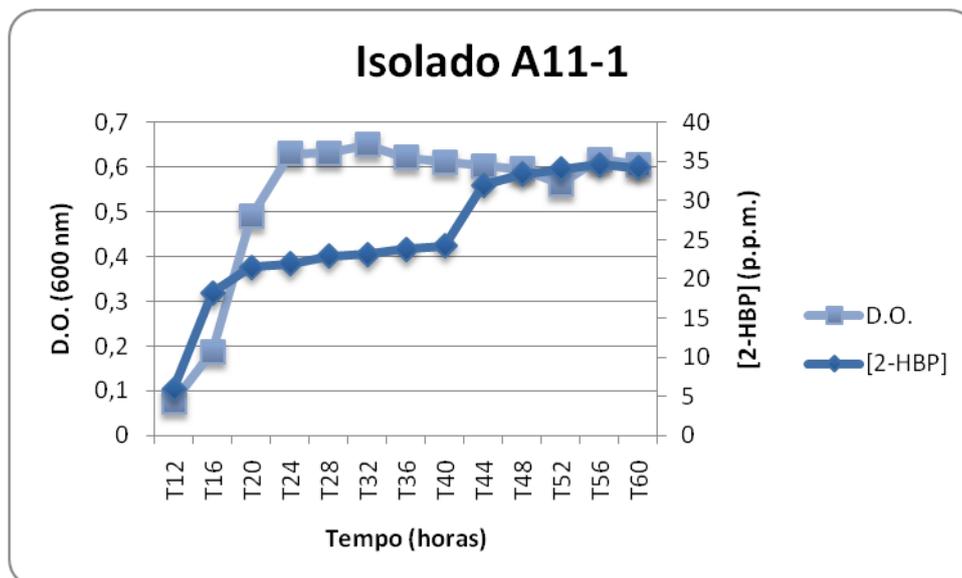
A Figura 5.19 mostra que o isolado que apresentou uma menor concentração de 2-HBP foi o A14-3, sendo esta em torno de 18ppm enquanto a sua absorvância por densidade óptica foi de 0,35, no tempo de 60 horas.



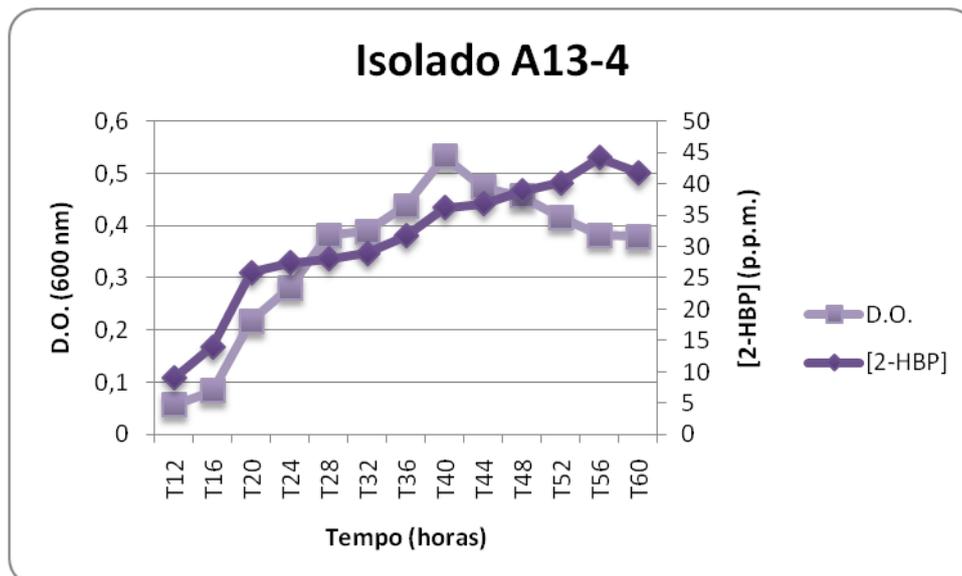
**Figura 5.15:** Curva de crescimento e curva de produção do 2-HBP do isolado A8-1, em caldo BSM suplementado com DBT e em caldo BSM suplementado com DBT e o Reagente de Gibb's, respectivamente. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro a 600nm e 610nm respectivamente, em intervalos de tempo de 4 horas.



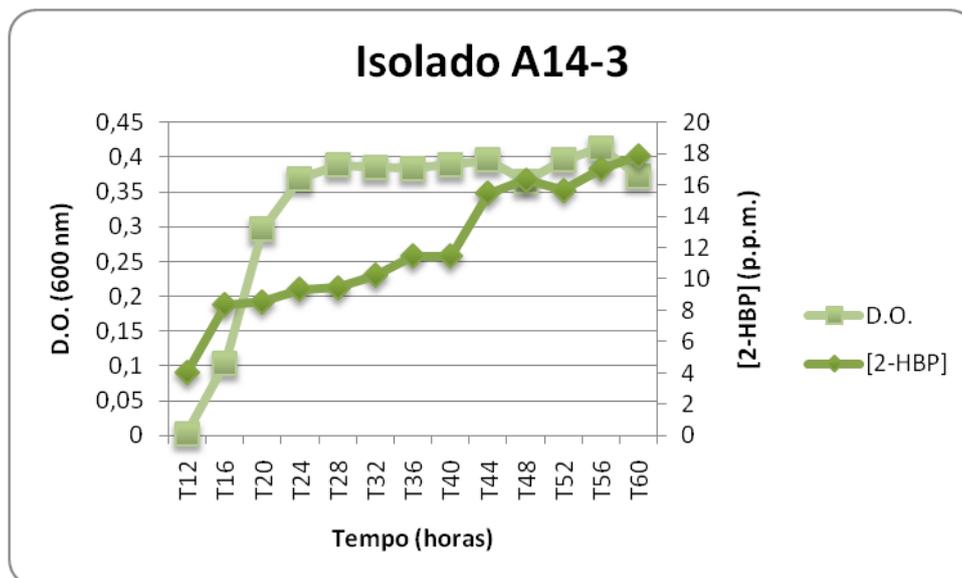
**Figura 5.16:** Curva de crescimento e curva de produção do 2-HBP do isolado A8-2, em caldo BSM suplementado com DBT e em caldo BSM suplementado com DBT e o Reagente de Gibb's, respectivamente. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro a 600nm e 610nm respectivamente, em intervalos de tempo de 2 horas.



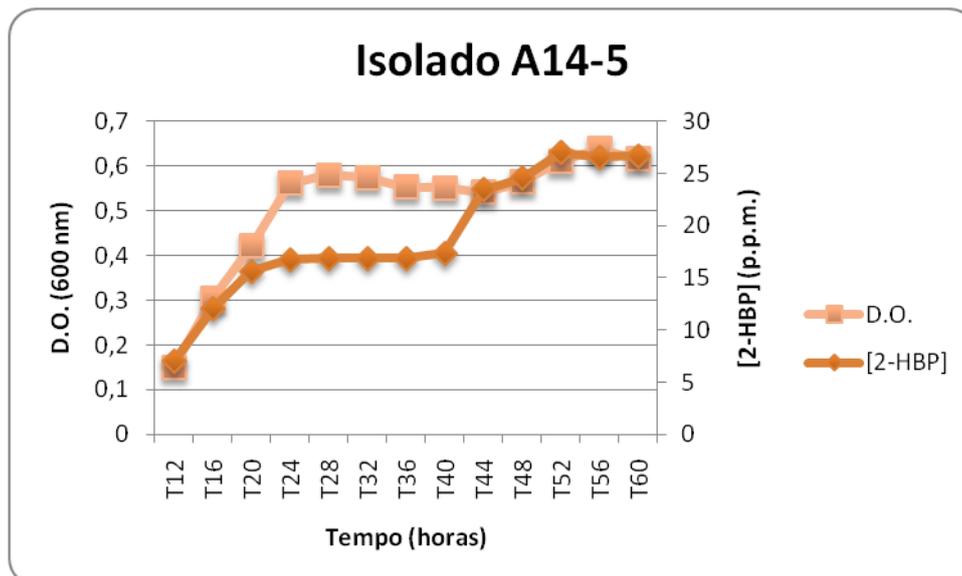
**Figura 5.17:** Curva de crescimento e curva de produção do 2-HBP do isolado A11-1, em caldo BSM suplementado com DBT e em caldo BSM suplementado com DBT e o Reagente de Gibb's, respectivamente. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro a 600nm e 610nm respectivamente, em intervalos de tempo de 4 horas.



**Figura 5.18:** Curva de crescimento e curva de produção do 2-HBP do isolado A13-4, em caldo BSM suplementado com DBT e em caldo BSM suplementado com DBT e o Reagente de Gibb's, respectivamente. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro a 600nm e 610nm respectivamente, em intervalos de tempo de 4 horas.



**Figura 5.19:** Curva de crescimento e curva de produção do 2-HBP do isolado A7-12, em caldo BSM suplementado com DBT e em caldo BSM suplementado com DBT e o Reagente de Gibb's, respectivamente. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro a 600nm e 610nm respectivamente, em intervalos de tempo de 4 horas.



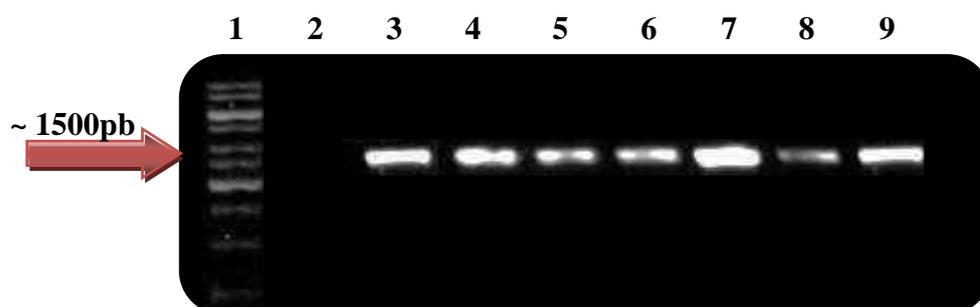
**Figura 5.20:** Curva de crescimento e curva de produção do 2-HBP do isolado A14-5, em caldo BSM suplementado com DBT e em caldo BSM suplementado com DBT e o Reagente de Gibb's, respectivamente. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro a 600nm e 610nm respectivamente, em intervalos de tempo de 4 horas.

Após a visualização dos gráficos, pode-se destacar também que, em quase todos os isolados, a concentração final de 2-HPB formado sempre coincidia com a densidade óptica mensurada em espectrofotômetro, exceto para a estirpe A13-4, que mostrou uma concentração final maior de 2-HBP quando comparado com a absorbância medida neste mesmo tempo (Figura 5.18). Em relação ao isolado A8-2, cujo o crescimento não pôde ser medido em espectrofotometria, o que se observou foi que a máxima concentração de 2-HBP (35ppm) foi quando o isolado obteve o máximo de sua população, sendo esta em torno de 80 milhões de células viáveis (Figura 5.16).

## 5.8. Caracterização Genotípica

### 5.8.1. Amplificação de fragmento do DNAr 16S

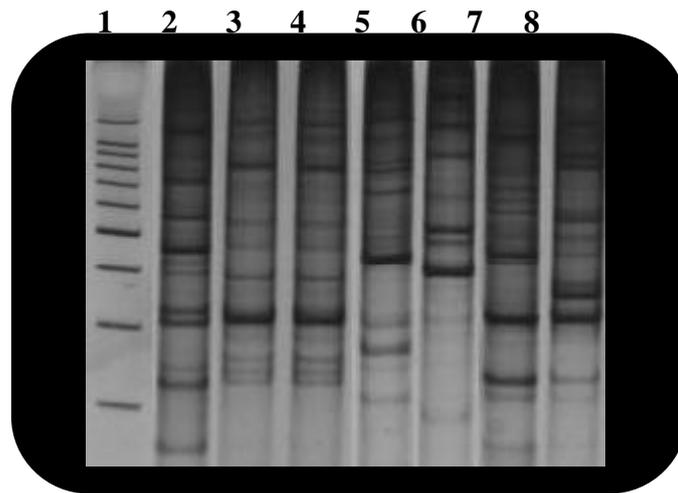
O gel de agarose (1% p/v) foi confeccionado no intuito de se verificar se houve a correta amplificação do produto da PCR do DNA extraído (Figura 5.21) e também para que estes amplicons fossem purificados e submetidos ao sequenciamento a partir dos iniciadores utilizados na reação da PCR. Neste gel, notou-se que todas as linhagens apresentaram amplificação com um tamanho de bandas aproximado de 1500 pares de base.



**Figura 5.21:** Eletroforese em gel de agarose (1% p/v) evidenciando os produtos de PCR com 1500pb amplificados com iniciadores para o DNAr 16S dos isolados. Canaletas: **1**, Marcador Molecular; **2**, Branco; **3**, Isolado A7-12 ; **4**, Isolado A8-1; **5**, Isolado A8-2 ; **6**, Isolado A11-1; **7**, Isolado A13-4; **8**, Isolado A14-3; **9**, Isolado A14-5.

### 5.8.2. Amplificação de sequência genômica repetitiva BOX

O gel de poliacrilamida (6%) foi confeccionado no intuito de se obter um perfil de bandas dos sete isolados, mostrando a diversidade genômica entre eles, (Figura 5.22). A análise do padrão de bandas do gel mostrou que os isolados A8-1 e A8-2 (canaletas 3 e 4 respectivamente) apresentaram o mesmo perfil genômico. Já os perfis das bandas dos outros isolados mostrados no gel revelaram um padrão genômico diferente.

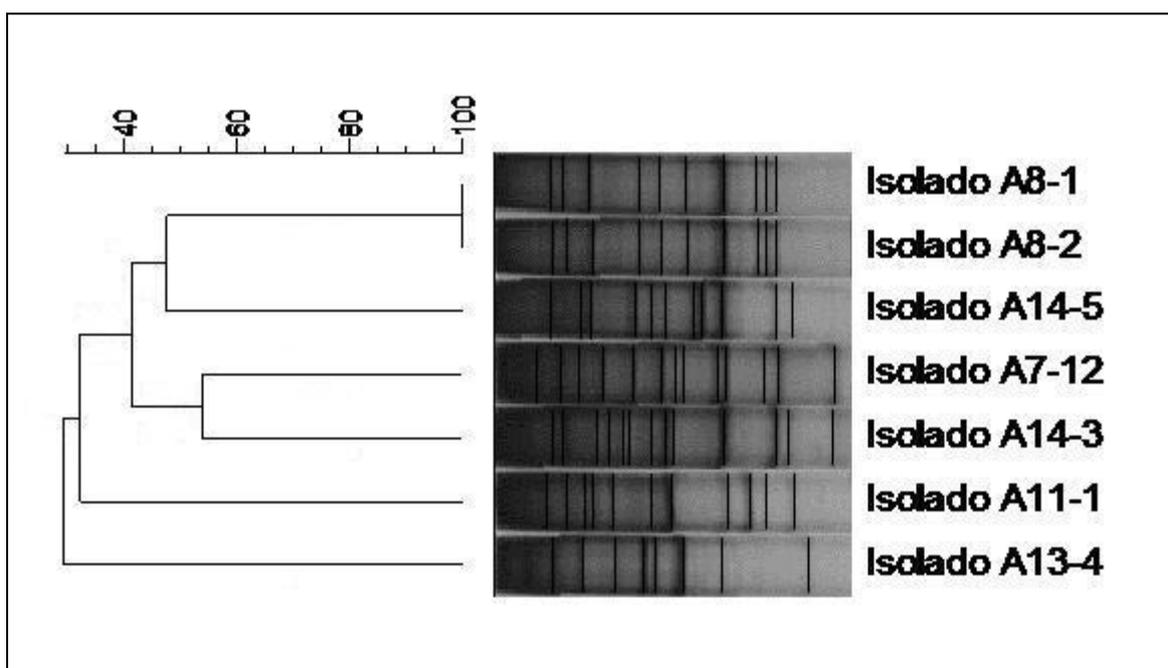


**Figura 5.22:** Eletroforese em gel de acrilamida (6% p/v) evidenciando os padrões de diversidade genômica obtidos através de experimentos de PCR com iniciadores repetitivos BOX. Canaletas: **1**, Peso Molecular; **2**, Isolado A7-12 ; **3**, Isolado A8-1; **4**, Isolado A8-2 ; **5**, Isolado A11-1; **6**, Isolado A13-4; **7**, Isolado A14-3; **8**, Isolado A14-5.

### 5.8.3. Análise de similaridade dos perfis genômicos dos isolados

A análise de similaridade dos padrões de bandas obtidos em gel de acrilamida, após amplificação dos DNA's dos isolados pela técnica de BOX-PCR, evidenciou a presença de formação de grupos com perfis 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 obtido (Figura 5.23), o UPGMA agrupou com 100% de similaridade o isolado A8-1 e A8-2. Já o isolado A14-5 apresentou 47,6% de similaridade com o grupo formado pelos isolados A8-1 e A8-2. O segundo grupo formado pelos isolados A7-12 e A14-3 apresentaram uma porcentagem de 53,8% de similaridade com o primeiro grupo. No entanto, os isolados A11-1 e A13-4 apresentaram perfis genômicos mais diferenciados dos demais, com similaridade de aproximadamente 30% em relação aos outros isolados analisados no gel.



**Figura 5.23:** Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, baseado na matriz de similaridade de DICE.

#### 5.8.4. Purificação e quantificação do produto de PCR - DNAr 16S

Os produtos de PCR - DNAr 16S resultantes foram então purificados e quantificados em espectrofotômetro Nanovue (GE), (Tabela 5.7).

**Tabela 5.7:** Quantificação em ng/ $\mu$ L do DNA amplificado pela reação de PCR e purificado, através do uso do espectrofotômetro Nanovue (GE).

<i>Isolados</i>	<i>Quantificação de DNA purificado (ng/<math>\mu</math>L)</i>
A7-12	29,5ng/ $\mu$ L
A8-1	27ng/ $\mu$ L
A8-2	31ng/ $\mu$ L
A11-1	33ng/ $\mu$ L
A13-4	41ng/ $\mu$ L
A14-3	28ng/ $\mu$ L
A14-5	39,5ng/ $\mu$ L

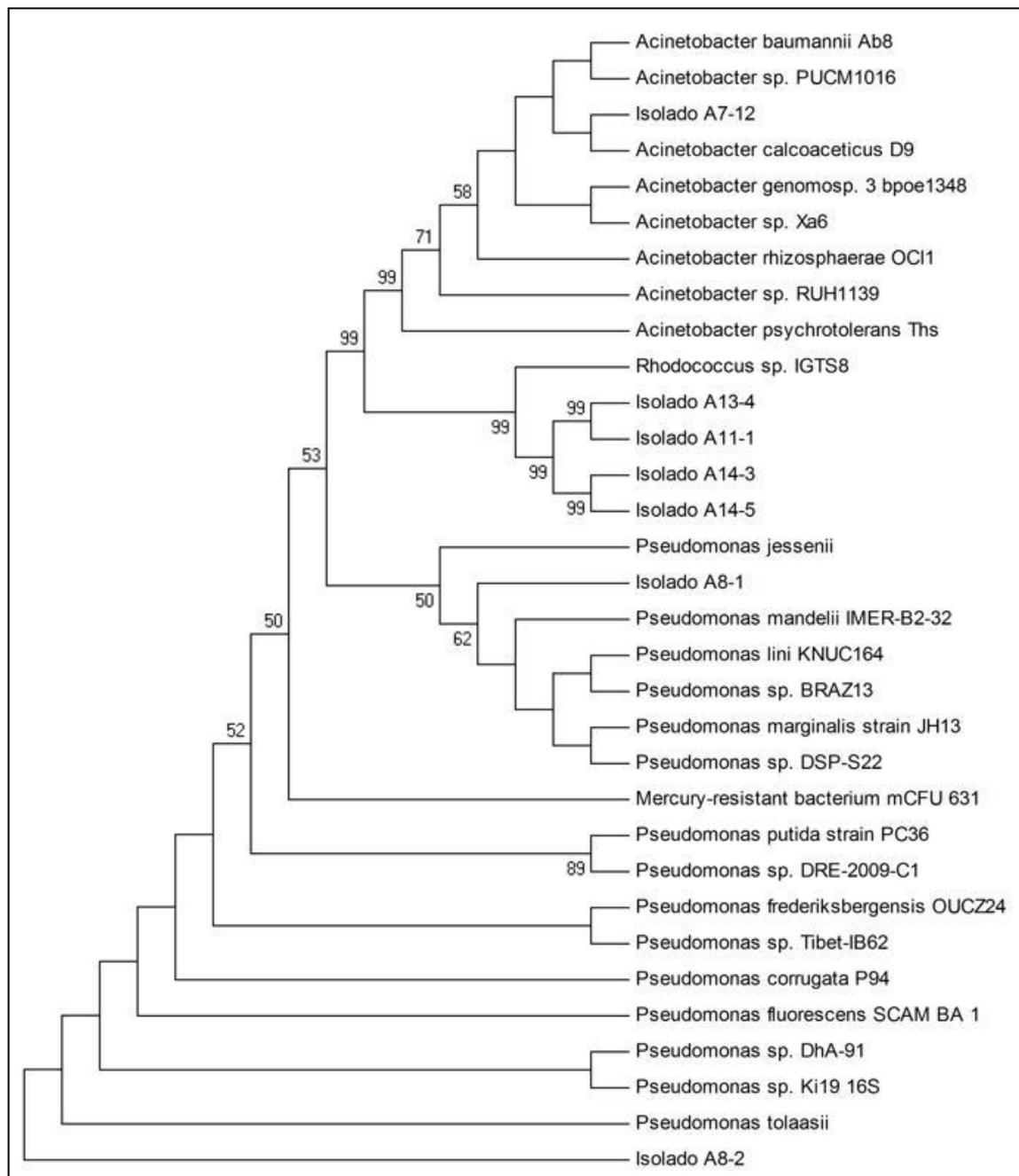
#### **5.8.5. Sequenciamento do DNA dos isolados selecionados**

As sequências dos isolados com capacidade de dessulfurização mostrou uma porcentagem igual ou superior a 97% de similaridade com as sequências de pares de bases contidas no banco de dados. Sendo assim, o isolado A8-1 apresentou 99% de similaridade com bactérias do gênero *Pseudomonas* sp. Já o isolado A8-2 mostrou também similaridade com a espécie *Pseudomonas corrugata*, com um índice de 98%. Por outro lado, os isolados A11-1 e A13-4 mostraram uma similaridade de 97% com as bactérias do gênero *Acinetobacter* sp. Os isolados A14-3 e A14-5, pertencentes à mesma amostra de solo, apresentaram uma similaridade de 98% e 97% respectivamente para o gênero *Pseudomonas*. O isolado A7-12 apresentou 99% de similaridade com bactérias do gênero *Acinetobacter* sp.

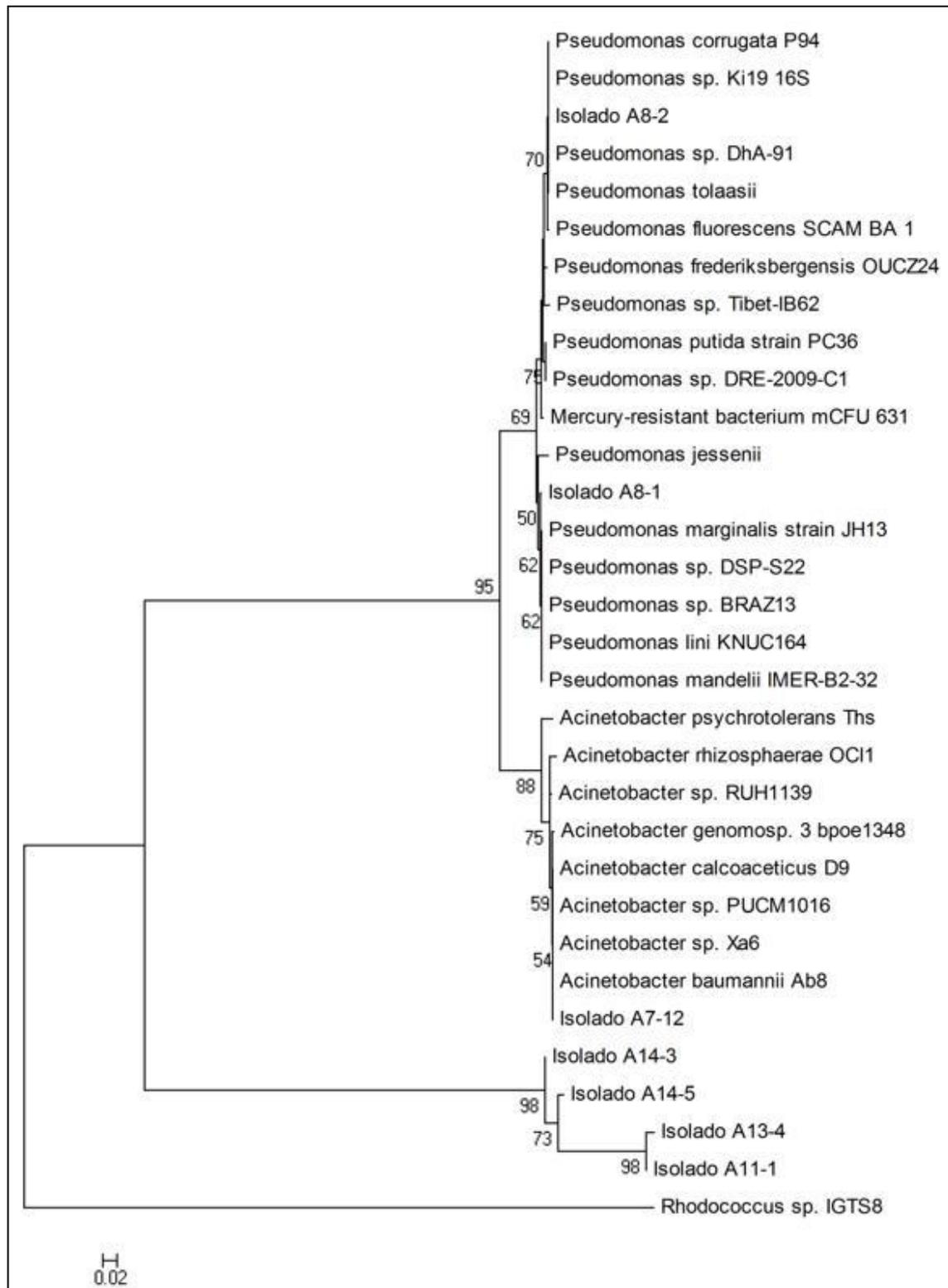
### 5.8.6. Análise Filogenética

A árvore filogenética construída com o auxílio do software Mega 4.1 (Figura 5.24 e 5.25) mostrou, de maneira geral, como os isolados sequenciados se posicionaram considerando seus parentes filogenéticos, as bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. A sequência de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 foi utilizada como “outgroup” na reconstrução filogenética, uma vez que ela está mais distante de todas as outras.

As duas árvores filogenéticas são coerentes no agrupamento das diferentes espécies e/ou estirpes de *Pseudomonas* em um grupo isolado e *Acinetobacter* em outro grupo. Os isolados A8-1 e A8-2 agruparam de maneira mais próxima dentro do gênero *Pseudomonas*. Já os isolados A7-12, A11-1, A13-4, A14-3 e A14-5 formaram um grupo único, estando mais próximos entre si do que dos membros dos gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter*.



**Figura 5.24:** Árvore filogenética construída pelo método de Máxima Parsimônia



**Figura 5.25:** Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor-Joining.

## 6. DISCUSSÃO

Diante dos resultados obtidos, através das metodologias adotadas, podem-se estabelecer as seguintes relações entre os microrganismos isolados neste trabalho e os objetivos propostos alcançados.

A quantificação das populações bacterianas obtidas através do isolamento das 21 amostras de solo foi baseada na contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/g), tanto para os isolados cultivados em meio rico (TSA) como para aqueles cultivados em meio seletivo (BSM suplementado com DBT). Em relação aos microrganismos isolados em TSA, pode-se inferir que, apesar de rizosferas de plantas, como no caso das gramíneas nativas da Antártica *Colobanthus quitensis* e *Deschampsia antarctica* poderem ser consideradas “hot spots” para o estabelecimento de microrganismos, não foram observadas contagens populacionais maiores no plaqueamento resultante das amostras provenientes desses locais. Considerando o número de colônias bacterianas isoladas, os musgos e as pinguineiras, também consideradas “hot spots” devido ao grande aporte de matéria orgânica, além das amostras da costa oceânica, foram locais que apresentaram condições mais favoráveis, seja para o estabelecimento de nichos para os microrganismos, seja pela composição do solo, o que pode ter favorecido a ocorrência maior de uma população dos microrganismos cultiváveis nestas amostragens de solo.

À semelhança das rizosferas de gramíneas, baixas contagens bacterianas também foram observadas nas amostras contaminadas com hidrocarbonetos (amostras 19, 20 e 21), que mostraram um baixo número de colônias, em meio TSA, da ordem de  $10^3$  e  $10^4$ . Este resultado pode ser explicado pelo fato da presença do petróleo atuar com um agente seletivo para a sobrevivência e multiplicação de microrganismos, favorecendo aqueles que possuem a capacidade metabólica específica de utilizar os PAH's como fonte energética.

Em relação às bactérias isoladas em meio BSM suplementado com DBT, observou-se que estes microrganismos estiveram presentes nos mais diversos locais de amostragem, seja rizosferas de gramíneas, pinguineiras, costa oceânica, musgos ou em solo contaminado com PAH's. O que se observou, de modo geral, foi que as populações de microrganismos destas amostras, quando comparadas com as populações cultivadas em meio TSA, apresentaram uma redução, em contagem, da ordem de  $10^1$  a  $10^4$  vezes. Isso pode ser explicado pelo fato de que, em meio rico, o número populacional de colônias foi maior, uma vez que este tipo de meio de cultura oferece grande quantidade de nutrientes,

propiciando, assim, um maior crescimento de colônias. Já o meio seletivo utilizado permitiu apenas o crescimento de bactérias capazes de utilizar o DBT e os sais contidos no BSM como fonte de energia. Desta forma, as populações das amostras contaminadas com PAH's apresentou um efeito inverso, ou seja, esta população de microrganismos tendeu a aumentar na ordem de  $10$  a  $10^2$  vezes. Isso pode ter acontecido devido ao fato de que, embora exista diversidade populacional menor em solos contaminados, os microrganismos selecionados pela presença do óleo se tornam predominantes e bastante eficientes em seu metabolismo, para se manterem nestas condições ambientais.

A variedade morfológica dos isolados foi estudada apenas em colônias obtidas no meio BSM suplementado com DBT, pois o isolamento em meio TSA foi utilizado apenas para a comparação das contagens de colônias entre os dois tipos de meio de cultura. A análise da variedade morfológica dos isolados no meio seletivo mostrou uma prevalência da forma bacteriana tipo cocos, com uma porcentagem de 68%, nos mais diversos tipos de arranjos (estafilococos, estreptococos, diplococos). Os cocos foram observados principalmente nas amostras associadas a musgos, pinguineiras e provenientes da costa oceânica. Já os bacilos obtidos, com uma porcentagem de 32%, foram encontrados principalmente na rizosfera (Lynch, 2002) das gramíneas nativas da Antártica, o que corrobora com resultados da literatura que mostram um predomínio de bacilos nas populações bacterianas cultiváveis associadas à rizosfera de vários tipos de espécies vegetais (Silveira *et al.*, 2008). Nas amostras contaminadas com hidrocarbonetos, foi observada a presença de cocos e bacilos, fato também já descrito na literatura por Saul e colaboradores (2005), estudando amostras de solo contaminadas com PAH's próximas à Estação Escocesa, no Continente Antártico. Muitas estirpes bacterianas degradadoras de hidrocarbonetos já foram isoladas da Antártica e estas estirpes pertencem aos mais variados gêneros bacterianos como *Rhodococcus* (Bej *et al.*, 2000; Ruberto *et al.*, 2005) e *Pseudomonas* (Panicker *et al.*, 2002), respectivamente cocos e bacilos, coincidindo com os resultados de morfologia obtidos nesse trabalho.

Todos os tipos de coloração diferencial de Gram foram observados, mas os Gram-positivos prevaleceram (44%) sobre Gram-negativos (42%) e Gram-variáveis (14%). No entanto, este tipo de caracterização fenotípica não é suficiente para diferenciar com precisão os isolados, uma vez que muitas bactérias, principalmente aquelas provenientes de amostras ambientais, são conhecidamente variáveis tanto em relação à forma como em relação à coloração que assumem em suas paredes celulares (Boniek, 2008).

A ausência de inclusões de enxofre, em todos os isolados analisados, não significa necessariamente, que estes isolados não estejam utilizando o enxofre presente no DBT acrescentado ao meio de cultura para o seu metabolismo. Pelo contrário, o fato deles estarem crescendo em meio seletivo demonstra que eles devem estar utilizando o enxofre e alguns também podem estar usando o carbono do DBT como fonte de energia, o que os classificaria como microrganismos quimiorganotróficos do ponto de vista metabólico. A ausência das inclusões de enxofre pode estar relacionada também ao fato de que algumas bactérias armazenam o enxofre somente quando sua biodisponibilidade no ambiente é alta. Quando o enxofre é captado e utilizado prontamente no metabolismo, ele pode não ser armazenado como reserva, sendo que esta característica de armazenamento é típica de algumas formas bacterianas com metabolismos diferenciados como é o caso de certas bactérias oxidantes de enxofre.

Para verificar se os isolados cultivados em BSM suplementado com DBT eram capazes de manter a sua capacidade de utilizar esse composto como fonte de energia, após o crescimento em meio rico, eles foram repicados em meio TSB em passagens sucessivas. Após a realização deste teste, observou-se que quase todos os isolados apresentaram valores de D.O's. inferiores aos que apresentavam antes deste ensaio (Figuras 5.1; 5.2; 5.3; 5.4). Isso pode ter acontecido devido a uma possível perda da capacidade de dessulfurização, que pode ocorrer pela perda do plasmídeo onde se localizam os genes responsáveis por esta capacidade. Normalmente, plasmídeos que conferem características metabólicas adicionais podem ser eliminados, na ausência de pressão seletiva, para fins de economia energética celular. Onze isolados apresentaram valores de D.O's. extremamente baixos (Figura 5.5), quando comparado com os valores obtidos anteriormente, sendo eles os isolados A7-10, A7-12, A8-1, A8-2, A8-3, A11-1, A13-3, A13-4, A14-3, A14-5, A18-1. Este dado revela uma grande possibilidade destes isolados terem perdido os genes de dessulfurização e em função disso, não possuírem mais a capacidade metabólica de utilizar o enxofre do DBT como fonte energética. Todavia, este dado somente foi elucidado com a realização de ensaios posteriores.

O ensaio de observação de fluorescência decorrente da formação de 2-HBP (Krawiec, 1990), apesar de apresentar um resultado negativo para todos os isolados testados, não influenciou a continuidade dos ensaios, uma vez que este teste foi realizado apenas como um ensaio presuntivo da presença de estirpes dessulfurizadoras nas amostras de solo e sedimentos analisadas.

Outro teste foi então adotado como uma metodologia para a seleção dos microrganismos dessulfurizadores, o ensaio de Gibb's, uma vez que este tipo de ensaio mostrou ser bastante eficiente e com resultados muito semelhantes aos testes de cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Kayser *et al.*, 1993). Após a realização, obteve-se 7 microrganismos que apresentaram a formação do composto 2-HBP como produto final da via metabólica de dessulfurização do DBT, através da coloração azul observada. Pode-se ressaltar que os isolados positivos para o ensaio de Gibb's estavam incluídos no grupo que apresentou valores de D.O's. baixos quando reinoculados em meio seletivo, após passagens em meio rico, sendo eles: A7-10, A8-1, A8-2, A11-1, A13-4, A14-3, A14-5 (Figura 5.6). Através deste dado, pode-se inferir que a tentativa de se ter o conhecimento das estirpes dessulfurizadoras antes do teste de Gibb's foi eficiente e capaz de funcionar como uma triagem inicial, podendo-se adotar este teste como uma ferramenta presuntiva para os microrganismos dessulfurizadores.

Os outros microrganismos que cresceram em meio seletivo, mas apresentaram resultado negativo para o teste de Gibb's, provavelmente seguem a via metabólica degradativa do composto DBT. Todavia, como o objetivo central deste trabalho é isolar apenas as estirpes que tenham um metabolismo de dessulfurização, os isolados degradadores foram armazenados em meios de manutenção para futuros trabalhos que envolvam este tipo de processo metabólico, sendo que estes podem ser utilizados para estudos de biorremediação nas áreas contaminadas com PAH's no continente Antártico.

Após a seleção dos isolados dessulfurizadores, análises químicas do solo foram feitas, com o intuito de se obter informações sobre as condições em que se encontravam estes microrganismos nas amostras de solo. Os altos valores da presença do átomo de enxofre nestas amostras podem ser explicados por fatores que envolvem o tipo de formação do solo, bem como sua granulometria, ou mesmo pela origem do mesmo. Desta forma, a presença de microrganismos dessulfurizadores nestes solos também pode ser explicada pela grande biodisponibilidade deste metal para o seu consumo e geração de energia, sobretudo nas amostras de solo da costa oceânica e da rizosfera de *C. quitensis* que apresentaram valores superiores da presença de enxofre.

Já em relação aos solos contaminados com PAH's, a ausência de microrganismos dessulfurizadores se deve por uma possível presença predominante de bactérias degradadoras deste tipo de hidrocarboneto. Como já foi vastamente descrito na literatura, os principais degradadores de PAH's são as *Pseudomonas* (Constanti *et al.*, 1994; Panicker

*et al.*, 2002; Guobin *et al.*, 2006), *Sphingomonas* (Baraniecki *et al.*, 2002) e *Acinetobacter* (Mac Cormack & Fraile, 1997) principalmente em solos contaminados com óleo no continente Antártico (Aislabie *et al.*, 2001). Além disso, também já foram descritos gêneros de *Rhodococcus* e actinomicetos psicrotolerantes degradadores de combustíveis fósseis na Antártica (Bej *et al.*, 2000) e em solos Árticos (Juck *et al.*, 2000). A ausência do cheiro característico de petróleo nas amostras analisadas, mesmo nas amostragens rasas, está relacionada com a baixa concentração do hidrocarboneto observada no ponto de amostragem 6 (Tabela 5.6). Já a observação do odor de petróleo no ponto de amostragem 7, mesmo em concentrações semelhantes do ponto de amostragem 6, pode ser justificado pelo grande volume de contaminação. Já as baixas concentrações de PAH's neste ponto de amostragem, podem estar relacionadas com a sua localização, pois o ponto de amostragem 7 está bastante próximo ao oceano (figura 4.2), o que pode ter lixiviado o solo, minimizando assim, a concentração deste na amostra de solo.

A característica de psicrotolerância observada nos isolados antárticos, principalmente nas amostras contaminadas, é bastante comum, pois durante o inverno polar a temperatura pode cair em até  $-30^{\circ}\text{C}$ . Porém, durante o verão, a exposição ao calor durante muito tempo, pode elevar a temperatura do solo para  $20^{\circ}\text{C}$  (Margesin & Schinner, 1997a; Deppe *et al.*, 2005). Sendo assim, esta característica fisiológica mais versátil torna-se uma vantagem para a sobrevivência em ambientes sujeitos a variações físicas extremas.

As curvas de crescimento dos sete isolados dessulfurizadores selecionados foram construídas a partir do tempo inicial de 12 horas de crescimento. Este tempo foi estimado em função da observação prévia do comportamento metabólico desses isolados quando crescidos em meio BSM suplementado com DBT. O crescimento lento dos isolados em meio seletivo pode ser atribuído à alta especificidade dos microrganismos para consumo do enxofre presente no DBT, uma vez que é necessária a presença de enzimas específicas para que ocorra este tipo de metabolismo. Além disso, apesar delas serem consideradas estirpes psicrotolerantes, a faixa ótima de atuação das enzimas possivelmente está entre as temperaturas um pouco mais baixas do que a temperatura ambiente de  $27^{\circ}\text{C}$ , condição em que estes microrganismos foram incubados. Os valores de D.O's. revelados pelas curvas de crescimento evidenciam uma média variando entre 0,5 e 0,6 de absorvância para os isolados. A velocidade de crescimento na fase exponencial, até alcançar a máxima absorvância, também se manteve uniforme variando entre 24 e 26 horas de crescimento. Exceto para o isolado A13-4, que somente obteve a sua máxima densidade óptica no tempo

de 40 horas, corroborando com o estudo de Shavandi e colaboradores (2009), com a bactéria *Gordonia alkanivorans*, que apresentava metabolismo semelhante de dessulfurização em presença de DBT. Este comportamento peculiar pode ser inerente ao metabolismo desta estirpe em específico, e este pode não estar relacionado diretamente com a eficiência na utilização do composto DBT no processo de biodessulfurização.

A construção das curvas de crescimento baseadas em turbidez, apesar de ser uma metodologia amplamente utilizada nos trabalhos científicos, tem limitações que impedem de se observar a fase de declínio ou morte celular, uma vez que o método não permite diferenciar células viáveis de células mortas. No caso específico do isolado A8-2, pelo fato de não haver turbidez quando submetido a medidas espectrofotométricas, foi utilizada a contagem de colônias em placa para se construir a curva de crescimento, através do plaqueamento deste isolado em intervalos de tempo de 2 horas. Esse método foi mais preciso e interessante do que a construção da curva de crescimento por leituras espectrofotométricas, pois permitiu a observação de todas as fases de crescimento do isolado, incluindo a fase de declínio celular. Baseado neste gráfico (Figura 5.13) pôde-se notar também que esta estirpe, assim como as outras, teve uma máxima de crescimento celular em um tempo de 24 horas, correspondendo a uma população de 80 milhões de células viáveis. Apesar de mais trabalhosa, a construção da curva de crescimento por plaqueamento mostrou ser uma metodologia melhor para a descrição fisiológica de um isolado, sendo que pode-se também fazer uma melhor correlação entre a fase de crescimento celular e a produção máxima do 2-HBP como produto metabólico. Além disso, essa metodologia permitiu o cálculo do tempo de geração (g), através do qual se obteve a informação de que este isolado possui um tempo de geração de aproximadamente 3,085 horas, ou seja, este é o tempo necessário para que a população da estirpe A8-2 se duplique.

A observação das diferentes concentrações do 2-HBP durante o crescimento dos isolados foi feita pelo ensaio de Gibb's considerado um método qualitativo (Rashtchi *et al.*, 2006). Durante as 60 primeiras horas de crescimento, o aumento na concentração do 2-HBP está diretamente relacionado com a retirada específica do átomo de enxofre do DBT (Kayser *et al.*, 1993). O isolado que apresentou a maior concentração de 2-HBP, no tempo de 60 horas, foi a A7-12, com uma concentração de 60ppm (Figura 5.14), o que corrobora com o trabalho de Shavandi e colaboradores (2008) que apresentou resultados semelhantes com uma estirpe recombinante de *Gordonia alkanivorans*. O alto valor na produção do 2-

HBP pode estar diretamente relacionado com a alta eficiência na dessulfurização do DBT (Kayser *et al.*, 1993). Desta forma, entre os 7 isolados que apresentaram capacidade de dessulfurização, a bactéria A7-12, foi aquela que apresentou a maior eficiência metabólica no processo de biodessulfurização. A morfologia de cocos e arranjo de diplococos deste isolado, também coincide com os dados descritos na literatura que mostram o microrganismo *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, semelhante morfologicamente, como o mais eficiente neste processo biotecnológico (Kilbane, 2006). Já o isolado A14-3 foi o que apresentou a menor concentração de 2-HBP no tempo de 60 horas, apresentando uma morfologia de microbacilos, com coloração Gram-negativa. Ambas as estirpes são procedentes da região de Punta Plaza e estão associadas à rizosfera de gramíneas. No entanto, o isolado A7-12 também estava associado à *D. antarctica* e apresentou uma alta concentração de 2-HBP (50ppm), mostrando que esta é uma característica inerente ao metabolismo de cada isolado, não estando relacionada, portanto, ao local de onde o microrganismo foi isolado. Na literatura não foram descritos estudos relacionados à presença ou à eficiência de estirpes dessulfurizadoras associadas à rizosfera de *D. antarctica*. No entanto, o estudo de (Barrientos *et al.*, 2008), mostrou, baseada na caracterização do RNA ribossomal 16S, que a maioria das estirpes encontradas associadas à rizosfera desta gramínea pertencem a diferentes espécies de *Pseudomonas*, e também espécies dos gêneros *Flavobacterium* sp. e *Arthrobacter* sp. Sendo assim, este trabalho pode estar sendo o pioneiro neste estudo, acerca destes microrganismos dessulfurizadores associados à *D. antarctica*.

Os demais isolados com capacidade de dessulfurização (A8-1, A8-2, A13-4, A11-1 e A14-5) apresentaram valores de produção de 2-HBP semelhantes entre si, com uma média de 33ppm de 2-HBP em um tempo de 60 horas. Essas concentrações são maiores do que as obtidas por (Kayser *et al.*, 1993) em seu estudo comparativo sobre a eficiência dos métodos de quantificação do 2-HBP através da cromatografia gasosa e do ensaio de Gibb's. No trabalho citado, através das análises feitas com a estirpe *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, foram obtidos valores próximos a 15ppm de 2-HBP para as duas metodologias adotadas. Constatou-se, assim, uma eficiência semelhante para os dois métodos em relação à cinética microbiológica da dessulfurização.

Após o teste de quantificação do 2-HBP em função do crescimento microbiano dos isolados bacterianos com capacidade de dessulfurização, as ferramentas de biologia molecular foram usadas no intuito de elucidar a taxonomia destes isolados, bem como

estabelecer uma relação filogenética entre eles. Para isso, após a extração do DNA dos isolados, a metodologia do BOX-PCR foi utilizada e revelou a diversidade genômica entre estes sete isolados. A observação do padrão de bandas do gel de acrilamida (Figura 5.22) mostrou que os isolados A8-1 e A8-2 (canaletas 3 e 4, respectivamente) apresentam visualmente o mesmo perfil genômico, podendo ser considerados como a mesma estirpe bacteriana. Já os perfis de bandas dos outros isolados mostrados neste mesmo gel (canaletas 2, 5, 6, 7, 8 e 9), revelaram um padrão genômico diferente entre si, o que significa que eles são estirpes bacterianas diferentes, pois embora apresentem um perfil de bandas diferente, eles podem ser estirpes diferentes de uma mesma espécie (Versalovic *et al.*, 1994).

O sequenciamento de DNA dos isolados mostrou a similaridade com bactérias dos gêneros *Acinetobacter* e *Pseudomonas* nas amostras de solo estudadas. O resultado mostrou que os isolados A8-1 e A8-2, que apresentam perfis genômicos visualmente iguais no gel de BOX (Figura 5.22), pertencem ao gênero *Pseudomonas* sp., e são também clones de uma mesma estirpe. Os outros isolados, que apresentaram padrões de bandas diferentes foram identificados como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* ou *Acinetobacter*, embora tenham se agrupado filogeneticamente de maneira isolada. Existe a possibilidade de fazerem parte de um novo gênero bacteriano, ainda não descrito, que tem parentesco evolucionário com *Pseudomonas* e *Acinetobacter*.

## 7. CONCLUSÃO

- Foram obtidos 50 isolados com capacidade de utilizar o DBT como fonte energética a partir de amostras de solo e sedimentos do Continente Antártico.
- Através da análise da diversidade morfológica dos microrganismos pôde-se constatar a prevalência de cocos, com uma porcentagem de 68%, nos mais diversos tipos de arranjos coloniais (estafilococos, estreptococos, diplococos). Além disso, eles apresentaram uma coloração típica de Gram-positivos, estes representando 44% do total de isolados.
- O teste de seleção de Gibb's seletivo para as estirpes dessulfurizadoras definiu 7 isolados com esta capacidade metabólica, revelando uma porcentagem de 14% do total do grupo inicial. As outras estirpes, representando 86%, provavelmente utilizam a via degradativa do composto DBT, obtendo deste composto os elementos carbono e enxofre.
- As curvas de crescimento dos isolados em função da formação do 2-HBP apresentaram padrões de crescimento semelhantes, sendo que a estirpe A7-12 se destacou, com altas concentrações finais de 2-HBP, sendo, portanto, a estirpe dessulfurizadora mais promissora para o desenvolvimento desta biotecnologia.
- Os isolados capazes de seguir a via metabólica de dessulfurização "4S", de modo geral, apresentaram perfis genômicos diferentes, evidenciando a diversidade entre as estirpes selecionadas.
- O sequenciamento e a filogenia revelaram que as estirpes dessulfurizadoras estão filogeneticamente relacionadas aos gêneros *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas* sp., sendo que A8-1 e A8-2 pertencem ao gênero *Pseudomonas* e os outros isolados podem pertencer a um novo gênero relacionado aos dois citados acima.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAD-ANDALOUSSI S., LAGNEL C., WARZYWODA M., MONOT F. (2003). Multicriteria comparison of resting cell activities of bacterial strains selected for biodesulfurization of petroleum compounds. *Enzyme Microb Technol*; 32:446–54.

AFFERDEN VAN M., SCHACHT S., KLEIN J., TRÜPER H. G. (1990). Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium* sp. DO. *Arch Microbiol.*;153:324–8.

AISLABIE J. M., BALKS M. R., FOGHT J. M., WATERHOUSE E. J. (2004). Hydrocarbon spills on Antarctic soils: effects and management. *Environ Sci Technol.*; 38:1265–1274.

AISLABIE J. M., CHHOUR K. L., SAUL D. J., MIYAUCHI S., AYTON J., PAETZOLD R. F., BALKS M. R. (2006b). Dominant bacteria in soils of Marble Point and Wright Valley, Victoria Land, Antarctica. *Soil Biol Biochem.*; 38:3041–3056.

AISLABIE J. M., FRASER R., DUNCAN S., FARRELL R. L. (2001). Effects of oil spills on microbial heterotrophs in Antarctic soils. *Polar Biol.*; 24:308–313.

AIYAR A. (2000). The use of CLUSTAL W and CLUSTAL X for multiple sequence alignment. *Methods Mol. Biol.*; 132:221–241.

ALBERD M., BRAVO, L. A., GUTIÉRREZ A., GIDEKEL M., CORCUERA L. J. (2002). Ecophysiology of Antarctic vascular plants. *Antarctic Science.*; 15: 345–352.

ARMSTRONG S. M., SANKEY B. M., VOORDOUW G. (1995). Conversion of dibenzothiophene to biphenyl by sulfate reducing bacteria isolated from oil field production facilities. *Biotechnol Lett*; 17:1133–6.

ATCC - American Type Culture Collection. (2009); <http://www.atcc.org>.

ATLAS R. M., BORON D. J., DEEVER W. R., JOHNSON A. R., MCFARLAND B. L., MEYER J. A. (2001). Method for removing organic sulfur from heterocyclic sulfur containing organic compounds; *US patent number H1*, 986.

AVERY L. M., SMITH R. I. L., WEST H. M. 2003. Response of rhizosphere microbial communities associated with Antarctic hairgrass (*Deschampsia Antarctica*) to UV radiation *Polar. Biol.*; 26:525-529.

AVIDAN A., KLEIN B., RAGSDALE R. (2001). Improved planning can optimize solutions to produce clean fuels. *Hydrocarb Process*; 80:47–53.

BARANIECKI C. A., AISLABIE J., FOGHT J. M. (2002). Characterization of *Sphingomonas* sp. Ant 17, an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Antarctic soil. *Microb Ecol.*; 43:44–54.

BARRIENTOS D. L., GIDEKEL M., GUTIÉRREZ M A. (2008). Characterization of rhizospheric bacteria isolated from *Deschampsia antarctica* Desv. *World J Microbiol Biotechnol.*;24:2289–2296.

BEJ A. K., SAUL D., AISLABIE J. (2000). Cold-tolerant alkane-degrading *Rhodococcus* species from Antarctica. *Polar Biol.*; 23:100–105.

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.

BRESSLER D. C., NORMAN J. A., FEDORAK P. M. (1998). Ring cleavage of sulfur heterocycles: how does it happen? *Biodegradation*; 8:297–311.

CARO A., BOLTES K., LETÓN P., GARCÍA-CALVO E. (2007). Dibenzothiophene biodesulfurization in resting cell conditions by aerobic bacteria. *Biochemical Engineering Journal*. 35:191-197.

CHOR B., HENDY M. D., SNIR S. (2006). Maximum Likelihood Jukes-Cantor Triplets: Analytic Solutions. *Molecular Biology and Evolution.*; 23(3), 626-632.

CONSTANTI M., BORDONS A., GIRALT J. (1993). Degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas putida*. *Letters in Applied Microbiology*; 18:107-111.

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.

CORMACK W. P. M., RUBERTO L. A. M., VASQUEZ S. C. (2008). Bacteriology of extremely cold soils exposed to hydrocarbon pollution. *Microbiology of extreme soils*. 12:249-277.

DENIS-LAROSE C., LABBÉ D., BERGERON H., JONES A. M., GREER C. W., AL-HAWARI J., GROSSMAN M. J., SANKEY B. M., 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. *J. Bacteriol.*; 176: 6706-6716.

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.

DEPPE U., RICHNOW H-H., MICHAELIS W., ANTRANIKIAN G. (2005). Degradation of crude oil by an Arctic microbial consortium. *Extremophiles.*; 9:461-470.

DOSOMER J. P., DHAESE P., MONTAGUMV. (1988). Conjugative transfer of cadmium resistance plasmids in *Rhodococcus fascians* strains. *J. Bacteriol.*;170:2401-5.

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.

EARLE M. J., ESPERANÇA J. M. S. S., GILEA M. A., LOPES J. N. C., REBELO L. P. N., MAGEE J. W. (2006). The distillation and volatility of ionic liquids. *Nature*; 439:831-4.

EC-Environment Canada, (2009); <http://www.ec.gc.ca/energ/fuels/gasoline>.

EMBLEY T. M. (1991). The linear PCR reaction: a simple and robust method for sequencing amplified rRNA genes. *Letters on Applied Microbiology*; 13(3): 171-4.

EPA-USA. Environmental Protection Agency, (2009). <http://www.epa.gov/air/air/so2>.

FOLSOM B. R., SCHIECHE D. R., DIGRAZIA P. M., WERNER J., PALMER S. (1999). Microbial desulfurization of alkylated dibenzothiophenes from a hydrodesulfurized middle distillate by *Rhodococcus erythropolis* I-19. *Appl Environ Microbiol.*; 65:4967-72.

FREEMANTLE M. (2004). Designer liquids in polymer systems. *Chem Eng News*; 18:26-9.

GASCUEL O., STEEL M. (2006). Neighbor-Joining Revealed. *Molecular Biology and Evolution.*; 23(11), 1997-2000.

GRAY K. A., POGREBINSKY O., MRACHKO G. T., SQUIRES C. H. (1996). Biochemical characterization of the biodesulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 - potencial 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.

GUOBIN S., HUAIYIANG Z., JIANMIN X., GUO C., WANGLIANG L., HUIZHOU L. (2006). Biodesulfurization of hydrodesulfurized diesel oil with *Pseudomonas delafieldii* R-8 from high density culture. *Biochemical Engineering Journal*; 27:305-309.

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

HARTDEGEN F. J., COBURN J. M., ROBERTS R. L. (1984). Microbial desulfurization of petroleum. *Chem Eng Prog.*; 80:63–7.

HERNÁNDEZ-MALDONADO A. J., YANG R. T. (2004). Desulfurization of transportation fuels by adsorption. *Cat Rev-Sci Eng.*; 46:111–50.

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.

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.

JOHNSON R. M., MADDEN J. M., SWAFFORD J. R. (1978). Taxonomy of Antarctic bacteria from soils and air primarily of the McMurdo Station and Victoria Land dry valley region. *Antarct Res Ser.*; 30:35–64.

JUCK D., CHARLES T., WHYTE L. G., GREER C. W. (2000). Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS Microbiol Ecol.*; 33:241–249.

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 rhodochrous* IGTS8. *J. Gen. Microbiol.*; 139: 3123-3129.

KAYSER K. J., CLEVELAND L., PARK H. S., KWAK J. H., KOLHATKAR A., KILBANE II JJ. (2002). Isolation and characterization of a moderate thermophile, *Mycobacterium phlei* GTIS10, capable of dibenzothiophene desulfurization. *Appl Microbiol Biotechnol.*; 59:737–45.

KERTESZ M. A. (1999). Riding the sulfur cycle-metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.*; 24:135-75.

KILBANE II J. J. (2006). Microbial biocatalyst developments to upgrade fossil fuels. *Curr Opin Biotechnol.*; 17:305–14.

KILBANE II J. J., ROBINS J. (2007). Characterization of the *dsz* ABC genes of *Gordonia amicalis* F.5.25.8 and identification of conserved protein and DNA sequences. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*; 75:843-851.

KILBANE J. J. (1989). Desulfurization of coal: the microbial solution. *Trends Biotechnol.*; 7:97–101.

KILBANE J. J. (1990). Sulfur specific microbial metabolism of organic compounds.

KILBANE J. J., BIELAGA B. A. (1990). Toward sulfur-free fuels. *Chem Tech*; 20:747–51.

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

KNUDSEN K. G, COOPER B. H, TOPSOE H. (1999). Catalyst and process technologies for ultra low sulfur diesel. *Appl Catal A-Gen*; 198:205–15.

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-targeted biodesulfurization. *Appl Environ Microbiol.*; 63:3164–9.

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.

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

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.

LYNCH J. M. (1990). *The Rhizosphere*. Wiley, Chichester.

LYNCH J. M. (2002). Resilience of the rhizosphere to anthropogenic disturbance. *Biodegradation*; 13: 21-27.

MAC CORMACK W. P., FRAILE E. R. (1997). Characterization of a hydrocarbon degrading psychrotrophic Antarctic bacterium. *Antarct Sci.*; 9:150–155.

MALIK K. A. (1980). Microbial removal of organic sulfur from crude oil and the environment: some new perspectives. *Process Biochem.*; 13:10-2.

MARGESIN R., SCHINNER F. (1997a) Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in Alpine soils. *Appl Environ Microbiol.*; 63:2660–2664.

McFARLAND B. L., BORON D. J., DEEVER W., MEYER J. A., JOHNSON A. R., ATLAS R. M. (1998). Biocatalytic sulfur removal from fuels: Applicability for producing low sulfur removal from fuels: Applicability for producing low sulfur gasoline. *Critical Rev. Microbiol.*; 24: 99-147.

McHALE W. D. (1981). Process for removing sulfur from petroleum oils; *US patent number 4,283,270*.

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

MONTICELLO D. J., (2000). Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Current Opinion in Biotechnology*; 11:540-546.

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

MOORE E., ARNSCHEIDT A., KRÜGER A., STRÖMPL C., MAU M. (2004). Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. *Molecular Microbial Ecology Manual, Second Edition*; 1.01:3-18.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. (2009). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

NEKODZUKA S., TOSHIKI N., NAKAJIMA-KAMBE T., NOBURA N., LU J., NAKAHARA Y. (1997). Specific desulfurization of debenzothiophene 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., 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.

PANICKER G., AISLABIE J., SAUL D., BEJ A. K. (2002). Cold tolerance of *Pseudomonas* sp 30–3 isolated from oil-contaminated soil, Antarctica. *Polar Biol.*; 25:5–11.

PEREIRA J. C., SILVA A. K. G., JÚNIOR H. A. N., SILVA E. P., LENNA J. C. (2007). Distribution, fractional and mobility of trace elements in stream sediments. *New Chemistry*; 30:5-16.

PIDDINGTON C. S., KOVACEVICH B. R., RAMBOSEK J. (1995). Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding the dibenzothiophene

desulfurization operon of *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *Appl Environ Microbiol.*; 61:468–75.

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

RASHTCHI M., MOHEBALI G. H., AKBARNEJAD M. M., TOWFIGHI J., RASEKH B., KEYTASH A. (2006). Analysis of biodesulfurization of model oil by the bacterium, strain RIPI-22. *Biochemical Engineering Journal*; 29:169-173.

REICHMUTH D. S. (2002). Metabolic engineering of a dibenzothiophene biodesulfurization operon (PhD thesis). *University of California, Berkeley*; 81 pages. *Resour Conserv Recycl.*; 3:69–79.

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.

RUBERTO L., VAZQUEZ S. C., LOBALBO A., MAC CORMACK W. P. (2005). Psychrotolerant hydrocarbondegrading *Rhodococcus* strains isolated from polluted Antarctic soils. *Antarct Sci.*; 17:47–56.

SAUL D. J, AISLABIE J. M., BROWN C. E., HARRIS L, FOGHT J. M. (2005). Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol*; 53:141–155.

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.

SHAVANDI M., SADEGHIZADEH M., ZOMORODIPOUR A., KHAJEH K. (2009). Biodesulfurization of dibenzothiophene by recombinant *Gordonia alkanivorans* RIPI90A. *Bioresource Technology*. 100:475-479.

SHENNAN J. L. (1996). Microbial attack on sulfur-containing hydrocarbons, implications for the biodesulphurization of oils and coals. *J. Chem Technol Biotechnol.*; 67:109–23.

SILVEIRA A. B. (2008). Isolamento e caracterização de linhagens de *Bacillus* e *Paenibacillus* promotores de crescimento vegetal em lavouras de arroz e trigo do Rio Grande do Sul. Tese de doutorado. *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, 113p.

SINGH B. K., MILLARD P., WHITELEY A. S., MURRELL J. C. (2004). Unravelling rhizosphere–microbial interactions: opportunities and limitations. *Trends in Microbiology*; 4: 386-396.

SMITH J. J., AH TOW L., STAFFORD W., CARY C., COWAN D. A. (2006). Bacterial diversity in three different Antarctic cold desert mineral soils. *Microb Ecol.*; 51:413–421.

SMITH L. R. I. (2003). The enigma of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica* in Antarctica. *Antarctic biology in a global context*. Leiden: Backham Publishers, 234-239.

SMITH M. C., BOWMAN J. P., SCOTT F. J., LINE M. A. (2000). Sublithic bacteria associated with Antarctic quartz stones. *Antarct Sci.*; 12:177–184.

STEVENS JR. S. E., BURGESS W. D. (1987). Biological desulfurization of coal. *US patent number 4,659,670*.

STONER D. L., WEY J. E., BARRETT K. B., JOLLEY J. G. (1990). Modification of water-soluble coal-derived products by dibenzothiophene-degrading microorganisms. *Appl Environ Microbiol.*; 56:2667-76.

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

TAO F., YUB, XUP, MA. (2006). Biodesulfurization in biphasic systems containing organic solvents. *Appl Environ Microbiol.*; 72:4604-9.

McFARLAND B. L. (1999). Biodesulfurization. *Curr Opin Microbiol.*; 2:257–64.

VERSALOVIC J., SCHNEIDER M., BRUIJN F. DE, LUPSKI J., J. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell Biol.*; 5: 25-40.

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

WANOWSKA I. G., SZCZUKA E., BEDNARA J., GORECKI R. (2005). Anatomy characteristics and ultrastructure of *Deschampsia antarctica* (Poaceae). IRENA GIE *Akademicka*; 19:20-03.

WORLD BANK GROUP. Pollution prevention and abatement handbook (1999): towards cleaner production; Washington DC: *World Bank Group Publishers*.

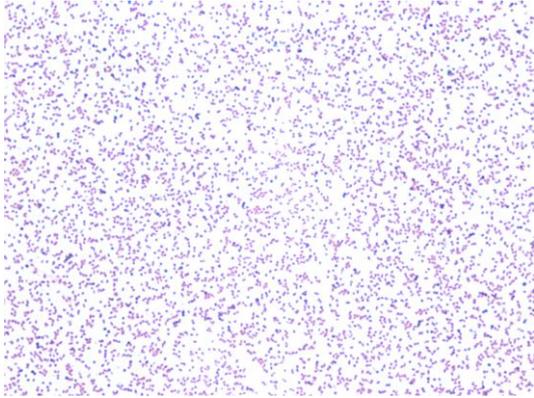
YAMADA K., MINODA Y., KODAMA K., NAKATANI S., AKASAKI T. (1968). Microbial conversion of petro-sulfur compounds. Part 1. Isolation and identification of dibenzothiophene-utilizing bacteria. *Agric. Biol. Chem.*; 32, 840-845.

YAMADA K. O., MORIMOTO M., TANI Y. (2001). Degradation of dibenzothiophene by sulfate-reducing bacteria cultured in the presence of only nitrogen gas. *J. Biosci. Bioeng.*; 91:91–3.

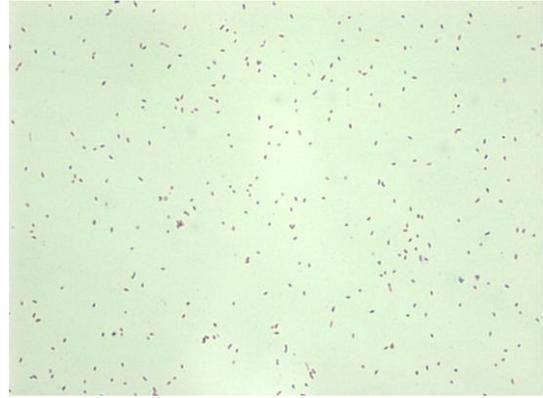
## **9. ANEXOS**

### **Anexo I**

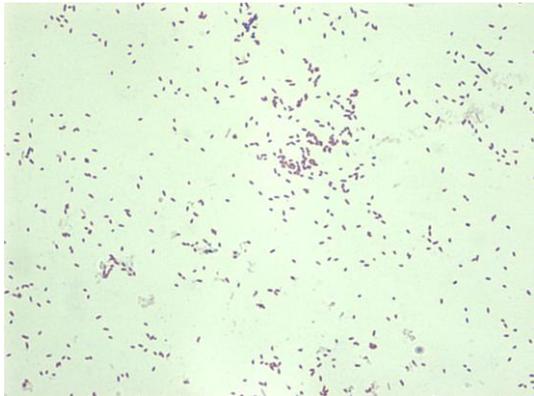
**Imagens das Lâminas (37,3µm) com Coloração Diferencial de Gram  
(Aumento de 1000x)**



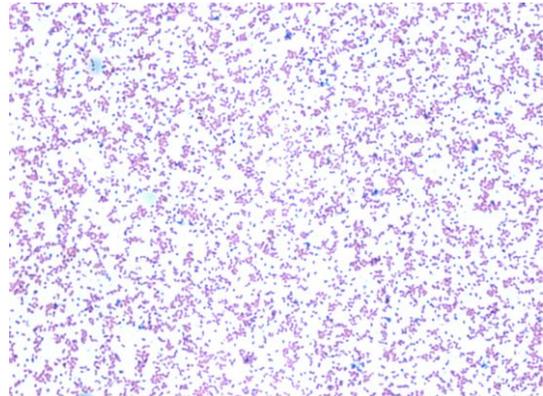
Isolado A3-14



Isolado A3-15



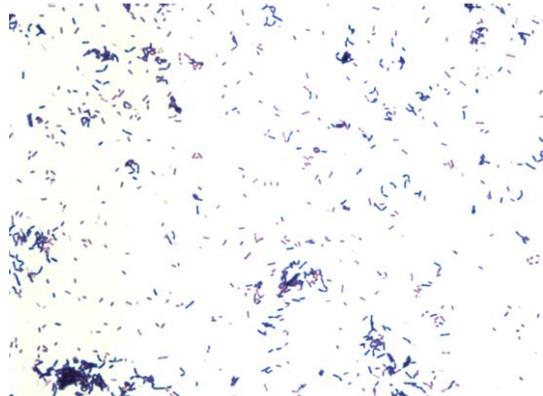
Isolado A3-16



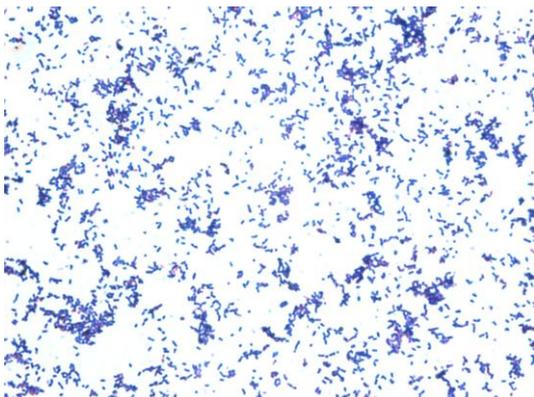
Isolado A3-17



Isolado A6-6



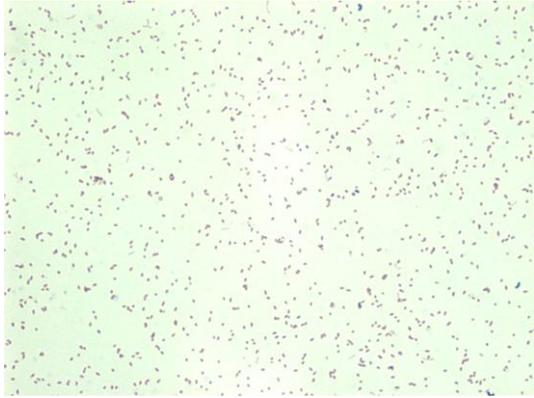
Isolado A6-7



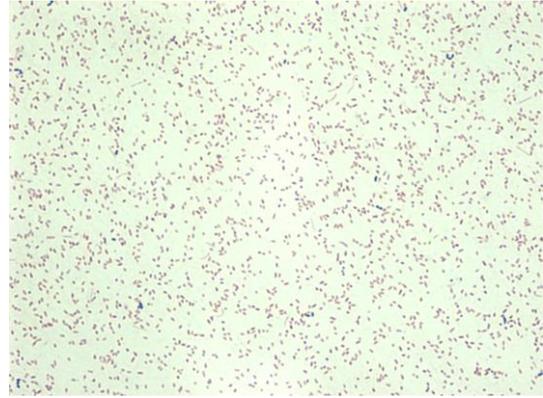
Isolado A6-8



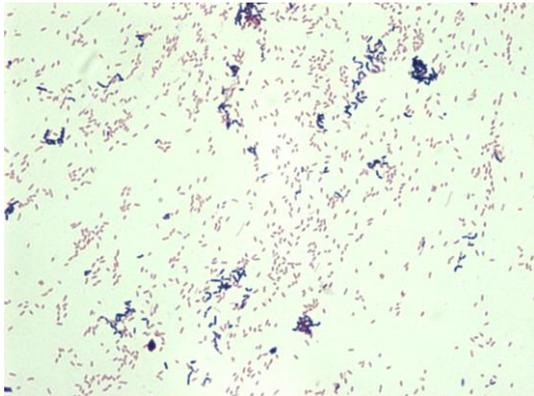
Isolado A6-9



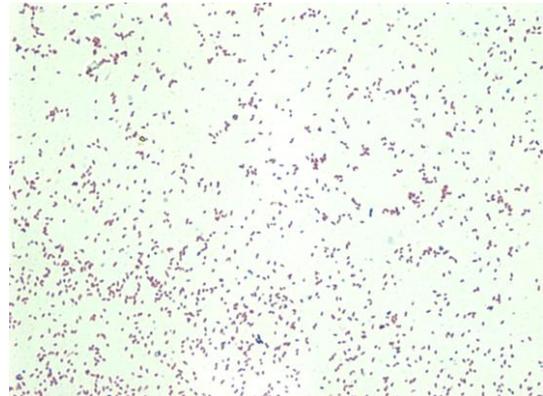
Isolado A7-10



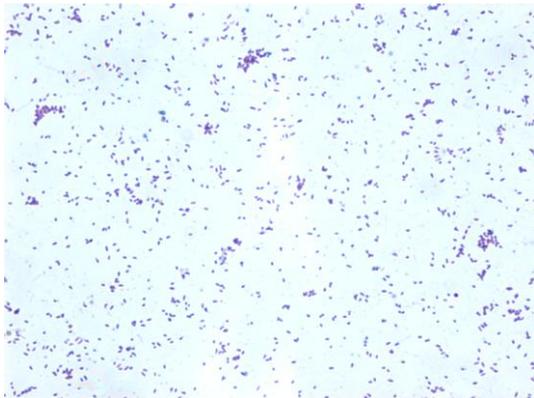
Isolado A7-11



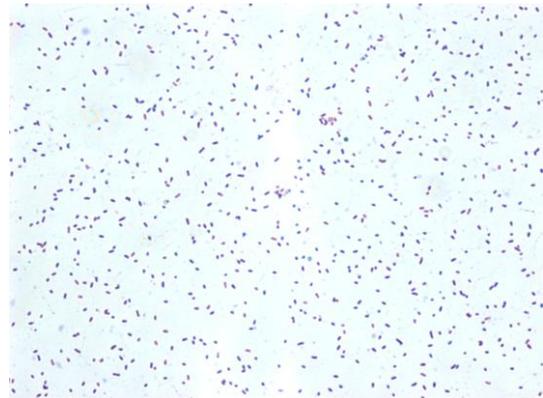
Isolado A7-12



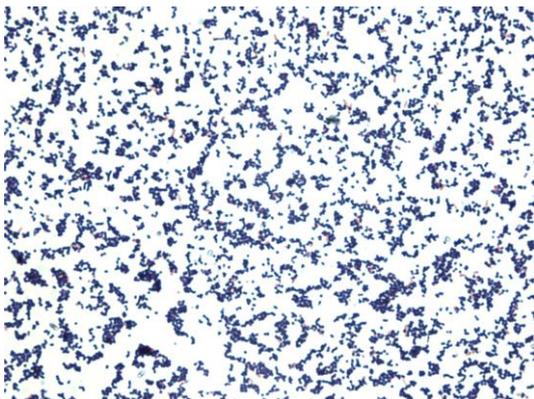
Isolado A7-13



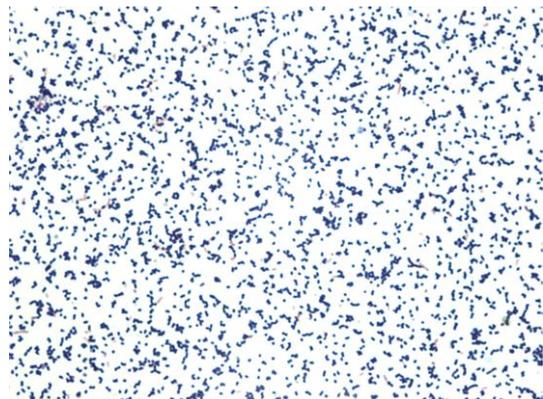
Isolado A8-1



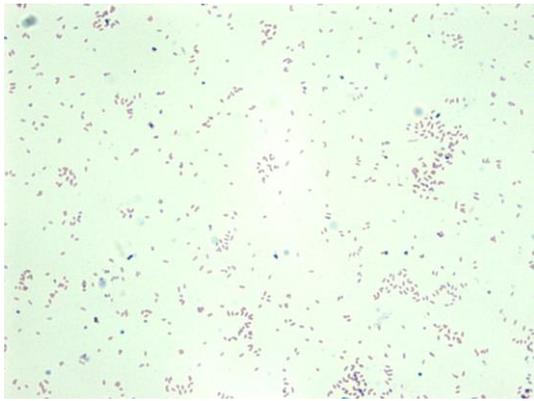
Isolado A8-2



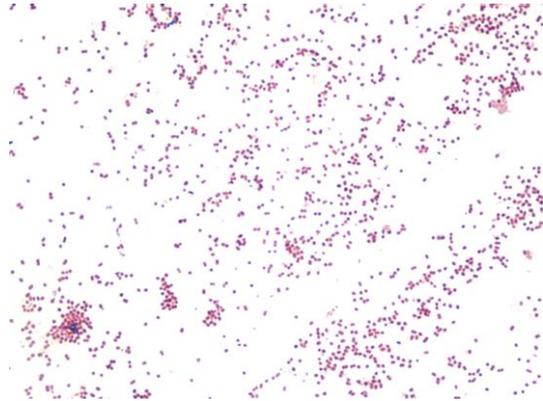
Isolado A8-3



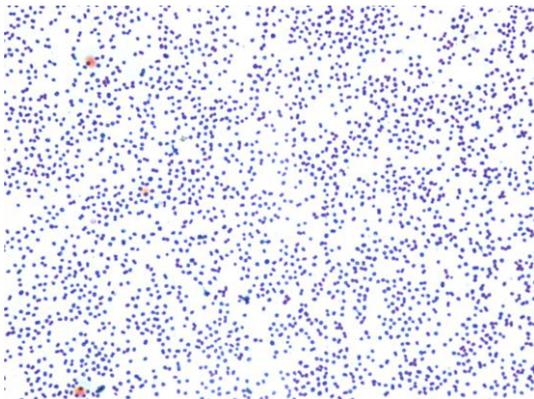
Isolado A8-4



Isolado A11-1



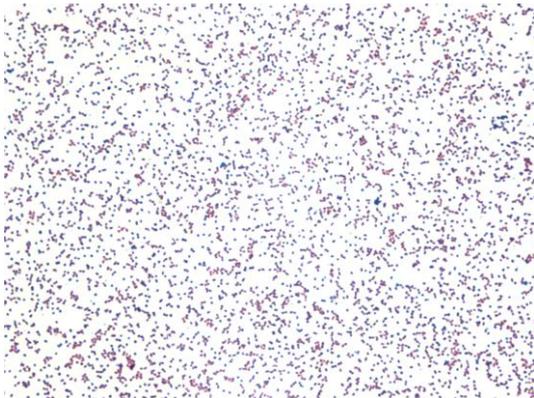
Isolado A11-2



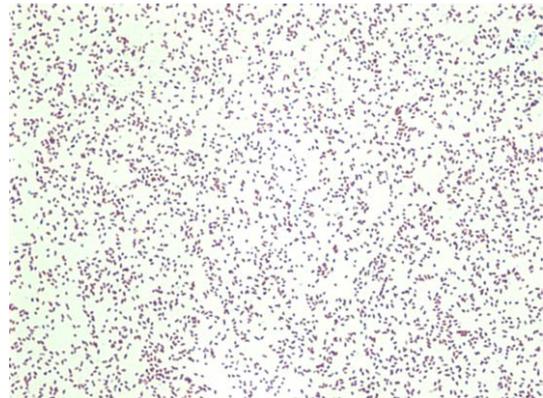
Isolado A11-3



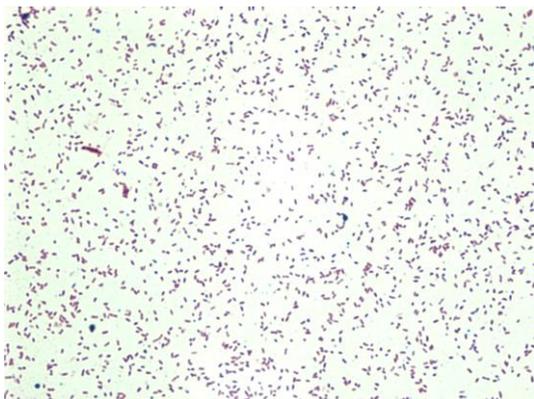
Isolado A11-4



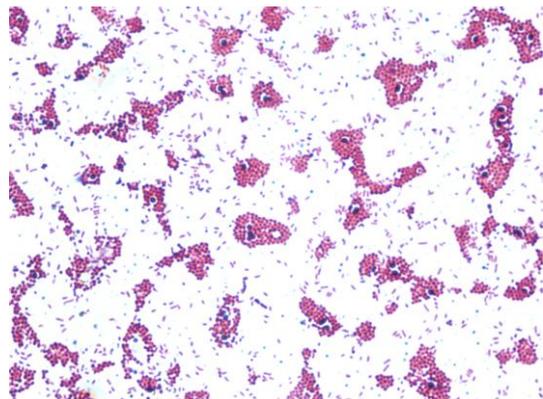
Isolado A12-1



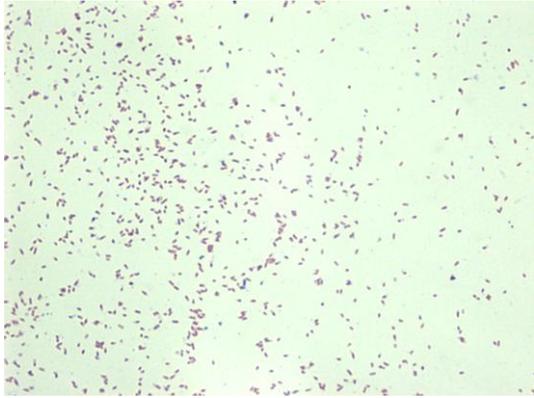
Isolado A12-2



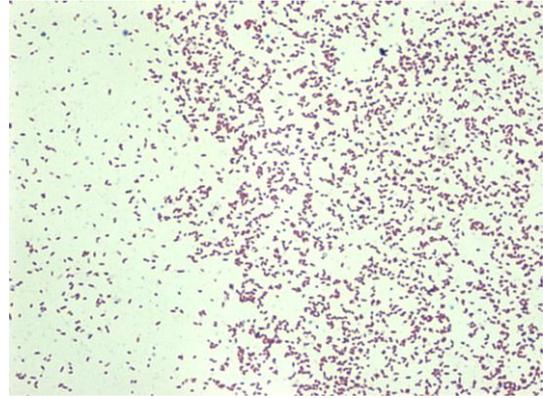
Isolado A12-3



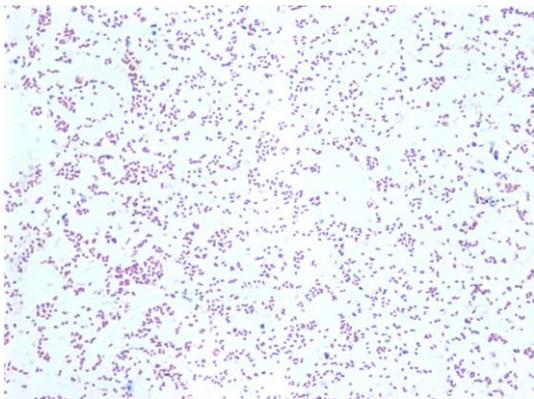
Isolado A12-4



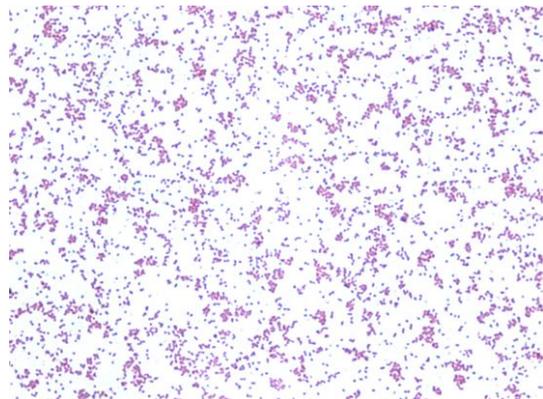
Isolado A13-1



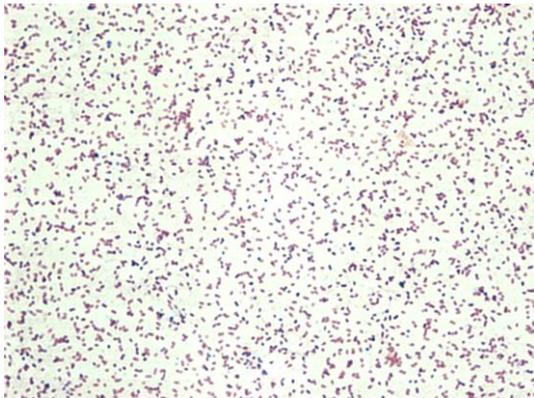
Isolado A13-2



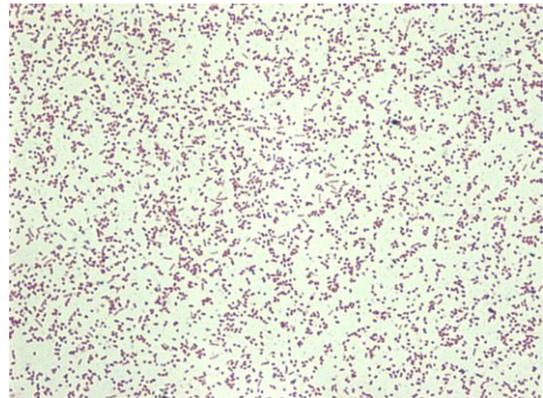
Isolado A13-3



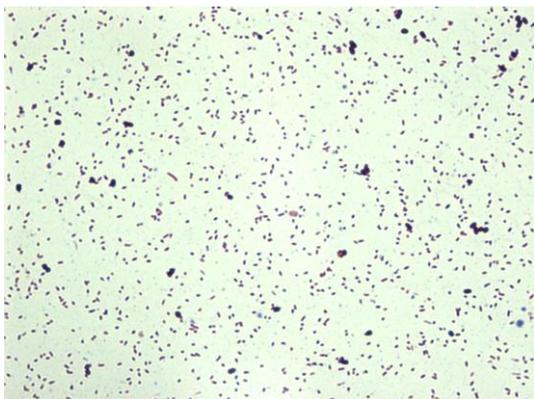
Isolado A13-4



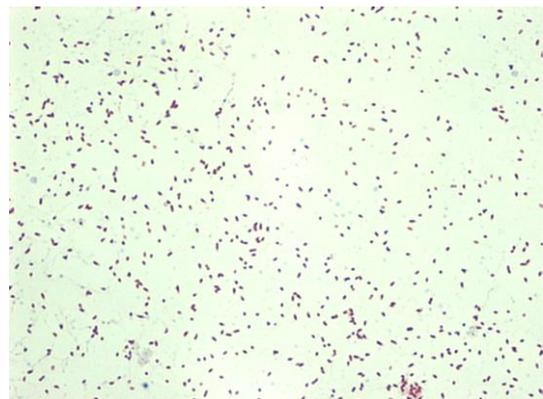
Isolado A13-5



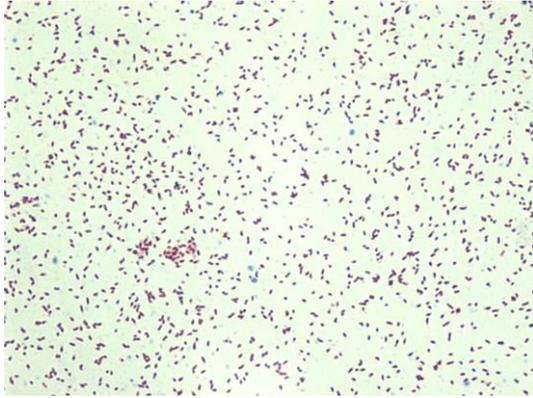
Isolado A14-1



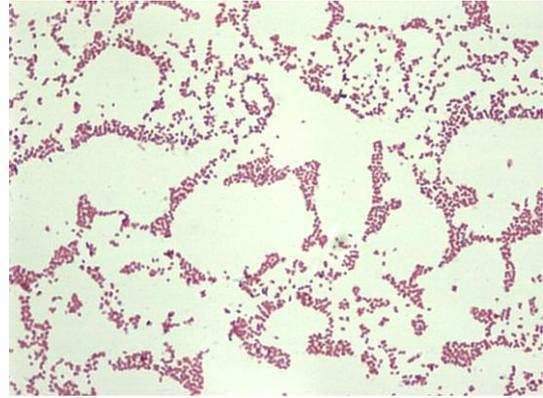
Isolado A14-2



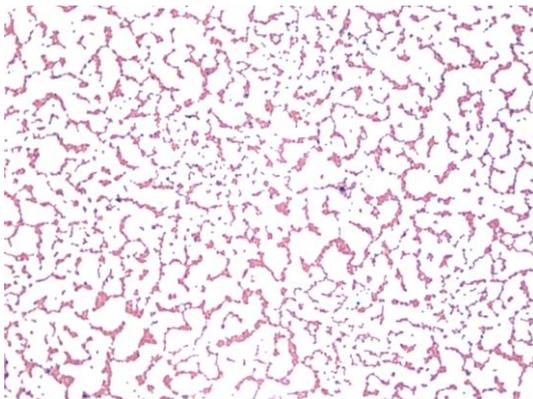
Isolado A14-3



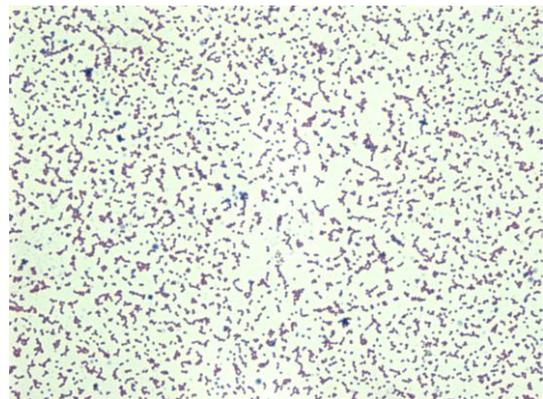
Isolato A14-4



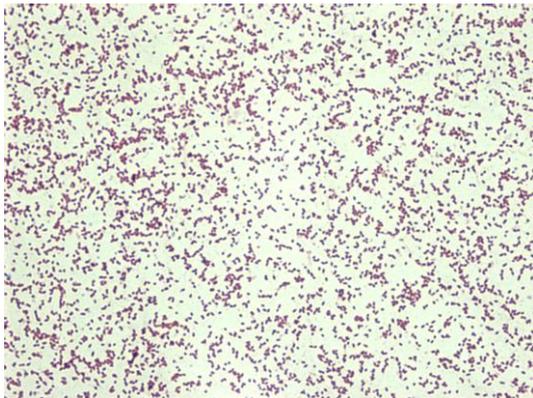
Isolato A14-5



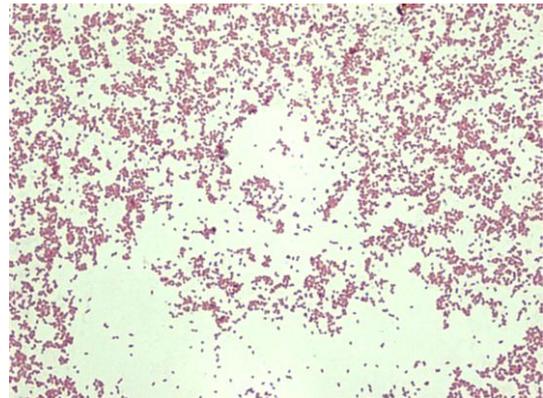
Isolato A15-1



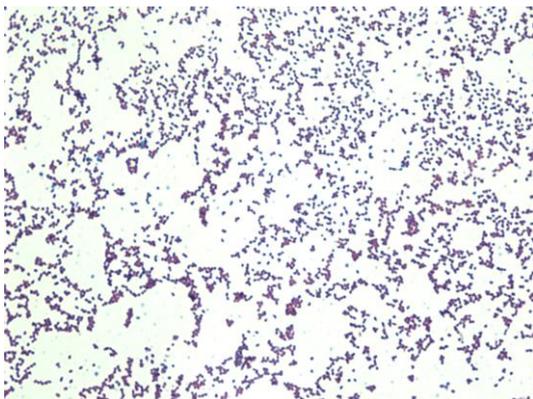
Isolato A15-2



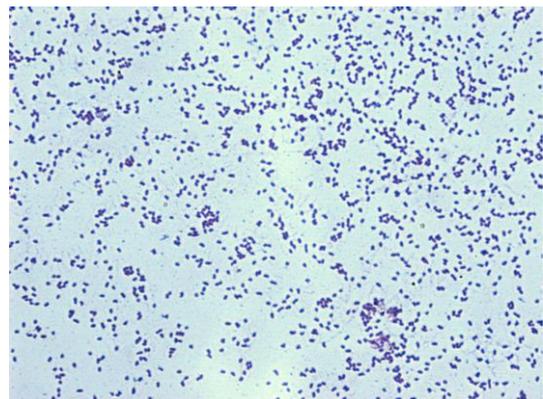
Isolato A15-3



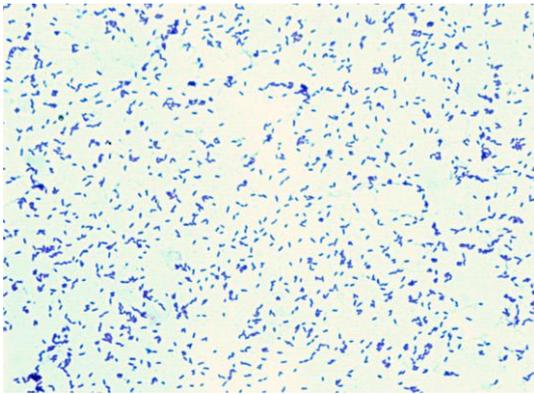
Isolato A15-4



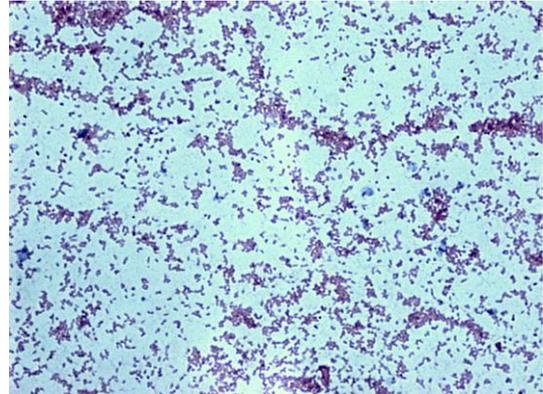
Isolato A18-1



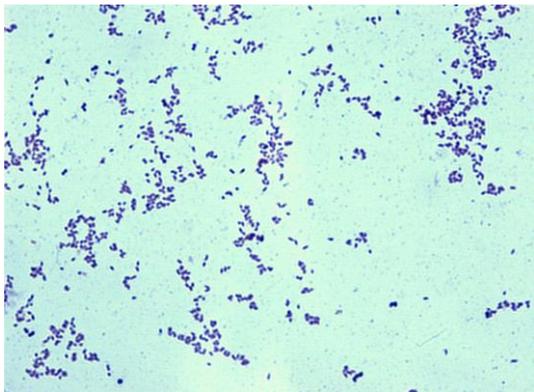
Isolato A19-1



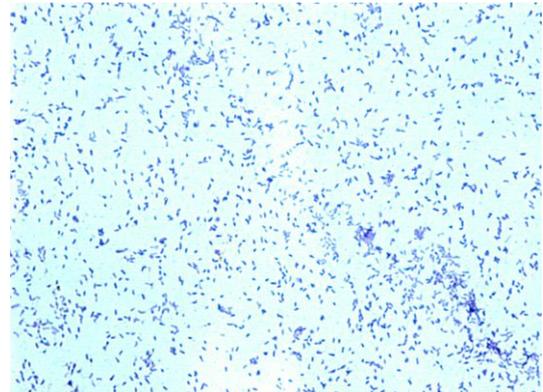
Isolado A19-2



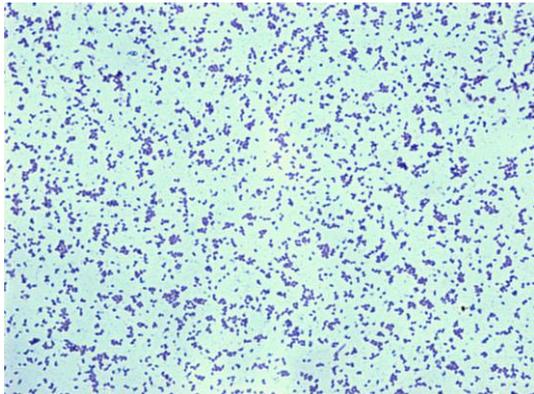
Isolado A20-1



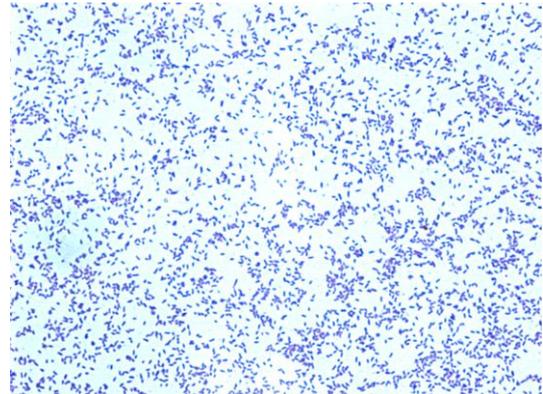
Isolado A20-2



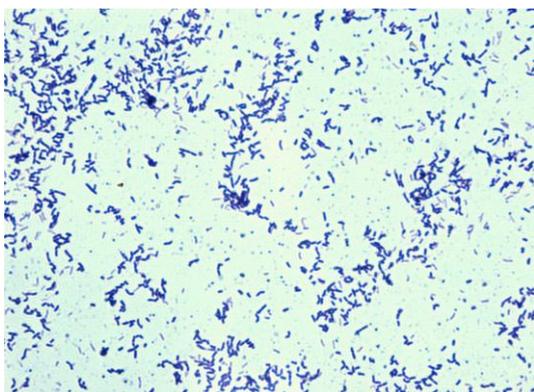
Isolado A20-3



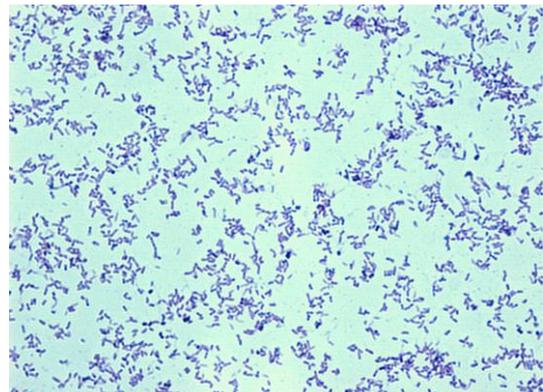
Isolado A20-4



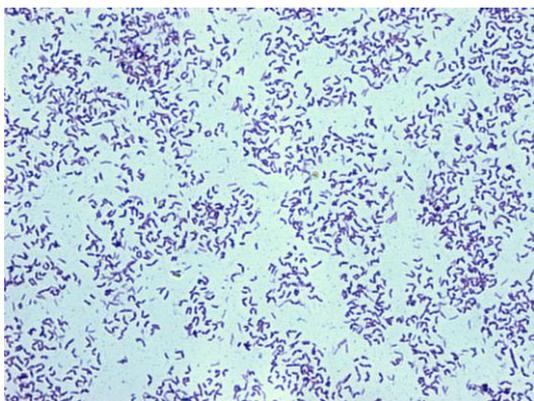
Isolado A20-5



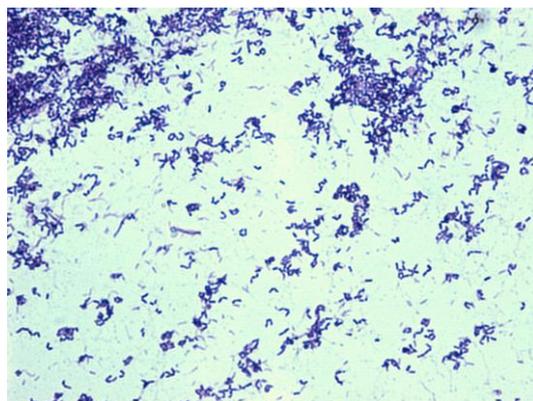
Isolado A21-1



Isolado A21-2



Isolato A21-3



Isolato A21-4

**Anexo II**  
**Resumos Expandidos Publicados em Anais de Congresso**



# XI ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO

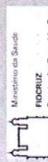
Fortaleza, 4 a 7 de novembro de 2008

**Certificamos que o trabalho "ISOLAMENTO DE ESTIRPES BACTERIANAS COM CAPACIDADE DE DESSULFURIZAÇÃO DO DIBENZOTIOFENO, PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE SOLO DO CONTINENTE ANTÁRTICO" de autoria de DOUGLAS BONIEK; DÉBORA FIGUEIREDO; LÍVIA GONZAGA; GABRIELA DUARTE foi apresentado no XI Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental e X Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo na forma de pôster.**

Regine Helena S. dos Fernandes Vieira  
Presidente IX ENAMA e X Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo

Luis Parente Maia  
Diretor do Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR - UFC

Realização:





XIII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICOBACTÉRIAS  
III SIMPÓSIO DE COLEÇÕES DE CULTURAS  
II SIMPÓSIO DE ESCHERICHIA COLI "LUIZ RACHID TRABALSI"

# Certificado

Certificamos que o trabalho "BIOPROSPECÇÃO DE ESTIRPES BACTERIANAS ASSOCIADAS À CAPACIDADE DE DESSULFURIZAÇÃO DO DIBENZOTIOFENO PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE SOLO E SEDIMENTOS DO CONTINENTE ANTÁRTICO" com a autoria de: BONIEK, D., FIGUEIREDO, D., GONZAGA, L. V., NEVES, C. S., RESENDE, V. L., PESSOA, L. F., DUARTE, G. F. foi apresentado na forma de pôster durante o "25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA" em 09 de Novembro de 2009, em Porto de Galinhas-PE.

Marina Baquerizo Martinez  
Presidente da SBM

Carlos Pelleschi Taborda  
1º Secretário da SBM

Porto de Galinhas, 12 de novembro de 2009.

**Anexo III**  
**Participação de Cursos**



# XI ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO

Fortaleza, 4 a 7 de novembro de 2008

Certificamos que **DOUGLAS BONIEK SILVA NAVARRO** participou do mini-curso  
“**BIOPROSPECÇÃO DE MICROORGANISMOS USADOS NA BIORREMEDIAÇÃO**”  
com carga horária 3h/aula durante o **XI Encontro Nacional de Microbiologia  
Ambiental e X Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo.**

Regine Helena S. dos Fernandes Vieira

Presidente IX ENAMA e X Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo

Luis Parente Maia

Diretor do Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR - UFC

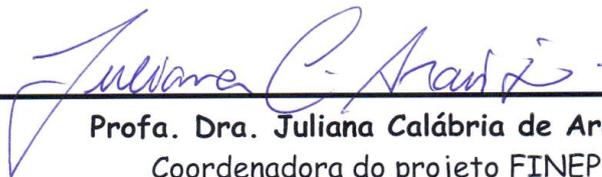
Realização:



## CERTIFICADO

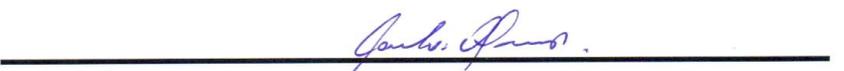
Certificamos que *Douglas Boniek Navarro* participou do Curso "Teórico-prático nas técnicas de Extração de DNA, PCR e FISH para detecção e quantificação de microrganismos em sistemas de tratamento de efluentes", realizado no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, da Universidade Federal de Minas Gerais, de 1º a 04 de junho de 2009, em Belo Horizonte, MG. Este curso foi oferecido no âmbito da Rede de Laboratórios Nacionais de Microbiologia Aplicada ao Saneamento Ambiental (LNMASA).

Carga horária: 32 (trinta e duas) horas-aula



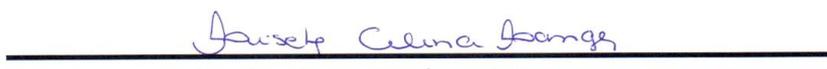
---

Prof. Dra. Juliana Calábria de Araújo  
Coordenadora do projeto FINEP



---

Prof. Dr. Carlos Augusto Lemos Chernicharo  
Coordenador do Laboratório de Microbiologia/DESA/UFMG



---

Prof. Dra. Liséte Celina Lange  
Chefe do DESA/UFMG

Belo Horizonte, 04 de junho de 2009

# 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](#)