



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS
PÓS - GRADUAÇÃO EM GEOQUÍMICA:
PETRÓLEO E MEIO AMBIENTE - POSPETRO**

WILMA BRANDÃO DE ANDRADE

**BACTÉRIAS ENDÓGENAS DEGRADADORAS DE BTXNA REMEDIAÇÃO DO
SEDIMENTO CONTAMINADO DE MANGUEZAL**

Salvador

2015

WILMA BRANDÃO DE ANDRADE

**BACTÉRIAS ENDÓGENAS DEGRADADORAS DE BTX NA REMEDIAÇÃO DO
SEDIMENTO CONTAMINADO DE MANGUEZAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente(POSPETRO), da Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Geoquímica do Petróleo e Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Joil José Celino
Co-Orientador: Prof. Dr. Fábio Alexandre Chinalia

Salvador
2015

Elaborada pela Biblioteca do Instituto de Geociências da UFBA

A553 Andrade, Wilma Brandão de.

Bactérias endógenas degradadoras de BTX na remediação do sedimento contaminado de manguezal / Wilma Brandão de Andrade.- Salvador, 2015.

71 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Joil José Celino.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Geociências, 2016.

1. Manguezais - Poluição. 2. Biorremediação. 3. Hidrocarbonetos.
I. Celino, Joil José. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Geociências. III. Título.

Bactérias Endógenas Degradoras de BTX na Remediação do
Sedimento Contaminado de Manguezal,
por

Wilma Brandão de Andrade.

(Bacharelado em Biologia – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB - 2013, Cruz das Almas - Ba)

Orientador: **Prof. Dr. Joil José Celino**
Co-Orientador: **Prof. Dr. Fábio Alexandre Chinalia**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

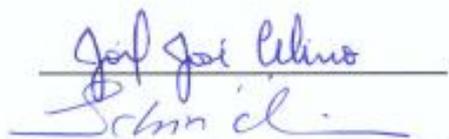
Submetida em satisfação parcial dos requisitos do grau de

MESTRE EM GEOQUÍMICA DO PETRÓLEO E AMBIENTAL

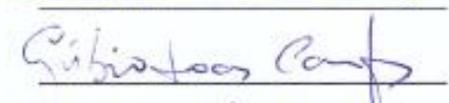
À Câmara de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal da Bahia

APROVAÇÃO

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Joil José Celino (UFBA)



Prof. Dr. Fábio Alexandre Chinalia (UFBA)



Prof. Dr. Gubio Soares Campos (UFBA)



Prof. Dr. Ícaro Thiago Andrade Moreira (UNIFACS)

Data da Defesa Pública: 24/09/2015

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

*Veja
Não diga que a canção está perdida
Tenha fé em Deus, tenha fé na vida
Tente outra vez*

*Beba
Pois a água viva ainda está na fonte
Você tem dois pés para cruzar a ponte
Nada acabou*

*Tente
Levante sua mão sedenta e recomece a andar
Não pense que a cabeça aguenta se você parar,
não, não, não, não
Há uma voz que canta,
uma voz que dança,
uma voz que gira
Bailando no ar*

*Queira
Basta ser sincero e desejar profundo
Você será capaz de sacudir o mundo, vai
Tente outra vez*

*Tente
E não diga que a vitória está perdida
Se é de batalhas que se vive a vida
Tente outra vez*

Raul Seixas

AGRADECIMENTOS

Se você está lendo esta página é porque eu consegui. E não foi fácil chegar até aqui. Do processo seletivo, passando pela aprovação até a conclusão do Mestrado, foi um longo e doloroso caminho percorrido. Nada foi fácil, nem tão pouco tranquilos, noites em claro e saudades de casa, foi rotina. Durante esses dois anos só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me permitir acreditar na beleza da vida, e os de sofrimento, serviram para um crescimento pessoal único. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação POSPETRO por me ensinarem que a pesquisa extrapola a ciência e a técnica, e requer virtudes como respeito, humildade, alegria, disponibilidade às mudanças, persistência, acreditar em você e seu potencial, principalmente, diálogo. Cada um voluntário ou involuntariamente, desde um sorriso ou até mesmo “vai dar certo, você consegue” Contribuiu para o meu sucesso, ao título.

Primeiramente, agradeço a Joil Celino, por acreditar que eu era capaz e pela orientação. Mesmo chegando sem me conhecer direito, você abriu as portas para mim.

Em especial ao meu Co-Orientador Fábio Chinalia, que desde o primeiro convite não pensou duas vezes em ser meu Co-Orientador. Obrigada por me adotar como se fosse meu segundo pai, lembra? Você me fez acreditar que eu era capaz de chegar e cheguei !!!!. Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, palavras de incentivo, puxões de orelha, paciência e dedicação. Você é uma pessoa ímpar, onde busco inspirações para me tornar melhor em tudo faço e irei fazer daqui para frente.

À Larissa Pinheiro, pelo incentivo, amizade e dedicação. Você esteve ao meu lado durante esse um ano (incluindo as matinês e altas horas da noite na tal cinética de crescimento), e não mediu esforços para me ajudar

À Prof. Dr. Gubio Soares, pelos ensinamentos, orientações, contribuições e por me receber em seu laboratório de portas abertas e sempre estar à disposição, respondendo minhas dúvidas e me incentivando a acreditar que tudo daria certo. Realmente, deu certo, e você é parte essencial.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia Ambiental, a ajuda de vocês foi essencial para esse trabalho.

Rocio Niño, obrigada pelos incentivos na parte experimental seja durante o dia ou noite, sábados, domingos e feriados. Por acreditar que tudo daria certo no final, mesmo quando a esperança era quase nula. Pelo ouvido que escutou tantas reclamações e pelas risadas que amenizavam o stress diário. Camila Pain, sempre dispostas a ajudar, você foi fundamental nesses dois anos de trabalho, desde os pequenos até os grandes problemas, obrigada!!. Cinthia Rial, Cinthia Santos, Adriele Leite e Daiane, Diego Ramires e Leila. Muito obrigada pelas conversas, risadas, ajudas e companheirismo.

Não posso deixar de citar os nomes que mais participaram diariamente da minha luta nesses dois anos, Sarah Rocha, Giselle Moraes (por me “salvarem” na tal leitura no espectrofotômetro que tanto me tirava o juízo, não é meninas?), Karina Garcia, Jorginho, Rui, Josi, Adriana, Icaro, Isabel, Nana, Cicero, Alex, e toda a equipe que forma o NEA/LEPETRO... Ninguém faz nada sozinho, ninguém chega a lugar algum sem apoio, orientação e participação. Muito obrigado por sempre me ajudarem e sempre dispostos a me ajudar e investirem seus tempos comigo.

A minha família que mais uma vez me apoiou e sabia que entre essas idas e vindas e rodoviárias, meses sem se ver e meu pai sempre dizendo “É assim mesmo minha filha, para colher algo na frente temos que passar muitas privações na vida para realizar um sonho”. A vocês todo o meu mais puro amor e a meu irmão por me acolher em sua casa e todos os dias vibrar com o meu trabalho mais do que eu e dizer que minha hora vai chegar.

Ao meu amor, Alberto Ventin, que não é apenas meu namorado, mas sim meu cúmplice, por ser minha fortaleza quando eu queria me render dessa batalha, foi meu amigo, companheiro, rindo e chorando sempre junto comigo, acalentando meu coração, você também é culpado por essa vitória.

Agradeço a CAPES pela bolsa que me permitiu sobreviver durante o período do mestrado e ao programa de Pós-Graduação da POSPETRO, pelas oportunidades e confiança, espero ter alcançado as expectativas de vocês.

Agradeço aos novos amigos que fiz nesses dois anos e aos velhos amigos, pela compreensão da minha ausência, em vários momentos. A vocês, dedico meu eterno amor, respeito. Gratidão por tudo que vocês representam para mim e por acreditarem na minha história.

RESUMO

Hidrocarbonetos monocromáticos como benzeno, tolueno e xileno (BTX) são contaminantes ambientais de alta toxicidade para a comunidade microbiana. O objetivo desse trabalho foi isolar, identificar, caracterizar cineticamente e testar *in loco* bactérias degradadoras de BTX presentes em sedimento de manguezal da BTS. Foram isoladas através de plaqueamento 12 amostras tendo o petróleo como única fonte de carbono. Os resultados obtidos apontam que as sequências encontradas na filogenia do 16s rRNA gerada indicaram que, as cepas LEPETRO-128A, LEPETRO-67C, LEPETRO-5A, LEPETRO-128B, LEPETRO-155I, LEPETRO-155E, foram agrupadas a classe Gamaproteobacteria, com uma probabilidade de 61% de serem da mesma espécie *Pseudomonamonteilli*, 85% com a *Pseudomonas putida* e 62% com a *Pseudomonas fulva*. Já as sequências das cepas LEPETRO-102A, LEPETRO-67F e LEPETRO-155A, foram agrupadas a classe das Enterobacteria, com probabilidade de 93-99% de pertencerem a mesma espécie *Acinetobactercalcoaceticus* e com 100% de probabilidade de serem da mesma espécie da *Proteuspenneri*. A cepa LEPETRO-155E foi agrupada a classe das Flavobacteria com 100% de probabilidade de serem a mesma espécie da *Wautersiella*. Um cluster foi construído para comparar as relações homologas dentre as cepas, onde 9 foram homologas a enzima C120, partilhado da mesma característica, sendo que seis (LEPETRO-128B, LEPETRO-67C, LEPETRO-155C, LEPETRO-155I, LEPETRO-155E, LEPETRO-05A), são homologas. Já a cepa LEPETRO-128A e LEPETRO-155A possuem uma similaridade, porém, são distintas das LEPETRO-128B, LEPETRO-67C, LEPETRO-155C, LEPETRO-155I, LEPETRO-155E, LEPETRO-05A, e da cepa LEPETRO-67F possui uma dissimilaridade entre as todas as cepas isoladas. Os testes de cinética de crescimento apontam que o isolado LEPETRO-155 C, tendo os compostos benzeno, tolueno e xileno (BTXs), obteve uma melhor resposta em teste laboratorial como única fonte de carbono, para o processo de bioaumentação *in situ*, podendo degradar estes contaminantes em relação aos outros isolados testados em bancada. Em microcosmo no consumo de O₂ em microcosmo a cepa LEPETRO-155C teve maior coeficiente de consumo de oxigênio, para Xileno ($2,22 \square 1 \text{ O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}_{\text{sedimento}}^{-1}$), tolueno de $1,46 \square 1 \text{ O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}_{\text{sedimento}}^{-1}$, já em benzeno de $1,33 \square 1 \text{ O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}_{\text{sedimento}}^{-1}$, um menor coeficiente no consumo de oxigênio em relação a cepa LEPETRO-05A, que teve um consumo de oxigênio de $1,56 \square 1 \text{ O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}_{\text{sedimento}}$.

Palavras-Chave: bactérias, hidrocarbonetos, sedimento, manguezal, biorremediação

ABSTRACT

Monochromatic hydrocarbons such as benzene, toluene and xylene (BTX) are highly toxic environmental contaminants to the microbial community. The aim of this study was to isolate, identify, kinetically characterize and test-site BTX degrading bacteria present in mangrove sediment in BTS. Twelve samples were isolated by plating and oil was its unique carbon source. The results suggest that the sequences found in the 16s rRNA phylogeny indicated that the LEPETRO-128A, LEPETRO-67C, LEPETRO-5A, LEPETRO-128B, LEPETRO-155I, LEPETRO-155E strains were grouped to the Gamaproteobacteria class, with 61% probability of being the same species *Pseudomonas monteilli*, 85% *Pseudomonas putida* and 62% *Pseudomonas fulva*. Since the sequences of strains LEPETRO-102A, LEPETRO-67F and LEPETRO-155A were grouped to the Enterobacteria class, with 93-99% probability belonging to the same species *Acinetobacter calcoaceticus* and 100% probability being the same species *Proteus penneri*. The LEPETRO-155E strain was grouped to the Flavobacteria class, with 100% probability being the same species *Wautersiella*. A cluster was built to compare the homologous relationships among strains, in which 9 were homologous to C120 enzyme, sharing the same characteristic, and six (LEPETRO-128B, LEPETRO-67C, LEPETRO-155C, LEPETRO-155I, LEPETRO-155E, LEPETRO-05A), are homologous. Since strain LEPETRO-128A and LEPETRO-155A have a similarity, however, they are distinct from strains LEPETRO-128B, LEPETRO-67C, LEPETRO-155C, LEPETRO-155I, LEPETRO-155E, LEPETRO-05A, and the strain LEPETRO-67F has one dissimilarity among all isolates. The growth kinetics tests show that the isolated LEPETRO-155 C, with the compounds benzene, toluene and xylene (BTXs) reach a better response in laboratory test as a unique carbon source for the bioaugmentation process in situ and may degrade these contaminants in relation to other isolates tested. In microcosm in the consumption of O₂ in microcosm the LEPETRO-155C strain had higher coefficient of oxygen consumption, xylene (2.22 ml O₂ h⁻¹g_{sedimento}⁻¹), toluene 1.46 ml O₂ h⁻¹g_{sedimento}⁻¹, since in benzene 1.33 ml O₂ h⁻¹g_{sedimento}⁻¹, a lower coefficient of oxygen consumption compared to LEPETRO-05A strain, which had an oxygen consumption of 1.56 ml O₂ h⁻¹g_{sedimento}⁻¹.

Keywords: BTX, bacteria, bioremediation, hydrocarbon, mangrove, sediment

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi apoiado pelo projeto intitulado Suporte a Processos de Inovação Tecnológica do POSPETRO - Projeto FAPESB nº 2992/2012 que visa a aquisição dos equipamentos que serão ferramentas facilitadoras para a produção de conhecimentos nas áreas estratégicas de petróleo e meio ambiente e realizado em parceria entre Instituto de Geociências (IGEO) através da Pós-graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente, e pelo Instituto de Ciência e Saúde (ICS), Laboratório de Virologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Os resultados constituem respostas a objetivos específicos do projeto de pesquisa da autora, intitulado “viabilidade do uso de bactérias endógenas degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos para a biorremediação de sedimento de manguezal contaminado”. A execução da pesquisa contou também com o auxílio do corpo técnico e docente do Núcleo de Estudos Ambientais (NEA) e do Laboratório de Estudo do Petróleo (LEPETRO), com destaque para a participação e treinamento de iniciação científica da aluna Larissa Pinheiro com auxílio financeiro de bolsa FAPESB.

A hipótese central deste trabalho foi a inoculação de bactérias endógenas capazes de degradar petróleo, acelerando o processo de biorremediação. O objetivo geral foi isolar, identificar, caracterizar cineticamente e testar *in loco* bactérias degradadoras de BTX presentes em sedimento de manguezal da Baía de Todos os Santos. Os objetivos específicos foram: i) isolar, do sedimento de manguezal, bactérias capazes de crescer em petróleo como única fonte de carbono, ii) identificar as cepas bacterianas através do sequenciamento do 16S rRNA, iii) caracterizar geneticamente a catecol 1,2 dioxigenase (C120) que é a principal enzima associada a clivagem do anel aromático do BTX, iv) caracterizar a cinética de crescimento bacteriano em meio mineral contendo isoladamente BTX como única fonte de carbono, v) definir o efeito da adição dessas cepas na atividade microbiana de amostras ambientais contaminadas com BTX.

Em capítulo único, intitulado “viabilidade do uso de bactérias endógenas degradadoras de aromáticos para a biorremediação de sedimento de manguezal contaminado **“ENDOGENOUS BACTERIA-DEGRADING BTX IN SEDIMENT CONTAMINATED TO THE REMEDIATION OF MANGROVE”**”, é apresentado o artigo com os principais resultados e discussões do isolamento, identificação, caracterização cinética e testes *in loco* bactérias degradadoras.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVO	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS E COLORAÇÃO DE GRAM.....	21
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA	23
3.3 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1%	24
3.4 AMPLIFICAÇÃO DO PCR (<i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i>).....	25
3.5 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S RRNA E DA CATECOL 1,2 DIOXIGENASE (C120).....	26
3.6 AGRUPAMENTO FILOGENÉTICO DOS GENES 16S RRNA E CLUSTER DO GENE C120.....	26
3.7 BIOCINÉTICA DE CRESCIMENTO EM BTX	27
3.7.1 <i>Análise da cinética de crescimento em BTX</i>	28
3.8 DEGRADAÇÃO DE BTX NO SEDIMENTO DE MANGUEZAL EM MICROCOSMO.29	
3.8.2 <i>crescimento de biomassa das cepas bacterianas</i>	31
4. BACTÉRIAS ENDÓGENAS DEGRADADORAS DE BTX NA REMEDIAÇÃO DO SEDIMENTO CONTAMINADO DE MANGUEZAL	35
4.1. INTRODUÇÃO.....	36
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.2.1 <i>ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS E MÉTODO DE GRAM</i>	37
4.2.2 <i>ANÁLISES MOLECULARES</i>	38
4.2.3 <i>AMPLIFICAÇÃO DE PCR -REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE</i>	38
4.2.4 <i>SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS</i>	39
4.2.5 <i>GENE 16 S RRNA E GENE C120</i>	39
4.2.6 <i>BIOCINÉTICA DE CRESCIMENTO EM BTX</i>	40
4.2.7 <i>BIODEGRADAÇÃO DE BTX EM SEDIMENTO DE MANGUE EM MICROCOSMO</i>	41
4.3. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	42

4.5 REFERÊNCIAS	49
5. CONCLUSÕES	57

I

LISTADE SIGLAS E ABREVIATURAS

μL – microlitro

μM – micromol

BH – Buschnell Haas

BTS – Baía de Todos os Santos

BTX – Benzeno, Tolueno, Xileno

D.O – Densidade Ótica

D.O – Densidade Ótica

DNA – O ácido desoxirribonucleico

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPA – Environmental Protection Agency

IARC- Agência Internacional de Controle do Câncer

ICS Instituto de Ciência e Saúde

IDT – Integrated DNA Technologies

IGEO – Instituto de Geociências

Kb – kilobases

MH – Mueller Hilton

mM – Milimolar

mV – Milivoltz

NEA – Núcleo de Estudos Ambientais

PCR – reação em cadeia da polimerase

Pg – Pico grama

POSPETRO- PósGraduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente

Primer - DNAs iniciadores

R1,R2, R3 - repetição 1, repetição 2, repetição 3

rRNA – RNA ribossomal

SINDIPETRO - Sindicato dos petroleiros

TBE - Tris/Borato/EDTA

UFBA - Universidade Federal da Bahia

UFC – Unidade Formadora de Colônia

λ –marcador molecular

1 INTRODUÇÃO

Hidrocarbonetos monoaromáticos como benzeno, tolueno e xileno (BTX) são contaminantes ambientais de alta toxicidade para a comunidade microbiana (ANNESER et al., 2008; JO et al., 2008).

A alta mobilidade dos BTX comparada com os outros hidrocarbonetos presentes no combustível fóssil favorece a contaminação de sistemas de água e de solo. Embora esses compostos tenham um coeficiente de partição menor que os outros constituintes do petróleo, ainda podem facilmente adsorver aos constituintes do solo e tornarem-se não biodisponíveis, tornando-os de difícil biorremediação por processos naturais (WATTS et al., 2000).

Os processos biológicos de recuperação ambiental, como biorremediação, cujo objetivo da técnica é acelerar o processo de transformação de substâncias complexas e recalcitrantes em substâncias essencialmente inócuas ou menos tóxicas por meio de microrganismos e de suas enzimas, através de metabolismo aeróbios ou anaeróbios (EL FANTROUSSI; AGATHOS, 2005; ALUYOR et al., 2009) são considerados uma tecnologia promissora e limpa, pois seu princípio é compatível com as rotas biogeoquímicas naturais de reciclagem de nutrientes (EL FANTROUSSI; AGATHOS, 2005), assim como por causa de sua simplicidade, baixo custo (BENTO et al., 2005) e eficácia quando comparado com outras alternativas ou técnicas convencionais (ALEXANDER, 1994; BERTIN et al., 2007; MASSALHA et al., 2007).

O período de vida média está diretamente associado a processos limitantes associados a biodisponibilidade e densidade de bactérias degradadoras *in situ* devido a influência do coeficiente de partição. O tempo médio de vida dos BTX na água, sedimento e/ou solo é entre 21 e 30 dias e suas concentrações no final de 30 dias é de 0.3 µg/m³ (PHELPS & YOUNG, 1999; ZABIEGALA et al., 2010).

Desta forma, a seleção de cepas bacterianas com capacidade de produção de biossurfactantes pode ser um importante instrumento para o desenvolvimento de processos de biorremediação que são baseados na reinoculação desses organismos diretamente no local contaminado diminuindo assim a vida média dos monoaromáticos.

Um dos processos é a bioaugmentação, que está relacionada com as cepas ambientais, já que cepas exógenas não perduram devido a não resistirem a competição com os microrganismos do próprio ambiente, podendo ser predados pelos protozoários. A concorrência com microrganismos autóctones de nutrientes ou receptores de elétrons, e a

presença de raízes que liberaram compostos orgânicos, são elementos bióticos que impactam negativamente a bioaugmentação, por isso a importância de selecionar as bactérias com alto potencial no processo de bioaugmentação, isolando-as no próprio meio ambiente com o objetivo de minimizar esses impactos de uma forma mais rápida e eficaz. (DYBAS et al., 2002; MAJOR et al., 2002; VAN VEEN et al., 1997). Um exemplo é a caracterização dessas enzimas através de marcadores moleculares como o C120, catecol 1,2 dioxigenase, primeira enzima relacionada com a clivagem do anel aromático do BTX (HARAYAMA & TIMMIS, 1992).

Os BTX são largamente utilizados como substâncias químicas em vários processos industriais (HUTCHINS et al., 1991, LIN et al., 2010), e também estão presentes em quantidades elevadas nos combustíveis fósseis (ASTDR, 2004). Dessa forma os BTX podem contaminar solos e sedimentos através de derramamentos acidentais de combustíveis fósseis e/ou por despejos inadequados de resíduos industriais (ANNESER et al., 2008).

O seu coeficiente de partição octanol-água é de duas a quatro vezes menor do que para hidrocarbonetos alifáticos resultando em uma adsorção mais lenta no solo. Nesse caso, esses compostos são facilmente transportados pela água, contaminando os reservatórios e o lençol freático (NAKHLA, 2003).

Desde então, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar microrganismos eficientes para a degradação de BTX, de modo que pudessem ser utilizados na reparação ambiental, já que um dos principais fatores limitantes da biorremediação são a biodisponibilidade e a presença ou densidade de organismos degradantes (RIDGWAY et al., 1990; LEE et al., 1994; OTENIO et al., 2005; SHIM et al., 2005; LIN et al., 2010).

A aplicação de biorremediação para restaurar hidrocarboneto do solo contaminado são muitas vezes limitadas pela presença, no interior da mistura de contaminantes, de pouco biodisponível e produtos químicos altamente recalcitrantes. Compostos caracterizados por baixa solubilidade e alta hidrofobicidade tendem a ser fortemente sorvidos a matéria orgânica do solo e são pouco disponíveis para microrganismos para a degradação (VOLKERING et al., 1998; WANG et al., 1998). Esta limitação pode ser ultrapassada pela utilização de surfactantes (FRANZETTI et al., 2008).

A biorremediação é o processo mais utilizado no processo de descontaminação do ambiente por BTX, onde os microrganismos através da decomposição produzem a oxidação da matéria orgânica em substâncias mais simples como CO_2 e H_2O (ou CH_4 e CO_2). Os problemas com a biodisponibilidade desses compostos no ambiente são mais facilmente resolvidos do que com hidrocarbonetos de alto peso molecular. Em essência, o tratamento

biológico fundamenta-se na utilização dos compostos tóxicos de mais fácil difusão na água e que podem ser utilizados como substrato para o crescimento e a manutenção de microrganismos. Esses compostos são utilizados como fonte de energia, e essa atividade, portanto, diminui assim a vida média dos BTX no ambiente contaminado (MILLS et al., 2003; MEYSAMI et al., 2003).

Existem bactérias que além de degradarem BTX podem também produzir biossurfactantes alterando assim a biodisponibilidade desses compostos no ambiente. As biossurfactantes podem alterar o coeficiente de partição do BTX na matriz ambiental tornando biodisponível esses compostos para a atuação dos microrganismos (DIAZ et al, 2004; NOJIRI & TSUDA, 2005). Além disso, a sua capacidade de rapidamente trocar informação genética confere as bactérias um potencial metabólico potencialmente flexível (MEER, 1994; JANSSEN et al, 2005; NOJIRI & TSUDA, 2005; ZHANG et al, 2006; PHALE et al, 2007), essa característica auxilia nos processos de biorremediação.

Portanto, em condições adequadas os microrganismos providenciam uma vasta gama do que pode ser definido como “serviços ambientais”, onde pode-se dizer que os gêneros bacterianos, tais como *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Microbulbifer*, *Sphingomonas*, *Micrococcus*, *Gordonia*, entre outros, são agentes importantes na manutenção dos serviços ambientais de biorremediação de petróleo por serem capazes de degradar hidrocarbonetos (BRITO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2011).

Para uma degradação mais eficiente desses hidrocarbonetos e melhores resultados, bactérias com um potencial metabólico de produzir biossurfactantes são isolados e caracterizadas em uma única estirpe ou consórcio microbiano para melhor emprego da biorremediação *in situ* sob condições controladas de laboratório (STOLZ & KNACKMUSS, 1993; SAMANTA et al., 1999).

A relação do microrganismo inoculado com os seus novos ambientes bióticos e abióticos, em termos de sobrevivência, atividade e migração, pode ser decisiva para o resultado de qualquer estratégia de bioaugmentação, especialmente em um biótopo complexo e dinâmico, tal como solos e sedimentos (VAN VEEN et al, 1997).

O rápido declínio no tamanho da população de células microbianas ativas incubadas em solo ativo é atribuído a ambos os fatores bióticos e abióticos, entretanto os fatores bióticos tem mais consequência nas células microbianas do que num solo estéril devido a predação por protistas, a concorrência com microrganismos autóctones de nutrientes ou receptores de elétrons, e a presença de raízes que liberaram compostos orgânico, são elementos bióticos que

impactam negativamente bioaugmentação(VAN VEEN et al., 1997), já em solo estéril, este ambiente é geralmente muito mais hospitaleiro para microrganismos externos do que em solo natural (FANTROUSSI et al., 1999) em relação aos microrganismos internos, conseqüentemente, não perdurando na amostra ambiental

Uma área de importante de impulso de estudos de biorremediação tem sido a caracterização das vias metabólicas e seus respectivos regulamentos moleculares, através de enzimas específicas capazes de quebrar a ligação do anel aromático dos hidrocarbonetos (HAGGBLOM et al, 1990; ARAI et al, 2000; SOLYANIKOVA & GOLOVLEVA, 2004; BRUCE, 2006).

A maioria dos estudos sobre a biorremediação *in situ* havia focado apenas na cinética de degradação de poluentes; no entanto, com o advento de métodos de ecologia molecular, tem havido uma mudança de paradigma para abranger o comportamento da comunidade como um estudo complementar para a biorremediação estudos *in situ* (PUROHIT et al, 2003; PAUL et al, 2006a). Por exemplo, existem espécies bacterianas que apresentam variações potenciais em sua informação genética, como na capacidade de produção de biosurfactantes, a presença de plasmídeos, entre outras possibilidades, que conferem diferenças metabólicas significativas a indivíduos da mesma espécie. Por tanto, mesmo dentro das mesmas espécies, existem estas variações que podem ser mais adequadas ao processo de biorremediação do que outras. Em tais casos, a melhor estratégia para a biorremediação seria, portanto, a inoculação do biótipo ou da variante com o melhor potencial ecofisiológico para realizar a biorremediação por bioaugmentação. (FANTROUSSI& AGATHOS, 2005).

Podemos definir bioaugmentação como uma técnica de biorremediação que tem como objetivo recuperar uma área ou ambiente contaminado (solo ou outro biótopo) através do isolamento de microrganismos endógenos específicos com potencial surfactante na produção de biosurfactantes, presentes no biótopo por meio de marcadores moleculares caracterizando assim essas enzimas mais eficazes na biodegradabilidade de compostos tóxico em áreas contaminadas. Nos últimos anos, aplicações de microrganismos endógenos para biorremediar áreas contaminadas, estão sendo bastante documentadas em campo (DYBAS et. al., 2002; MAJOR et. al., 2002), como a grande maioria dos relatos reportando experimentos em escala laboratorial (microcosmo) ou estudos de demonstração em escala (mesocosmo).

No caso de biodegradação aeróbia, as vias metabólicas periféricas são representadas por reações catalisadas por: mono-oxigenases e/ou di-oxigenases, que transformam o substrato original em seus derivados hidroaromático, por exemplo, catecol. Estes intermediários podem atuar como substratos para enzimas que fazem a clivagem do anel

aromático podendo ser aberto por clivar a ligação entre dois átomos de carbono vizinhos que transportam grupos hidroxila (HARAYAMA & TIMMIS, 1992).

Um dos passos chave na degradação bacteriana de compostos aromáticos no ambiente é a clivagem do anel aromático que geralmente é realizado pela oxidação do catecol e catecóis substituídos (NISHIZUKA et al., 1962). A clivagem do anel é catalisada por dioxigenases que utilizam um grupo heme Fe (III) para desestabilizar a ligação carbono-carbono através da inserção de uma molécula de oxigênio. Portanto, em bactérias, processos de biorremediação aeróbios, o oxigênio não é apenas acceptor terminal de elétrons para a conservação da energia respiratória, mas também um reagente indispensável no mecanismo de ativação (WIDDEL & RABUS, 2001).

Resumidamente, a degradação aeróbia de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias podem ser geralmente, divididas em três partes:

- (i) o composto aromático é transformado em um metabólito intermediário central da via de degradação dos hidrocarbonetos aromáticos, normalmente um catecol, através da introdução de grupos hidroxila por enzimas periféricas, com função de reconhecer as moléculas dos hidrocarbonetos aromáticos e convertê-las em intermediários centrais (BUGG & WINFIELD 1998, KANALY & HARAYAMA 2000, WIDDEL & RABUS 2001, SCRAMIN et al. 2003, DÍAZ, 2004, JACQUES et al. 2007);
- (ii) as enzimas de fissão convertem os intermediários centrais em compostos que são utilizados nas vias comuns de geração de carbono e energia da bactéria, para então ocorrer a abertura do anel, que catalisam a adição de oxigênio molecular ao anel) (HEIDER & FUCHS 1997, BUGG & WINFIELD 1998, KANALY & HARAYAMA 2000, SCRAMIN et al. 2003, DÍAZ 2004, JACQUES et al. 2007);
- (iii) e o produto resultante da abertura do anel é convertido em produtos que entram no ciclo de Krebs (KANALY & HARAYAMA 2000, SCRAMIN et al. 2003, DÍAZ 2004, JACQUES et al. 2007).

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar, identificar, caracterizar cineticamente e testar com amostras ambientais bactérias degradadoras de BTX isoladas de sedimento de manguezal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

i) isolar, do sedimento de manguezal, bactérias capazes de crescer em petróleo como única fonte de carbono.

ii) identificar as cepas bacterianas através do sequenciamento do 16S rRNA

iii) caracterizar geneticamente a catecol 1,2 dioxigenase (C120) que é a principal enzima associada a clivagem do anel aromático do BTX

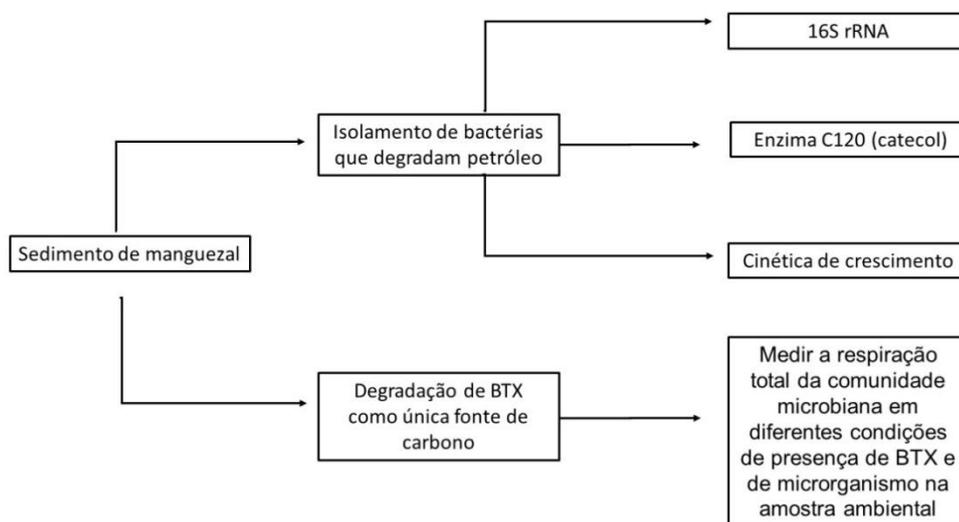
iv) caracterizar a cinética de crescimento bacteriano em meio mineral contendo isoladamente BTX como única fonte de carbono.

v) definir o efeito da adição dessas cepas na atividade microbiana de amostras ambientais contaminadas com BTX.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de sedimento de manguezal foram coletadas por FIORAVANTI (2013) e cepas bacterianas isoladas através de plaqueamento. O petróleo foi utilizado como única fonte de carbono no processo de isolamento e seleção das bactérias. Após a confirmação da pureza das colônias bacterianas obtidas, estas foram utilizadas nos experimentos de microcosmo com o sedimento do manguezal contaminado por BTX. Para a caracterização das cepas foi realizado testes de coloração, filogenia do 16S rRNA e da enzima catecol 1,2-dioxygenase e cinética de crescimento em meio sintético contendo BTX isoladamente. Para o monitoramento do experimento com o microcosmo foi utilizado a técnica de medição de respiração total da comunidade microbiana em diferentes condições de presença de BTX e de microrganismo. Mostrado em fluxograma de trabalho adotado nessa pesquisa (FIGURA 1).

Figura 1 – Desenho amostral das etapas executadas durante o trabalho: o isolamento, identificação, caracterização cineticamente e teste *in loco* das bactérias degradadoras de BTX presentes em sedimento de manguezal



Elaboração: a autora (2015)

3.1 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS E COLORAÇÃO DE GRAM

Como fase inicial desse trabalho, foram utilizados 12 isolados microbianos a partir dos ensaios de degradação já preservados de manguezais em pesquisa anterior (FIORAVANTI, 2013) e selecionados pela sua morfologia de colônia no Núcleo de Estudos

Ambientais (NEA), localizado na Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia (APÊNDICE A).

Para reativar os isolados, foi utilizado caldo de Mueller Hinton (MH), marca Difco, (composto de 3 g de extrato de carne bovina, 17,5 g de caseína hidrolisada, 1,5 g de amidopara 1 l de H₂O, para estado sólido acrescenta-se 20g de Agar ágar, sob pH 7,0 ± 0,2), e depois incubados por 48h a temperatura de 27°C para o restabelecimento do metabolismo microbiano. Para seleção das amostras, foi utilizado em placa de Agar Buschnell Haas (BH) com adição de 1% de petróleo (Apêndice A, figura1) e incubadas em estufa tipoa 27°C durante 4 dias. Após a incubação, foi realizada a diluição seriada, em que, quatro microtubos de 1,5 ml foi adicionado 1 ml de solução salina (9%), composto 9g de NaCl e 1 L de H₂O,junto com o Tween(80%), marca sigma, previamente autoclavados. Foi retirado 100µl da solução original com uma pipeta semiautomática e transferida para outro microtubo que por sua vez, já dilui a solução inicial (10⁻¹) até a diluição final (10⁻⁴), sendo que para cada diluição, os microtubos foram levados em vortex para agitação por 10 segundos na obtenção para suspensão uniforme retirando 100µl e com uma alça de *drigalki*, difundido uniformemente na placa de petri, tampadas e levadas a estufa novamente a 30°C durante 4 dias. Vale salientar que essas diluições foram repetidas várias vezes até se obter quantidades pequenas de colônias auxiliando assim a melhor separação entre colônias para sua seleção pura em placa de Agar Mueller Hinton (MH) a 30°C durante 24 horas, para crescimento de biomassa.

Para aplicação do método de Gram (ANEXO 1), foi inoculada cepas padronizadas em meio de cultura Miller Hilton (MH) para geração de biomassa em estufa, tipo BOD, 27°C, durante 24 horas. Posteriormente, se confeccionaram esfregaços com uma alça de platina previamente flambada e pipetado 10 µL a fim de dispensar uma quantidade aproximada de microrganismos em cada lâmina. Foi preparado 10 lâminas (esfregaços) das cepas bacterianas (ANEXO 2) onde foram verificadas frente ao protocolo de Gram obtido (FIGURA 2).

Figura2– Preparação das lâminas para a coloração de Gram e visualização das estruturas em microscópio ótico eletrônico



FOTO: a autora (2015)

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Feito o teste de coloração de Gram, foi adicionado 0,5 mL de cultura bacteriana em meio de cultura (M H) *overnight* e raspado com uma alça de platina em fluxo laminar e transferido para microtubos de 2 mL, contendo 1,5 mL água estéril e centrifugadas a $14.000 \times g$, por 2 minutos para formar um *pellet* de células.

Para a extração de DNA, foi utilizado o Kit de extração da Promega (Promega, Madison, WI, USA) (FIGURA 3), retirando o sobrenadante e adicionado a essas amostras 480 μ l de EDTA 50mM e levadas em vortex para ressuspender as células. Foi adicionado 600 μ l de *NucleiLysisSolution* (Kit) e encubado a 80° C por 5 minutos em banho maria. Depois foi adicionado 3 μ l de *RNaseSolution*(Kit) e invertido os tubos gentilmente de 2 a 5 vezes para misturar e incubado novamente a 37° C por 30 minutos apresentados no APÊNDICE B.

Figura 3 –Kit utilizado para a extração de DNA das cepas bacterianas



FOTO: a autora (2015)

Foram adicionados às amostras 200 μ l de *ProteinPrecipitationSolution* (Kit) e levadas em vortex vigorosamente e incubadas no gelo por 5 minutos. Depois essas amostras

foram centrifugadas a 14.000 x g por 3 minutos e transferido o sobrenadante, contendo o DNA para outro microtubo de 1,5 ml estéril, e adicionados 600 µl de isopropanol cuidadosamente. Gentilmente foi misturado por inversão até formar uma nuvem de DNA e levadas novamente para serem centrifugadas por 14.000 x g por 2 minutos.

Foi descartado vertendo cuidadosamente o sobrenadante e drenando o microtubo em papel absorvente limpo e adicionado 600 µl de etanol a 70% e suavemente foi invertido o microtubo várias vezes para lavar o *pellet* de DNA, em seguida levado para ser centrifugado a 14.000 x g por 2 minutos e cuidadosamente aspirado o etanol com a ajuda de uma micropipeta. Após essa etapa, foi escorrido o microtubo em papel absorvente limpo e foi permitido que o *pellet* ficasse em temperatura ambiente secando por 15 minutos e finalizado com a adição de 100 µl de DNA re-hidratação (Kit) e incubado a 65 ° C durante 1 hora e em seguida acondicionadas a freezer -80° C.

3.3 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1%

Os *primers* utilizados foram sintetizados pela equipe do Laboratório IDT (*Integrated DNA Technologies*).

Para teste de ampliações foram utilizados 2 *primers* (APÊNDICE C). Sendo o *primer* 27f 907r (16S rRNA), para identificação das cepas bacterianas e o *primers* C120 na identificação de enzimas específicas monoaromáticas degradadoras de BTEX. As reações foram realizadas com o Mix da Promega (Promega, Madison, WI, USA), para um volume final da reação de 50 µl, contendo: 25µl *GoTaq® Colorless Master Mix* 2 x, 1 µl *upstream primer* 10 µM, 1 µl *downstream primer* 10 µM, 1µl de DNA *templete* e 22 µl de água mile-Q.

Para a quantificação do DNA extraído, indicando a quantidade e DNA extraído, foi feito um gel de agarose a 1%, marca sigma, em tampão TBE 1x (0,50g de agarose para 50 ml de TBE (EDTA 2 mM e Tris-borato 90 mM), e pipetado 7 µl por poço (5 µl de DNA e 2 µl de corante do kit) 3µl em um único poço de marcador molecular (λ) (kit) de peso de 1Kb, marca Promega® (Promega, Madison, WI, USA) e por eletroforese, uma corrida de 10 minutos e para a fixação do brometo de etídio (de 0,5 µg ml) após a corrida, em um cuba por 10 minutos.

As reações de PCR (APÊNDICE D), usadas para amplificação da sequência correspondente ao RNA ribossomal (16S rRNA) e para o gene C120, foram feitas usando um termociclador (*AppliedBiosystems*). O PCR 16S rRNA, foi realizado durante 30 ciclos, com desnaturação a 94 °C durante 60 segundos, anelação a 62° C durante 30 segundos, e extensão

a 72°C durante 60 segundos. Para os genes C120, foi realizado durante 45 ciclos, com desnaturação a 94 °C durante 60 segundos, anelamento a 59° C durante 30 segundos, e extensão a 72°C durante 30 segundos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese num gel de agarose a 1,0% corado com 0,5 pg / ml de brometo de etídio.

Os produtos das reações foram analisados a partir de eletroforese, em gel de agarose, na concentração de 1,0% (1x), em tampão TBE, por 40 minutos a 80 mV. Após a corrida, o gel foi depositado em uma cuba contendo a mesma concentração anterior de brometo de etídeo para a fixação do brometo, favorecendo na visualização das bandas marcadas por 10 minutos e em seguida levados ao Fotodocumentador transluminador UV, através do sistema de foto-documentação L-PIX, marca Touch Loccus Biotecnologia - *Molecular Imaging*. Neste Fotodocumentador também foram feitas fotografias para as análises dos géis onde foram comparados os tamanhos moleculares dos produtos de amplificação com padrões de peso molecular com escala do marcador *Ladder1kb* (Promega®), assim como a análise por comparação dos padrões de amplificação entre as amostras.

3.4 AMPLIFICAÇÃO DO PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*)

Cada solução de reação de PCR continha 50 µl sugerida pelo Kit de reação (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Uma descrição detalhada do procedimento para o isolamento de DNA é fornecida na instrução do manual. A reação foi levada a um termociclador (AppliedBiosystem, Foster City, CA, USA). Para o 16s rRNA foi programado para ter a sequência de um primeiro ciclo de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 45 segundos, anelamento a 62°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 51 segundos, e em seguida, 72°C a estabilização de produtos de PCR durante 1 minutos e armazenamento a 4 C. O C120 foi programado para ter a sequência de um primeiro ciclo de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, 45 ciclos de desnaturação a 94 C durante 60 segundos, anelamento a 59°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos, e em seguida, 72°C a estabilização de produtos de PCR durante 1 minutos e armazenamento a 4C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese num gel de agarose a 1,0% com 0,5 pg/ ml de brometo de etídio.

Todos os produtos de PCR foram purificados a partir de um gel de agarose utilizando o kit de purificação de produto de PCR (Promega, Madison, WI, USA). Os produtos de sequenciação do ciclo as reacções foram corridas num termociclador automatizado (Applied Biosystem).

3.5 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S RRNA E DA CATECOL 1,2 DIOXIGENASE (C120)

O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Br.), (APÊNDICE E) utilizando o sequenciador automático AB 3500 GeneticAnalyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (AppliedBiosystems). Os DNA-moldes foram marcados utilizando-se 2,5 pmol do primer (do gene de rRNA 16S seqüências de oligonucleótidos para o iniciador direto (16S 27F) e o iniciador inverso (16S 907R) foram 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' e 5' CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT 3', respectivamente, com amplitude de 880 pb. Para a região do gene C120 de DNA com seqüências de oligonucleótidos para o iniciador direto (C120F) e o iniciador inverso (C120R) foram 5' GCC AAC GTC GAC GTC TGG CA 3' e 5' CGC CTT CAA AGT TGA TCT GCG TGG T 3', respectivamente, com amplitude de 282 pb (APÊNDICE D) e 0,5 µL do reagente BigDyeTerminator v3.1 *CycleSequencingStandart* (AppliedBiosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador LGC XP *Cycler* com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 s, 55 °C por 5 s e 60 °C por 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamidaHi-Fi (AppliedBiosystems), desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection 2 (AppliedBiosystems) com os parâmetros Dye Set "Z"; *Mobility File* "KB_3500_POP7_BDTv3.mob"; *BioLIMSProject* "3500_Project1"; Run Module 1 "FastSeq50_POP7_50cm_cfv_100"; e *Analysis Module* 1 "BC- 3500SR_Seq_FASTA.saz".

3.6 AGRUPAMENTO FILOGENÉTICO DOS GENES 16S RRNA E CLUSTER DO GENE C120

Para fazer o agrupamento das 10 espécies selecionadas foi utilizado uma ferramenta de filogenia, onde foram escolhidos grupos, pois, possuem uma grande importância no estudo, sendo utilizado como um parâmetro de comparação com os outros organismos selecionados por terem seqüências mais próximas dos organismos selecionados. A similaridade entre as

espécies das 10 cepas bacterianas foi inferida pelo método de *neighbor-joining* (SAITOU & NEI, 1987).

Para a definição das espécies que compõem os grupos, procurou-se organismos que pertencesse a mesma classe, sendo selecionados três classes Gammaproteobacteria, Enterobacteria e Flavobacteria, e que também tivesse a sequência parcial do 16S rRNA. A sequência encontrada no NCBI, foram das espécies *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas monteilli*, *Pseudomonas flavescens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Proteus penneri* e *wautersiella*. A sequência do 16S rRNA foi salva no formato FASTA e posteriormente foram combinados com 17 outros organismos que tivesse uma similaridade comum no site europeu “SILVA”, que é um repositório especializado. A árvore de consenso de *bootstrap* inferida a partir de 100 repetições foi tomada para representar similaridade entre os 10 isolados selecionados com espécies próximas tendo a probabilidade de serem da mesma espécie. Ramos correspondentes às partições reproduzida em menos de 50% réplicas de *bootstrap* foram recolhidos. As similaridades entre as espécies já conhecidas com as espécies estudadas, foram calculados usando o método de Kimura dois parâmetros disponíveis no programa MEGA4 (TAMURA, et. al., 2007), também usado para a confecção do *cluster* comparando a similaridade entre as sequências da enzima catecol (C120) das 10 cepas isoladas.

3.7 BIOCINÉTICA DE CRESCIMENTO EM BTX

Foram selecionadas para o teste de cinética de crescimento em BTXs separados, seis cepas dos isolados (LEPETRO-128A, LEPETRO-128B, LEPETRO-67C, LEPETRO-155C, LEPETRO-155I e LEPETRO-05A) através das análises de PCR utilizando *primers* específicos no Núcleo de Estudos Ambientais (NEA), localizado na Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia (TABELA em APÊNDICE).

Para crescimento das amostras, utilizou-se placas de Petri Agar com MH, marca Difco, sendo estriadas para crescimento de biomassa a 30°C em estufa tipo BOD durante 24 horas. No dia seguinte foi feito o *overnight* dessas amostras, onde em erlenmeyer de 250 ml foram adicionados 150 ml de meio mineral BH, colocado um *loop* (circunferência completa da alça de platina), e acrescentado uma gota (T10 µl) separadamente de Tolueno (0,87 g/ml) benzeno (0,87 g/ml), e xileno (0,86g/ml) ao erlenmeyer e fechado rapidamente. Em outros erlenmeyers foram colocados também a mesma concentração de meio BH e fechados com rolhas antiácidas sendo inserido na parte inferior de cada rolha um balão de 10 centímetros de

altura, 0,5 cm de diâmetro e de abertura do balão de 5mm, onde por sua vez, foi colocado 2 ml de cada um dos compostos separadamente para a formação de gás formado pelos BTXs , fechados e levados ao orbital *shaker* sob agitação de 120-125 rpm entre 12 – 16 horas para seu crescimento tendo como fonte de carbono somente os BTXs (FIGURA 4).

Figura 4 – Overnight das amostras em *shaker* e dos frascos para formação do gás BTX



FOTO: a autora (2015)

3.7.1 Análise da cinética de crescimento em BTX

Após o *overnight*, foi retirada uma alíquota correspondente a 10 % (1,5 ml) do volume total do inoculo deixado em erlenmeyer contendo um volume de 150 ml de meio mineral mínimo líquido (BH) e transferido em triplicata (R1, R2 e R3) para os erlenmeyer que ficaram em agitação por 24 horas para cada amostra bacteriana. Na primeira amostragem no tempo (T0) em triplicata, foi transferido 1000 µl (inóculo+ meio mineral + BTX separadamente) para microtubos, agitados e analisados em espectrofotômetro, com comprimento de 550 nm, e 100 µl, também em triplicata, foram diluídos em microtubos (1,5 ml) realizando assim a diluição seriada das amostras e plaqueados em triplicata 10 µl em meio MH por 12 horas, 30°C, para posterior contagem das colônias (FIGURA 5). Foram feitas nove amostragens em diferentes tempos (T0, T2, T4, T5, T6, T7, T8, T10, T12), completando assim doze horas de análises em diferentes diluições, onde nos tempos T0, T2, T4, a diluição foi 10^{-3} , nos tempos T5, T6, T7, T8 a diluição foi 10^{-4} e nos tempos T10 e T12, a diluição foi 10^{-2} .

Figura 5 – Plaqueamento das amostras em microgotas (10 µl) em meio Muller Hilton para contagem da UFC (Unidade Formadora de Colônia)



Foto: a autora (2015)

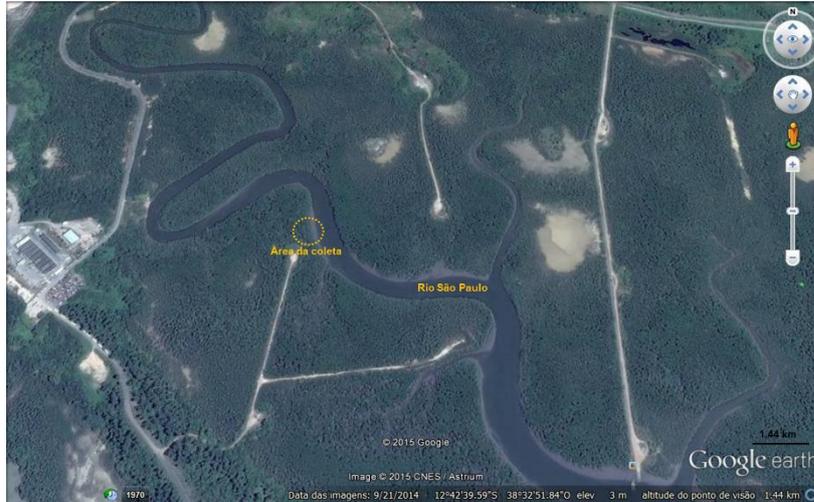
Após 24 horas, as placas foram contadas com ajuda de um contador de colônias eletrônico e as três gotas da mesma diluição foram somadas e tiradas a média das mesmas. Para descrever a taxa de consumo de substrato pelas cepas que foram crescidas em um sistema descontínuo correlacionando crescimento celular ao substrato consumido, foi utilizado o Microsoft Excel para confecção dos gráficos para Unidade Formadora de Colônia (UFC) e Densidade Ótica (D.O.) através do coeficiente linear ou μ específico (APÊNDICE F).

3.8 DEGRADAÇÃO DE BTX NO SEDIMENTO DE MANGUEZAL EM MICROCOSMO

3.8.1 Coleta do sedimento de manguezal

Para o desenvolvimento final do trabalho, foi realizada uma única coleta de sedimento de manguezal, determinada mediante um GPS digital (Garmin Trex Waterproof Hiking GPS – Sistema de Posicionamento Global), onde foram coletadas as amostras de sedimento de manguezal localizada nas cercanias do rio São Paulo, o qual desagua na Baía de Todos os Santos (BTS), Bahia, município de São Francisco do Conde, próximo a estação de produção Pedra Branca da PETROBRAS, nas coordenadas $12^{\circ} 44' 26,0''$ (S) e $38^{\circ} 31' 53,9''$ (W) (FIGURA 6).

Figura 6 – Fotografia aérea de trechos do rio São Paulo (próximo a sua foz) localizado no município de São Francisco do Conde (Ba) e da área de coleta, 2015



Fonte: Foto de satélite pelo googleearth (2015).

Os sedimentos para montagem da cinética de crescimento em sedimento, foram coletados em deposição lamosa, na parte do manguezal mais próxima às zonas marginais, em locais geralmente inundáveis, com o auxílio de um testemunhador de um tubo de aço inoxidável de 10 cm de diâmetro e capacidade para coletar testemunhos de até 30 cm. Para a execução dos procedimentos do microcosmo foram coletados cerca de 3 kg de sedimento, em recipientes de alumínio descartável para cada experimento e acondicionadas em caixa de isopor mantido a 4°C até a chegada ao laboratório. Para o teste de degradação de BTX no sedimento de manguezal em microcosmo, foram selecionadas as mesmas seis cepas bacterianas, utilizada no teste anterior de cinética de crescimento (LEPETRO-128A, LEPETRO-128B, LEPETRO-67C, LEPETRO-155C, LEPETRO-155I e LEPETRO-05A) em ensaios com amostra ambiental no Núcleo de Estudos Ambientais (NEA), localizado na Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.

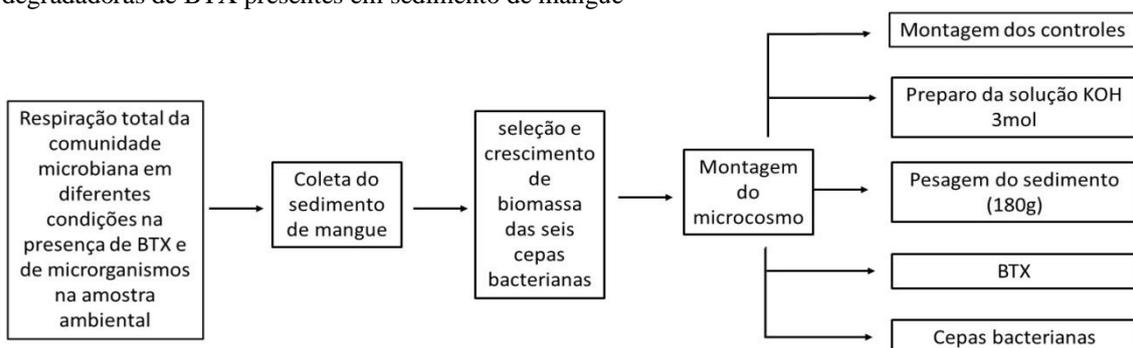
3.8.2 Crescimento de biomassa das cepas bacterianas

Para o crescimento das cepas, foi utilizado em placa de Petri Agar Mueller Hinton (MH), onde foram estriadas para crescimento de biomassa a 30°C em estufa incubadora tipo BOD (demanda bioquímica de Oxigênio) durante 24 horas. Ocorrida as 24 horas, foi feito o *overnight* dessas amostras em erlenmeyer de capacidade de 125 ml, onde foram acrescentados 50 ml de meio líquido Mueller Hinton (MH), previamente autoclavado e depositado um *loop* (circunferência completa da alça) de cepa, com o auxílio de uma alça de platina (Alça de transferência) e em seguidas fechados com chumaço de algodão e levados ao orbital shaker sob agitação de 120-125 rpm por 12 horas para o crescimento de biomassa.

3.8.3 Montagem do microcosmo

Para o teste de respiração total da comunidade microbiana em diferentes concentrações de BTX, junto com as cepas bacterianas em amostra ambiental, foram coletados sedimento de manguezal, seguida do crescimento de biomassa das seis cepas bacterianas e injetadas no microcosmo. Foi pesado 180g de sedimento para cada frasco contendo os compostos BTX separadamente e para captura do CO₂ em um frasco menor foi preparado uma solução a 3mol de KOH e fechados (FIGURA 7).

Figura 7 – Esquema de todas as etapas executadas durante todo o experimento de respiração em microcosmo, a seleção, isolamento, crescimento de biomassa, montagem do microcosmo e o teste in loco das bactérias degradadoras de BTX presentes em sedimento de mangue



Elaboração: a autora (2015)

Para determinar a umidade do sedimento vindo do campo, em laboratório foi realizada o procedimento para a determinação do teor de umidade em sedimento de manguezal úmido ou secou utilizando o método descrito no Manual de métodos de análise de solo da EMBRAPA (1997), onde em uma balança analítica eletrônica foi pesado um pêssego filtro com tampa seco e limpo, em seguida tarado e identificado e cuidadosamente é transferido 0,5000g de amostra,

pesado novamente, tampado e levado a um dessecador por 24h deixando a tampa do pesa filtro entre aberta para facilitar o processo. Após as 24 horas pesar novamente com a tampa um pesa filtro e anotar os valores para os cálculos de umidade (APÊNDICE G).

No mesmo dia da coleta, foram pesadas as amostras de sedimento de manguezal com o auxílio de uma balança analítica digital, sendo pesados 180 gramas em erlenmeyer de 250 ml e sendo devidamente depositados no fundo do frasco com o auxílio de uma espátula durante a pesagem e consecutivamente fechadas para manter a mesma umidade que veio do campo. Foi feita uma solução de hidróxido de potássio (KOH) com massa de 16,8 gramas para 100 ml de solução, correspondente a 3 mol/L)(ANEXO 8) e em frascos Injetável tipo penicilina de Vidro (10ml) foram transferidos 7 ml da solução de KOH e adicionados um chumaço de algodão e depositado no fundo dos erlenmeyer já com o solo pesado, em seguida, a solução de KOH foi deixada por aproximadamente 30 minutos ainda com o erlenmeyer abertos, para que ocorresse a reação da solução, já que sua função dentro do microcosmo é a captura de moléculas de CO₂ durante o processo de respiração das cepas bacteriana.

Foi adicionado a cada microcosmo, em duplicata, 1000 µl das cepas bacterianas centrifugadas a 14.000 rpm em 3 tubos de falcon (15 ml), para formação do *pelet* (precipitado), transferido para outro falcon com 15 ml de meio BH e agitado pelo meio de um vortex, onde foi retirado 1ml da suspensão e injetado no sistema, sendo o mesmo homogeneizado e acrescentado do volume de 1 ml de Benzeno, tolueno e xileno separadamente em cada análise e homogeneizados novamente para que tenha o mesmo aspecto e concentração em todo seu interior.

Após os 30 minutos da reação de hidróxido de potássio, foram adicionados as cepas e os BTX separadamente, sendo os microcosmos fechados com rolhas antiácidas sendo inserido no centro da rolha perfurando – a ao meio uma pipeta de Pipeta Pasteur ponta curta (comp. 150mm volume de 1,5ml) e fixada a pipeta uma das extremidades da mangueira de silicone autoclavável (Diâmetro externo 8 mm x diâmetro interno 4 mm x espessura da parede 2 mm) e na outra ponta, totalizando um metro de comprimento, uma pipeta graduada de 5 ml, onde o sistema foi preenchido com água e corada com anilina comestível para facilitar a visualização do líquido durante o tempo de experimento (FIGURA 8).

Figura 8 – Montagem do microcosmo com sedimento de manguezal em erlenmeyer formando um sistema fechado com uma pipeta como respirômetro. A) Montagem do respirômetro, onde as extremidades ligam a rolha e a pipeta respectivamente, formando um “U” B) INSTALAÇÃO E FIXAÇÃO DO RESPIROMETRO, contendo as cepas, os compostos BTX e um frasco com KOH no sedimento de mangue



Foto: a autora (2015)

Uma das extremidades da mangueira que ficou acoplada a rolha antiácida foi fixada ao gargalo do erlenmeyer e com 15 centímetros depois foi feita uma curva até a parte inferior (fixada com fita adesiva) e subindo novamente para formação de um “U”. Ao chegar a extremidade que se encontra a pipeta, foi também fixada na parede por uma fita adesiva. Ao terminar esse processo, já com as amostras preparadas, foram tampadas e vedadas totalmente com cola de silicone quente, para evitar que houvesse vazamento dos gases, podendo a vir a comprometer os resultados(FIGURA 9).

Figura 9 – Fixação e montagem do respirômetro experimental para medição da atividade microbiana pelo processo de respiração em amostra ambiental



FOTO: a autora (2015)

Após a montagem do microcosmo, como mostra a figura anterior, foi totalmente vedado, todos os erlenmeyer sendo revestidos com papel alumínio para evitar que a luz direta ou indireta favorecesse o crescimento de microalgas, que por sua vez, poderia utilizar o

oxigênio no processo de respiração, retirando-o do microambiente criado e marcado nas pipetas onde começou o processo de respiração.

Para cada ensaio, foram feitos três tipos de controle com a mesma metodologia utilizada para as amostras, deixando todas padronizadas. O controle 1 (controle positivo), continha sedimento de mangue natural, controle 2; sedimento de mangue natural + 1ml de Tolueno (0,87 g/ml) benzeno (0,87 g/ml), e xileno (0,86 g/ml) separadamente e o controle 3 (controle negativo), sedimento de mangue natural autoclavado por 45 minutos e vedado (FIGURA 10).

Figura 10– Modelo dos três controles, controle (sedimento de manguezal natural sem BTX), controle 2 (sedimento de manguezal natural + de Benzeno, Tolueno e xileno respectivamente) e controle 3 (sedimento de mangue natural autoclavado), utilizados durante o experimento com amostra ambiental e os BTX separadamente



FOTO: a autora (2015)

3.8.4 Avaliações do teste de oxidação dos isolados em amostra ambiental

As avaliações foram feitas 12 horas, 24 horas e 48 horas, medindo o quanto de oxigênio foi consumido através do volume decrescido do líquido na pipeta, os as suas duplicatas foram somadas e tiradas a média com 12 horas, 24 horas e 48 horas totalizando o quanto de oxigênio foi consumido mas três amostragens chegando a um total de oxigênio respirado em ml. Os dados gerados foram transferidos para Microsoft Excel, onde foram feitas a linha de tendência exibindo assim a equação no gráfico, chegando ao valor do coeficiente específico nas análises, ou seja, o coeficiente linear de cada uma das amostras, mostrando estatisticamente o quanto de oxigênio foi consumido por hora.

O artigo citado está apresentado a seguir.

4 BACTÉRIAS ENDÓGENAS DEGRADADORAS DE BTX NA REMEDIAÇÃO DO SEDIMENTO CONTAMINADO DE MANGUEZAL

RESUMO

Hidrocarbonetos monocromáticos como benzeno, tolueno e xileno (BTX) são contaminantes ambientais de alta toxicidade para a comunidade microbiana. O objetivo desse trabalho foi isolar, identificar, caracterizar cineticamente e testar *in loco* bactérias degradadoras de BTX presentes em sedimento de manguezal da BTS. Foram isoladas através de plaqueamento 12 amostras tendo o petróleo como única fonte de carbono. Os resultados obtidos apontam que as sequências encontradas na filogenia do 16s rRNA gerada indicaram que, as cepas LEPETRO-128A, LEPETRO-67C, LEPETRO-5A, LEPETRO-128B, LEPETRO-155I, LEPETRO-155E, foram agrupadas a classe Gamaproteobacteria, com uma probabilidade de 61% de serem da mesma espécie *Pseudomonamonteilli*, 85% com a *Pseudomonasputida* e 62% com a *Pseudomonas fulva*. Já as sequências das cepas LEPETRO-102A, LEPETRO-67F e LEPETRO-155A, foram agrupadas a classe das Enterobacteria, com probabilidade de 93-99% de pertencerem a mesma espécie *Acinetobactercalcoaceticus* e com 100% de probabilidade de serem da mesma espécie da *Proteuspenneri*. A cepa LEPETRO-155E foi agrupada a classe das Flavobacteria com 100% de probabilidade de serem a mesma espécie da *Wautersiella*. Um cluster foi construído para comparar as relações homologas dentre as cepas, onde 9 foram homologas a enzima C120, partilhado da mesma característica, sendo que seis (LEPETRO-128B, LEPETRO-67C, LEPETRO-155C, LEPETRO-155I, LEPETRO-155E, LEPETRO-05A), são homologas. Já a cepa LEPETRO-128A e LEPETRO-155A possuem uma similaridade, porém, são distintas das LEPETRO-128B, LEPETRO-67C, LEPETRO-155C, LEPETRO-155I, LEPETRO-155E, LEPETRO-05A, e da cepa LEPETRO-67F possui uma dissimilaridade entre as todas as cepas isoladas. Os testes de cinética de crescimento apontam que o isolado LEPETRO-155 C, tendo os compostos benzeno, tolueno e xileno (BTXs), obteve uma melhor resposta em teste laboratorial como única fonte de carbono, para o processo de bioaumentação *in situ*, podendo degradar estes contaminantes em relação aos outros isolados testados em bancada. Em microcosmo no consumo de O₂ em microcosmo a cepa LEPETRO-155C teve maior coeficiente de consumo de oxigênio, para Xileno (2,22 ml O₂ h⁻¹g_{sedimento}⁻¹), tolueno de 1,46 ml O₂ h⁻¹g_{sedimento}⁻¹, já em benzeno de 1,33 ml O₂ h⁻¹g_{sedimento}⁻¹, um menor coeficiente no consumo de oxigênio em relação a cepa LEPETRO-05A, que teve um consumo de oxigênio de 1,56 ml O₂ h⁻¹g_{sedimento}⁻¹.

Palavras-Chave: bactérias, hidrocarbonetos, sedimento, manguezal, biorremediação

4.1 INTRODUÇÃO

Hidrocarbonetos monoaromáticos como benzeno, tolueno e xileno (BTX) são contaminantes ambientais de alta toxicidade para a comunidade microbiana (ANNESER et al., 2008; JO et al., 2008). Os BTX são largamente utilizados como substâncias químicas em vários processos industriais (HUTCHINS et al., 1991, LIN et al., 2010), e também estão presentes em quantidades elevadas nos combustíveis fósseis (ASTDR, 2004).

A alta mobilidade dos BTX, onde o seu coeficiente de partição octanol-água é de duas a quatro vezes menor do que para hidrocarbonetos alifáticos resulta em uma adsorção mais lenta no solo. Nesse caso, quando não são utilizados pelos microrganismos, esses compostos são facilmente transportados pela água contaminando reservatórios e o lençol freático (NAKHLA, 2003). No entanto, com o tempo, podem se adsorver aos constituintes do solo e tornarem-se não biodisponíveis. (Watts et al., 2000). É importante ressaltar que as substâncias não biodisponíveis podem ser de difícil biorremediação por processos naturais, pois, as mesmas ficam protegidas dos ataques microbiológicos (WATTS et al., 2000).

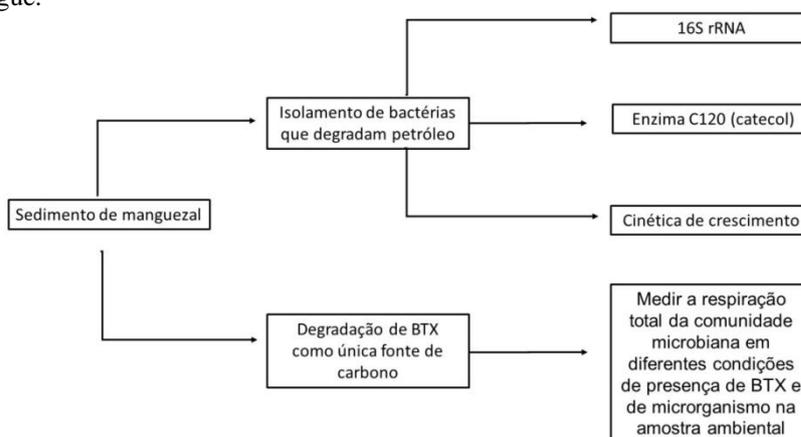
O tempo médio de vida dos BTX na água, sedimento e/ou solo está entre 21 e 30 dias e sua concentração no final de 30 dias é, geralmente, de $0.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (PHELPS; YOUNG, 1999; ZABIEGAŁA et al., 2010). O período de vida média está diretamente associado a processos limitantes associados a biodisponibilidade e densidade de bactérias degradadoras *in situ* o que permite a aplicação dos mesmos em uma técnica chamada de bioaumentação (RIDGWAY et al., 1990; LEE et al., 1994; OTENIO et al., 2005; SHIM et al., 2005; LIN et al., 2010). Nessa técnica, esses fatores limitantes são alterados através da reinserção de microrganismos degradadores desses compostos contaminantes diminuindo assim a vida média dos monoaromáticos (DYBAS et al., 2002; MAJOR et al., 2002; VAN VEEN et al., 1997). Um exemplo é a caracterização dessas enzimas através de marcadores moleculares como o C120, catecol 1,2 dioxigenase, primeira enzima relacionada com a clivagem do anel aromático do BTX. Esse trabalho teve como objetivo isolar, identificar, caracterizar cineticamente e testar com amostras ambientais bactérias degradadoras de BTX isoladas de manguezal.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de sedimento de manguezal foram coletadas por Fioravanti, 2013 e cepas bacterianas isoladas através de plaqueamento. O petróleo foi utilizado como única fonte de carbono no processo de isolamento e seleção das bactérias. Após a confirmação da pureza das colônias bacterianas

obtidas, estas foram utilizadas nos experimentos de microcosmo com o sedimento do manguezal contaminado por BTX. Para a caracterização das cepas foi realizado testes de coloração, filogenia do 16S rRNA e da enzima catecol 1,2-dioxygenase e cinética de crescimento em meio sintético contendo BTX isoladamente. Para o monitoramento do experimento com o microcosmo foi utilizado a técnica de medição de respiração total da comunidade microbiana em diferentes condições de presença de BTX e de microrganismo. Mostrado em fluxograma de trabalho adotado nessa pesquisa, FIGURA11.

Figura 11 – Desenho amostral de todas as etapas executadas durante todo o trabalho, o isolamento, identificação, caracterização cineticamente e teste in loco das bactérias degradadoras de BTX presentes em sedimento de mangue.



Elaboração: a autora (2015)

4.2.1 Isolamento dos microrganismos e Método de Gram

Para as análises moleculares, foram selecionados 12 isolados microbianos a partir dos ensaios de degradação em pesquisa anterior (Fioravanti, 2013). Os mesmos foram crescidos em Agar MH por 48h a 27°C. Na seleção das amostras foram utilizados Agar BH com adição de 1% de petróleo e incubadas a 27°C por 4 dias. Dez cepas bacterianas foram selecionadas a partir da diluição seriada com solução salina a 9% com 1% de Tween (80%) em microtubos de 1,5ml diluído 4 vezes e feito o teste de coloração de Gram.

O DNA das amostras foram extraídos utilizando o Kit de extração (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Uma descrição detalhada do procedimento para o isolamento de DNA é fornecida na instrução do manual. Para a quantificação do DNA extraído, foi feito um gel de agarose a 1%, em tampão TBE 1x. O mix foi pipetado com um volume de 7 µl, 3µl marcador molecular (λ) de peso de 1Kb, com uma corrida de 10 minutos, seguida de 10 min. em brometo de etídio.

4.2.2 Análises moleculares

O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, BR) utilizando o sequenciador automático AB 3500 GeneticAnalyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (AppliedBiosystems). Os DNA-moldes foram marcados utilizando-se 2,5 pmol do primer (do gene de rRNA 16S sequências de oligonucleótidos para o iniciador direto (16S 27F) e o iniciador inverso (16S 907R) foram 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' e 5' CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT 3', respectivamente, com amplitude de 880 pb. Para a região do gene C120 de DNA com sequências de oligonucleótidos para o iniciador direto (C120F) e o iniciador inverso (C120R) foram 5' GCC AAC GTC GAC GTC TGG CA 3' e 5' CGC CTT CAA AGT TGA TCT GCG TGG T 3', respectivamente, com amplitude de 282 pb) e 0,5 µL do reagente BigDyeTerminator v3.1 CycleSequencingStandart (AppliedBiosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 s, 55 °C por 5 s e 60 °C por 4 min. As amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60% e o produto diluído. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamidaHi-Fi (AppliedBiosystems), desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection 2 (AppliedBiosystems) com os parâmetros Dye Set "Z"; Mobility File "KB_3500_POP7_BDTv3.mob"; BioLIMS Project "3500_Project1"; Run Module 1 "FastSeq50_POP7_50cm_cfv_100"; e Analysis Module 1 "BC- 3500SR_Seq_FASTA.saz".

4.2.3 Amplificação de PCR -Reação em cadeia da polimerase

Cada solução de reação de PCR continha 50 µl sugerida pelo Kit de reação(Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Uma descrição detalhada do procedimento para o isolamento de DNA é fornecida na instrução do manual. A reação foi levada a um termociclador (AppliedBiosystem, Foster City, CA, USA). Para o 16s rRNA foi programado para ter a sequência de um primeiro ciclode desnaturação a 94°C durante 1 minuto, 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 45 segundos, anelamento a 62°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 51 segundos, e em seguida, 72°C a estabilização de

produtos de PCR durante 1 minutos e armazenamento a 4 C.O C120 foi programado para ter a sequência de um primeiro ciclode desnaturação a 94°C durante 1 minuto,45 ciclos de desnaturação a 94 C durante 60segundos, anelamento a 59°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos, e em seguida, 72°C a estabilização de produtos de PCR durante 1 minutos e armazenamento a 4C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese num gel de agarose a 1,0% com 0,5 pg/ ml de brometo de etídio.

4.2.4 Sequência de nucleotídeos

Todos os produtos de PCR foram purificados a partir de um gel de agaroseutilizando o kit de purificação de produto de PCR (Promega, Madison, WI, USA). Os produtos de sequenciação do ciclo as reacções foram corridas num termociclador automatizado (Applied Biosystem).

4.2.5 Gene 16 s rRNA e gene C120

Para fazer o agrupamento das 10 espécies selecionadas foi utilizado uma ferramenta de filogenia, onde foram escolhidos grupos, pois, possuem uma grande importância no estudo, sendo utilizado como um parâmetro de comparação com os outros organismos selecionados por terem sequências mais próximas dos organismos selecionados. Para a definição das espécies que compõem os grupos, procurou-se organismos que pertencesse a mesma classe, sendo selecionados três classes Gammaproteobacteria, Enterobacteria e Flavobacteria, e que também tivesse a sequência parcial do 16S rRNA. A sequência encontrada no NCBI, foram das espécies *Pseudomonasputida*, *Pseudomonasmonteilli*, *Pseudomonas flavencens*, *Acinetobactercalcoaceticus*, *Proteuspenneri* e *wautersiella*. A sequência do 16S rRNA foi salva no formato FASTA e posteriormente foram combinados com 17 outros organismos que tivesse uma similaridade comum no site europeu “SILVA”, que é um repositório especializado. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de100 repetições foi tomada para representar similaridade entre os 10 isolados selecionados com espécies próximas tendo a probabilidade de serem da mesma espécie. Ramos correspondentes às partições reproduzida em menos de 50% réplicas de bootstrap foram recolhidos. As similaridades entre as espécies já conhecidas com as espécies estudadas, foram calculados usando o método de Kimura dois parâmetros disponíveis no programa MEGA4 (TAMURA, et. al., 2007), também usado para a

confeção do cluster comparando a similaridade entre as sequências da enzima catecol (C120) das 10 cepas isoladas.

4.2.6 Biocinética de Crescimento em BTX

Para o teste de cinética de crescimento em BTXs, foram usados seis cepas dos isolados (LEPETRO-128A, LEPETRO-128B, LEPETRO-67C, LEPETRO-155C, LEPETRO-155I e LEPETRO 05A) através das análises de PCR. Foram feitas estriagem em placa em Agar com MHa 30°C por 24 horas e por seguinte foi feito o *overnight* dessas amostras, em erlenmeyer de 250 ml foram adicionados 150 ml de meio mineral BH, adicionando um *loop* das cepas, acrescido de 10 µl separadamente de Tolueno, benzeno e xileno e em seguida tampados. Em outros erlenmeyer de 250ml, foram colocados também a mesma concentração de meio BH e fechados com rolhas antiácidas sendo inserido na parte inferior um balão, colocando 2 ml de cada um dos compostos separadamente para a formação de gás formado pelos BTXs, fechados e levados ao orbital shaker com 125 rpm de 12 a 16 horas para seu crescimento tendo como fonte de carbono somente os BTXs. Após as 16 horas, foi retirada uma alíquota de 10% (1,5 ml) do volume total e colocado nos erlenmeyer que ficaram em agitação *overnight* tendo três triplicatas para cada exemplar (R1, R2 e R3). Na primeira amostragem, no tempo (T0) foi transferido 1000 µl para ser analisado em espectrofotômetro a Densidade Óptica (DO), As concentrações de biomassa foram determinados por espectrofotometria de UV (Agilent Cary 60 Agilent Technologies) a 550 nm medindo-se a absorbância das soluções de microrganismos e correlacionada com a concentração de biomassa e 10 µl para fazer diluição seriada das amostras, para contagem da Unidade Formadora de Colônia (UFC). Foram feitas nove amostragens em diferentes tempos (T0, T2, T4, T5, T6, T7, T8, T10, T12), tendo doze horas de análises em diferentes diluições, onde nos tempos T0, T2, T4, a diluição foi 10^{-3} , com um intervalo de 2h, nos tempos T5, T6, T7, T8 a diluição foi 10^{-4} , com um intervalo de 1h e nos tempos T10 e T12, a diluição foi 10^{-2} , com intervalo de 2 horas, sendo plaqueados 10 µl em triplicatas. Após 24 horas, as placas foram contadas com um contador de colônias eletrônico e as três gotas da mesma diluição foram somadas e feita a média. A taxa de consumo de substrato pelas cepas, foi calculada, UFC x DO através do Microsoft Excel, gerando os coeficientes lineares ou μ específico para cada amostra e BTX.

4.2.7 Biodegradação de BTX em sedimento de mangue em microcosmo

O sedimento de manguezal foi coletado em deposição lamosa, na parte do manguezal mais próxima às zonas marginais, em locais geralmente inundáveis. As amostras foram coletadas por um testemunhador (QUEIROZ; OLIVEIRA, 2012), localizada próximo do Rio São Paulo, o qual desagua na Baía de Todos os Santos (BTS), Bahia, localizado com um GPS com as coordenadas 12° 44' 26,0" (S) e 38° 31' 53,9" (W).

Para montagem do microcosmo foram coletados 3 kg de sedimento, em recipientes limpos e acondicionadas até a chegada ao laboratório. As mesmas 6 cepas bacterianas (LEPETRO 128A, LEPETRO 128B, LEPETRO 67C, LEPETRO 155C, LEPETRO 155I e LEPETRO 05A) através das análises de cinética de crescimento em compostos hidrocarbonetos monoaromáticos: benzeno, tolueno e xileno (BTX) em ensaios de bancada.

As cepas foram estriadas para biomassa em MHe incubadas em BOD a 30°C por 24 horas, seguida do *overnight* dessas amostras em erlenmeyer de capacidade de 125 ml com 50 ml de meio MH e um *loop* de cepa, tampados e levados ao orbital shaker a 125 rpm por 12 horas.

Em laboratório foram pesadas 180g do sedimento de mangue e depositados em erlenmeyer de 250 ml. Foi feita uma solução de hidróxido de potássio (KOH) de 100ml, correspondente a 3 mol/L e em frascos Injetável de Vidro foram transferidos 7 ml da solução de KOH com um chumaço de algodão e depositado no fundo dos erlenmeyer já com o solo pesado. Já com a solução de KOH, os frascos foram deixados abertos por 30 minutos para que ocorresse a reação da solução, já que sua função dentro do microcosmo é a captura de moléculas de CO₂ durante o processo de respiração das cepas bacteriana.

Foi adicionado a cada microcosmo, em duplicata, 1000 µl das cepas bacterianas centrifugadas em tubos de falcon, para formação do *pelet*, sendo depois transferido para outro falcon com 15 ml de meio BH, agitado em vortex, onde foi retirado 1ml da suspensão, injetado no sistema e acrescentado do volume de 1 ml de Benzeno, tolueno e xileno separadamente em cada análise e homogeneizados novamente para que tenha o mesmo aspecto e concentração em todo seu interior.

Após os 30 minutos da reação do HOK, os microcosmos foram fechados com rolhas antiácidas sendo inserido no centro da rolha uma pipeta de Pipeta Pasteur e fixada a pipeta uma das extremidades da mangueira de silicone e na outra ponta, totalizando um metro de comprimento, uma pipeta graduada de 5 ml com líquido funcionando como um respirômetro.

A extremidade da rolha foi acoplada do gargalo do frasco e formando um “U” de 15 cm, a outra extremidade foi fixado na horizontal. Ao terminar esse processo, foram tampadas e vedadas totalmente com cola quente, evitando o vazamento do sistema. Todos os erlenmeyer sendo revestidos com papel alumínio para evitar que a luz direta ou indireta favorecesse o crescimento de microalgas, que por sua vez, poderia utilizar o oxigênio no processo de respiração, retirando-o do microambiente criado e feito a medição inicial no respirômetro.

Para cada ensaio, foram feitos três tipos de controle com a mesma metodologia utilizada para as amostras. O controle 1 (controle positivo), continha sedimento de mangue natural, controle 2; sedimento de mangue natural com 1ml de Benzeno, Tolueno e xileno separadamente e o controle 3 (controle negativo), sedimento de mangue natural autoclavado por 45 minutos.

As avaliações foram feitas após 12 horas, 24 horas e 48 horas, medindo a taxa de oxigênio consumido através do volume decrescido do líquido na pipeta e com o auxílio do Excel foi feita a linha de tendência exibindo assim a equação no gráfico, chegando ao valor do coeficiente específico nas análises.

4.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

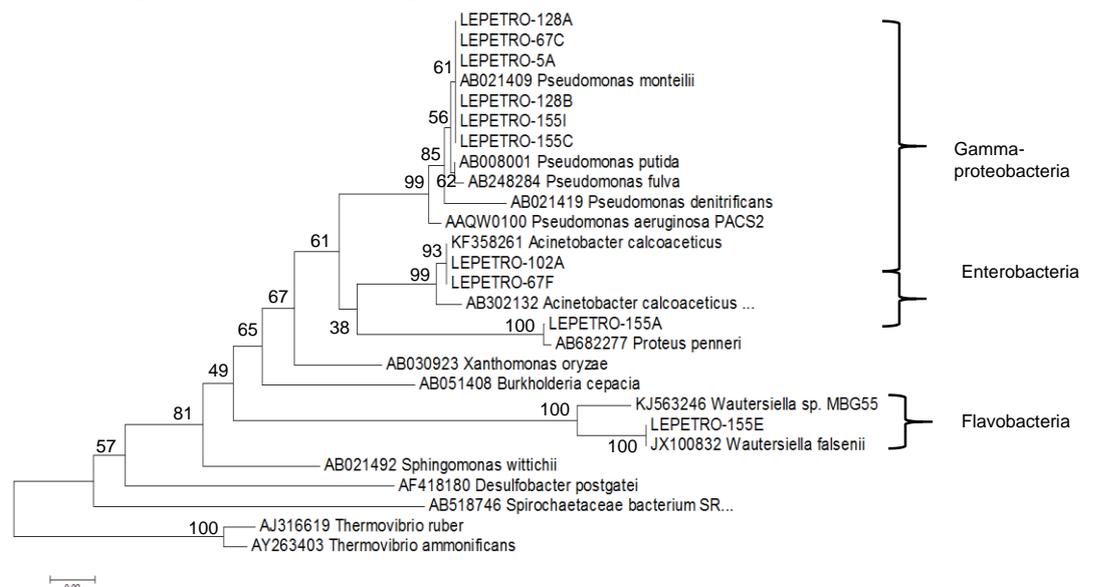
O petróleo foi utilizado como única fonte de carbono no processo de isolamento e seleção das bactérias. Como um resultado presuntivo, teste de colocação de Gram detectou que as 10 amostras eram Gram negativa para o procedimento de extração de DNA segundo o protocolo do fabricante.

O Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e da enzima Catecol 1,2 dioxigenase (C120), foram realizadas por ACTGENE Análises Moleculares (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS).

As sequências encontradas das 10 cepas bacterianas no NCBI foram das espécies *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas monteilli*, *Pseudomonas flavencens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Proteus penneri* e *wautersiella*. A sequência do 16S rRNA foi salva no formato FASTA e posteriormente adicionada junto com os outros 17 organismos que foram combinadas as 6 cepas selecionadas no site europeu “SILVA”, que é um repositório especializado. Sendo as sequências do 16S rRNA e do catecol 1,2 l dioxigenase das das cepas foram depositadas no NCBI.

Pelo site SILVA foi possível agrupar as espécies em 3 grupos similares as sequencias das dez espécies estudadas, mostrando que as cepas bacterianas se agruparam em 3 grupos diferentes, pertencentes aos membros da classe Pelo site SILVA, foi possível agrupar as espécies em 3 grupos similares as sequencias das dez espécies estudadas, mostrando que as cepas bacterianas se agruparam em 3 grupos diferentes, pertencentes aos membros da classe, Gammaproteobacteria, Enterobacteria e Flavobacteria, com o método de neighbor- A árvore de consenso de *bootstrap* inferida a partir de 100 repetições, mostrou a similaridade entre os 10 isolados com espécies próximas, com base na sequência parcial do gene 16S rRNA indicaram que, as cepas LEPETRO-128A, LEPETRO-67C, LEPETRO-5A, LEPETRO-128B, LEPETRO-155I, LEPETRO-155E, foram agrupadas a classe Gamaproteobacteria, onde das 100 repetições de *bootstrap* produzidas, 61% foram para a espécie *Pseudomonamonteilli*, 85% com a *Pseudomonas putida* e 62% com a *Pseudomonas fulva*. Já as sequências das cepas LEPETRO-102A, LEPETRO-67F e LEPETRO-155A, foram agrupadas a classe das Enterobacteria, com 93-99% das repetições pertencentes a espécie *Acinetobactercalcoaceticus* e com 100% das repetições indicaram para a espécie da *Proteuspenneri*. A cepa LEPETRO-155E foi agrupada a classe das Flavobacteria com 100% para a espécie da *Wautersiella* (FIGURA 12).

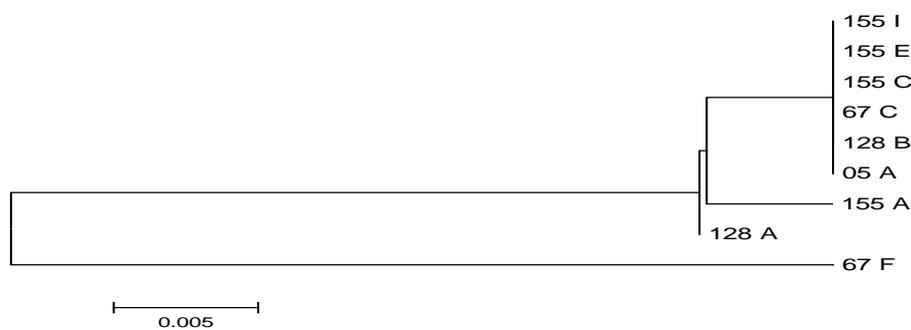
Figura 12– Árvore filogenética mostrando semelhanças entre a OTUs avaliados (cerca de 880 pb) e algumas sequências de tipo de categoria (números de adesão) baixado a partir do site "Silva". A árvore foi construída utilizando MEGA V.4 e algoritmo Kimura dos dois parâmetros (mostrando os valores)



Elaboração: a autora (2015)

Um cluster foi construído para comparar as relações homologas dentre as cepas, onde das 10 cepas bacterianas isoladas, 9 foram homologas a enzima da catecol 1,2 dioxigenase, partilhando da mesma característica. Esse cluster mostra que entre as dez cepas isoladas, seis (LEPETRO-128B, LEPETRO-67C, LEPETRO-155C, LEPETRO-155I, LEPETRO-155E, LEPETRO-05A), são homologas, ou seja, são as mesmas bactérias que codificam para a enzima catecol 1,2 dioxigenase. Já a cepa LEPETRO-128A e LEPETRO-155A possuem uma similaridade, porém, são distintas das LEPETRO-128B, LEPETRO-67C, LEPETRO-155C, LEPETRO-155I, LEPETRO-155E, LEPETRO-05A, e da cepa LEPETRO-67F possui uma dissimilaridade entre as todas as cepas isoladas (FIGURA 13).

Figura 13 –Clustercomparando a similaridade entre as sequências da catecol (C120) das 10 cepas isoladas



Elaboração: a autora (2015)

Foram isolados 6 cepas bacterianas com a capacidade de crescer em BTX como única fonte de carbono. Essas cepas foram cultivadas em meio mínimo mineral (BH) sendo o que o composto aromático foi suprido por via vapor em frasco lacrado. Dessas cepas destaca-se o isolado LEPETRO-155C que demonstrou o maior coeficiente específico de crescimento ($0,38-0,57 \text{ h}^{-1}$) em benzeno, tolueno e xileno, respectivamente.

Analisando os resultados experimentais das cepas bacterianas a Tabela 1, mostra que a cepa LEPETRO-155C para xileno foi a que teve a maior coeficiente de crescimento ($0,57 \text{ h}^{-1}$), ou seja, dentre as outras cepas a LEPETRO-155C teve um maior crescimento em número de colônia tendo o xileno como única fonte de carbono. Para o tolueno a mesma cepa bacteriana obteve maior coeficiente de crescimento ($0,38 \text{ h}^{-1}$), seguido do benzeno ($0,57 \text{ h}^{-1}$). Já a cepa LEPETRO-155 I para xileno teve um menor coeficiente de crescimento ($0,18 \text{ h}^{-1}$), em tolueno o LEPETRO-128 B teve o coeficiente de ($0,25 \text{ h}^{-1}$) e benzeno com o menor coeficiente de crescimento LEPETRO-05A ($0,30 \text{ h}^{-1}$). Para os compostos benzeno, tolueno e xileno (BTXs), o isolado LEPETRO-155 C obteve uma melhor resposta em teste laboratorial tendo os BTXs

como única fonte de carbono, para o processo de bioaugmentação *in situ*, poderá degradar estes contaminantes em relação aos outros isolados testados em bancada.

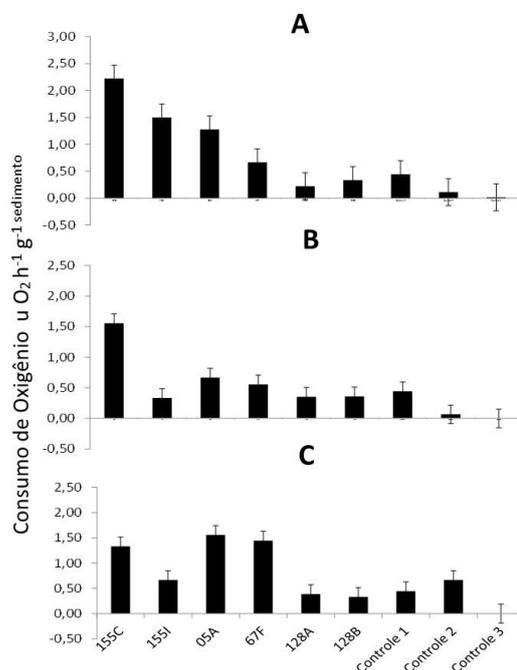
Tabela 1 - Resultados experimentais das cepas microbianas com as velocidades de crescimento realizados com os compostos benzeno, tolueno e xileno (BTXs) em 12 horas

Cepas	μ especifico (h^{-1})		
	Xileno	Tolueno	Benzeno
128 A	0,37	0,28	0,40
128 B	0,34	0,25	0,31
67 C	0,34	0,29	0,43
155C	0,46	0,38	0,57
155i	0,18	0,36	0,39
05A	0,31	0,26	0,30

Elaboração: a autora (2015)

O benzeno, tolueno e xileno foram selecionados como representantes de compostos monoaromático em teste com amostra ambiental. As seis cepas selecionadas foram capazes de crescer com esses BTX como únicas fontes de carbono. Os resultados experimentais mostram que das seis cepas bacterianas utilizadas em microcosmo, a cepa LEPETRO-155C teve maior coeficiente de consumo de oxigênio, para Xileno ($2,22 \mu l O_2 h^{-1} g_{\text{sedimento}}^{-1}$), em tolueno, um consumo de oxigênio de $1,46 \mu l O_2 h^{-1} g_{\text{sedimento}}^{-1}$, já em benzeno teve um consumo de oxigênio de $1,33 \mu l O_2 h^{-1} g_{\text{sedimento}}^{-1}$, um menor coeficiente no consumo de oxigênio em relação a cepa LEPETRO-05A, que teve um consumo de oxigênio de $1,56 \mu l O_2 h^{-1} g_{\text{sedimento}}^{-1}$. O controle 1 (controle positivo), com sedimento de mangue natural, também teve um consumo de oxigênio devido a atividade microbiana natural pertencentes ao sedimento de manguezal, mostrando que há atividade metabólica no sedimento. No controle 2, sedimento de mangue natural com o Benzeno, Tolueno e xileno separadamente, mostra que há um consumo de oxigênio, mas perante aos BTX, seu consumo de oxigênio é bem menor ($0,11$ a $67 h^{-1} g_{\text{sedimento}}^{-1}$) em comparação com o controle 1 ($0,44 h^{-1} g_{\text{sedimento}}^{-1}$) e os ensaios com as seis cepas. O controle 3 (controle negativo), não mostrou consumo de oxigênio, como já era esperado, devido este controle ser totalmente estéril por processo de autoclavagem, FIGURA 14.

Figura 14 – Resultados experimentais das cepas microbianas com consumo de Oxigênio em $\mu\text{O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}_{\text{sedimento}}^{-1}$ realizados com sedimento de manguezal com os compostos benzeno, tolueno e xileno (BTXs) em 12 horas, 24 horas e 48 horas. A) coeficiente de consumo de O_2 em 5 mg de xileno $\text{g}_{\text{sedimento}}^{-1}$. B) coeficiente de consumo de O_2 em 5 mg de tolueno $\text{g}_{\text{sedimento}}^{-1}$. C) coeficiente de consumo de O_2 em 5 mg de benzeno $\text{g}_{\text{sedimento}}^{-1}$

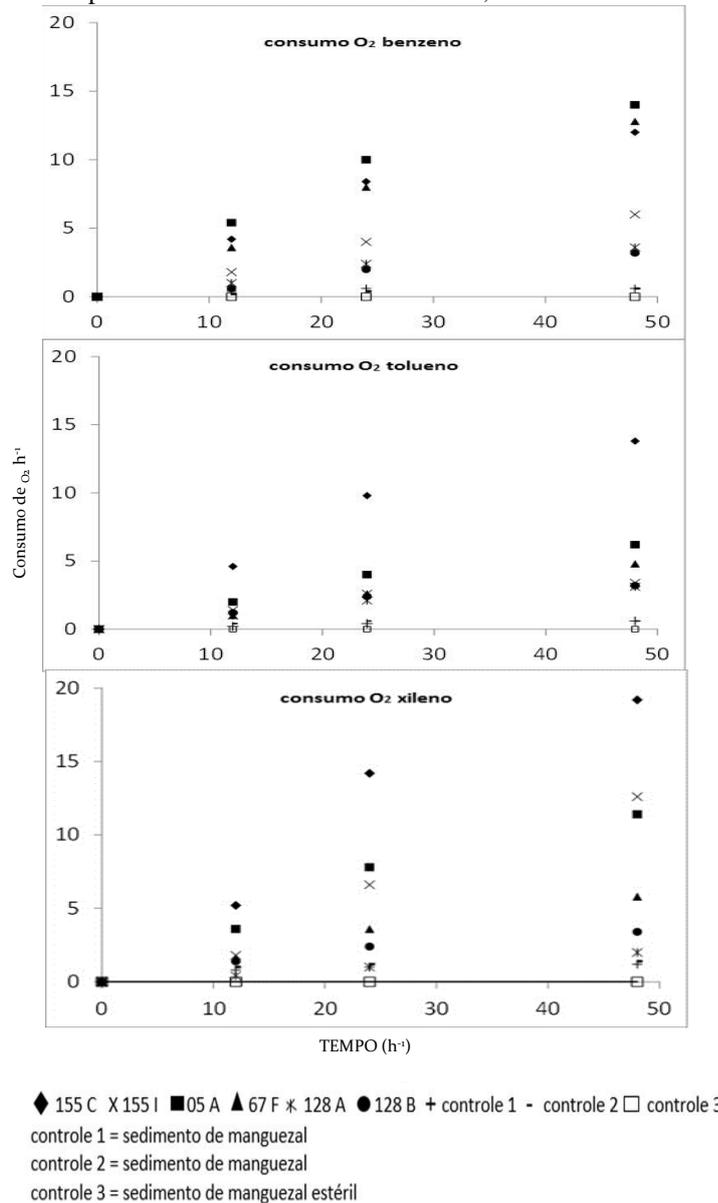


Elaboração: a autora (2015)

Para questão de conhecimento ambiental, o sedimento de mangue que foi utilizado em teste de microcosmo, foi medido o teor de umidade. Sabendo-se em que concentração da umidade da amostra, revelando que a amostra de sedimento de mangue teve 60% de umidade presente na amostra.

Os resultados laboratoriais em teste de bancada das cepas microbianas com suas respectivas linhas de tendência, mostram que o isolado LEPETRO-155C teve um maior consumo de oxigênio por hora em xileno e tolueno, tendo uma linha de tendência de $0,40\text{h}^{-1}$, $0,27\text{h}^{-1}$ respectivamente, ou seja, foi mais eficiente em comparação aos outros isolados. Já em benzeno o isolado LEPETRO-05A, tendo um coeficiente específico de $0,28\text{h}^{-1}$, ou seja, teve um maior desempenho em consumo de oxigênio tendo também o benzeno como única fonte de carbono. Dentre os BTX utilizados o isolado LEPETRO-128A ($0,04\text{h}^{-1}$, $0,06\text{h}^{-1}$ e $0,07\text{h}^{-1}$) e LEPETRO-128B ($0,06\text{h}^{-1}$, $0,6\text{h}^{-1}$ e $0,06\text{h}^{-1}$) para xileno, tolueno e benzeno concomitantemente, tiveram uma menor linha de tendência apresentada (FIGURA 15).

Figura 15 – Resultados laboratoriais em microcosmo das cepas microbianas com suas respectivas linhas de tendência para os compostos BTX com análise de 12 horas, 24 horas e 48 horas



Elaboração: a autora (2015)

O gênero *Pseudomonas* tem sido frequentemente isolado e empregado em ensaios de biorremediação. Sua capacidade de degradação tem sido comprovada tanto para linhagens obtidas de ambientes impactados por hidrocarbonetos de petróleo (KACZOREK & OLSZANOWSKI, 2011) quanto para isolados sem prévia exposição aos poluentes (ZANAROLI et al, 2010). Trata-se de uma espécie ubíqua, encontrada em solos, sedimentos, águas subterrâneas e em ecossistemas marinhos contaminados (VIEIRA et al., 2007; HOSOKAWA et al., 2009; CIRIC et al., 2010; ZHANG et al., 2010).

Na pesquisa de GHAZALI et al. (2004) observaram que o crescimento de *Pseudomonas* em diversos substratos testados, dentre os quais estiveram óleo cru, tolueno,

etil-benzeno e n-tetradecano, demonstrando sua diversidade metabólica, também verificada no presente estudo pelos testes de cinética de crescimento e teste de oxidação em amostra ambiental contaminada. Dados publicados relatam a capacidade de degradação de hidrocarbonetos de petróleo, incluindo mono e poliaromáticos, também por *Acinetobacter* (VIÑAS et al., 2005; NIELSEN et al., 2006). O isolamento já foi realizado a partir da amostra de óleo de tanques armazenadores de petróleo por Vasconcelos et al. (2009) que verificaram em ensaios laboratoriais que a degradação de hidrocarbonetos pelas espécies ocorreu preferencialmente na presença de ácidos graxos, provavelmente resultante dos compostos poluentes.

Para a avaliação do potencial genético dos isolados bacteriano foi realizada a detecção do gene C120, um dentre os muitos genes envolvidos nas rotas metabólicas da degradação de hidrocarbonetos. O gene C120 codifica a enzima catecol 1,2 dioxigenase, catalizadora na quebra do anel benzênico (HENDRICKX et al., 2006). O primer C120 empregado nesse experimento foi desenhado para identificar genótipos degradadores de monoaromáticos, porém o uso apenas desse primer não foi capaz de identificar as mudanças interespecíficas que ocorreram nos testes de cinética de crescimento e teste de oxidação em amostra ambiental. A utilização de mais genes poderia explicar qual a variável envolvida nas rotas metabólicas na produção de biossurfactantes. Mesmo assim, os resultados para os testes aplicados nesse estudo usando o marcador molecular foi positivo para todas as cepas usadas, pois, os isolados conseguiram degradar os BTX como única fonte de carbono sendo.

4.4 CONCLUSÕES

Por mais que saiba a identificação das cepas bacterianas através do 16S rRNA parcial e a caracterização da enzima responsável pelos estágios iniciais do processo de biorremediação, como a Catecol 1,2 dioxigenase (C120), é importante em laboratório estudar a cinética de crescimento das amostras para saber quais dessas tem o melhor resultado para aplicação da biorremediação *in situ*, inoculando microrganismos endógenos capazes de degradar mais rápido o ambiente contaminado por ações petrolíferas em regiões portuárias.

Das amostras sequenciadas, através da análise filogenética, se constatou que das 10 cepas, mesmo com características morfológicas distintas, seis pertencem a mesma espécie no cladograma. Os resultados em cinética de crescimento em BTX e a cinética de consumo de oxigênio deveriam apresentar para essas cepas, os mesmos valores tanto em consumo de O₂

quanto em crescimento em meio mineral, no entanto essas cepas obtiveram valores diferentes nas análises, ou seja, por mais que essas bactérias sejam das mesmas espécies, elas são de cepas diferentes. Outro fator que pode explicar as diferentes cinéticas, são a existência de características metabólicas primárias e secundárias. As características que podem ter afetado no comportamento das cepas, por mais que tivesse feito o estudo da caracterização da dioxigenase e da identificação através do 16 S rRNA, algumas variantes podem ter interferido nas variantes, seja ela pela capacidade de produção de biossurfactantes ou mesmo no seu plasmídeo.

Com o processo de bioaugmentação, os microrganismos *in situ* podem degradar significativamente estes contaminantes (benzeno, tolueno e xileno), já que em teste em laboratório foi possível observar e avaliar a velocidade de crescimento de biomassa por hora, tendo os BTX como única fonte de carbono. Portanto, processos de biorremediação são necessários para recuperar ambientes que são frequentemente contaminados por esses compostos como, em região de manguezal próximo a setores da cadeia produtiva do petróleo.

4.5 REFERÊNCIAS

ABUHAMED, T.; BAYRAKTAR, E., MEHMETOGLU, T., MEHMETOGLU, U. Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. **Process biochemistry**. v.39, p. 983-988, 2004.

AKHTAR, M.; HASANY, S. N.; BHANGER, M. I.; IQBAL, S. Sorption potential of Moringaoleifera pods for the removal of organic pollutants from aqueous solutions. **Journal of hazardous materials**. v. 141. p. 546–556, 2007.

ALEXANDER M. Biodegradation and bioremediation. **Academic press**. 2 ed. v.1. San Diego, 1994.

ALUYOR, E.O.; OBAHIAGBON, K.O.; ORIJESU, M. Biodegradation of vegetable oils: A review. **Scientific research and essay**, v.4, n.6, p. 543-548, 2009.

ANNESER, B.; EINSIEDL, F.; MECKENSTOCK, R.U.; RICHTERS, L.; WISOTZKY, F.; GRIEBLER, C. High-resolution monitoring of biogeochemical gradients in a tar oil-contaminated aquifer. **Applied geochemistry**. v.23, n. 6, p.1715–1730, 2008.

ARAI, H.; OHISHI, T.; CHANG, M.Y.; KUDO, T. Arrangement and regulation of the genes for meta-pathway enzymes required for degradation of phenol in *Comamonastestosteroni* TA441. **Microbiology**. v.146, p.1707–1715, 2000.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Polybrominated Biphenyls and Polybrominated Diphenyl Ethers. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, **Public health service**, 2004.

BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresourcetechnology**, Holanda, v. 96, p. 1049-1055, 2005.

BERTIN, L.; DI GIOIA, D.; BARBERIO, C; SALVADORI, L; MARCHETTI, L; FAVA, F.. Biodegradation of polyethoxylatednonylphenols in packed-bed biofilm reactors. *Industrial and Engineering. Chemistry research*, v. 46, n. 21, p. 6681-6687, 2007.

BUGG, T. D. H.; WINFIELD, C. J. Enzymatic cleavage of aromatic rings: mechanistic aspects of the catechol dioxygenases and later enzymes of bacterial oxidative cleavage pathways. **Natural product reports**, v. 15, p. 523-530, 1998.

CIRIC, L., PHILP, J.C., WHITELEY, A.S. Hydrocarbon utilization within a diesel-degrading bacterial consortium. **FEMS Microbiology Letters**, Reino Unido, v. 303, p. 116-122, 2010.

DÍAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. **International microbiology**. v.7, p. 173–180, 2004.

DIAZ, E.; PRIETO, M. A. Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *curropinbiotechnol.* v. 11, p.467–475, 2000.

DINKLA, I. J.; GABOR, E. M.; JANSSEN, D. B. Effects of iron limitation on the degradation of toluene by *Pseudomonas* strains carrying the tol (pWWO) plasmid. **Applied environmental microbiology**. v. 67, p. 3406–3412, 2001.

DOU, J., LIU, X., HU, Z. Anaerobic BTEX degradation in soil bioaugmented with mixed consortia under nitrate reducing conditions. **Journal of environmental sciences**, v.20, p.585-592, 2008.

DYBAS, M.J.; HYNDMAN, D. W.; HEINE, R.; LINNING, K.; TIEDJE, J.; VOICE, T.; WALLACE, R.; WIGGERT, D.; ZHAO, X.; ARTUZ, R.; CRIDDLE, C. S. Development, operation, and long-term performance of a full-scale biocurtain utilizing bioaugmentation. **Environmentalsciencetechnology**. v.36, n.3, p. 3635-3644, 2002.

EL FANTROUSSI, S.; AGATHOS, S.N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? **Current opinion in microbiology**. v.8, p. 268-275, 2005.

EL FANTROUSSI, S.; BELKACEMI, M.; TOP, E.M.; MAHILLON, J.; NAVEAU, H.S.N. Bioaugmentation of a soil bioreactor designed for pilot-scale anaerobic bioremediation studies. **Environsciencetechnology**. v.33, p. 2992–3001, 1999.

EMBRAPA. Manual de métodos de análise de solo, Rio de Janeiro: **Centro nacional de pesquisa de solos**, ed.2 ,v. 1,p. 212, 1997.

FRANZETTI, A.; DI GENNARO, P.; BESTETTI, G.; LASAGNI, M.; PITEA, D.; COLLINA, E. Selection of surfactants for enhancing diesel hydrocarbons contaminated media bioremediation. **Journal of hazardous materials**. v.152,p.1309-1316, 2008.

GHAZALI, F.M., RAHMAN, R.N.Z.A., SALLEH, A.B., BASRI, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. **International biodeterioration and biodegradation**, Reino Unido, v. 54, p. 61-67, 2004.

GHIORSE WC, WILSON JL. Microbial ecology of the terrestrial subsurface. **Advances applied microbiology**.v.33, p. 107-172, 1988.

GOLYSHIN, P.N.; MARTINS, D. S.; VA.; KAISER, O. Genome sequence completed of *Alcanivorax borkumensis*, a hydrocarbon-degrading bacterium that plays a global role in oil removal from marine systems. **Journal biotechnology**. v. 106, p. 215–220, 2003.

HAGGBLOM, M. Mechanisms of bacterial degradation and transformation of chlorinated monoaromatic compounds. **Journal basic microbiol**. V.30, p.115–141. 1990.

HEIDELBERG, J.; PAULSEN, I.T.; NELSON, K.E. Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. **Nature biotechnology** . v.20, p.1118–1123, 2002.

HEIDER, J.; FUCHS, G. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. **European journal of biochemistry**, v.243, p. 577-596, 1997.

HIDGWAY, H. F.; SAFARIK; RODRIGUEZ. Life in a RO Biofilm: Breathing and other problems of bacteria in very attached relationships. Proc. International Membrane Science & Technology Conference, November 10-12, **University of new South wales**. p. 248-250. 1992.

HOSOKAWA, R., NAGAI, M., MORIKAWA, M., OKUYAMA, H. Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. **world journal of microbiology and biotechnology**, Holanda, v.25, p. 1519-1528, 2009.

HUTCHINS, S.R.; DOWNS, W.C.; WILSON, G.B.; Smith.; KOVACS, D.K. Effect of nitrate addition on bioremediation of fuel-contaminated aquifer field demonstration. **Groundwater**. v.29, n. 4, p. 571, 1991.

JACQUES R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciênciarural**, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.

JO, W.J.; LOGUINOV, A.; CHANG, M.; WINTZ, H.; NISLOW, C.; ARKIN, A.P.; GIAEVER, G., VULPE, C.D. Identification of genes involved in the toxic response of *Saccharomyces cerevisiae* against iron and copper overload by parallel analysis of deletion mutants. **Toxicology science**. v.101, p.140-15, 2008.

KACZOREK, E., OLSZANOWSKI, A. Uptake of Hydrocarbon by *Pseudomonas fluorescens* (P1) and *Pseudomonas putida* (K1) strains in the presence of surfactants: A cell surface modification. **Water, air and soil pollution**, Holanda, v.214, p. 451-459, 2011.

KANALY, R. A.; BARTHA, R.; WATANABE, K.; SHIGEAKI, H. Rapid mineralization of benzo[a]pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, N. 10, p. 4205-4211, 2000.

KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de “landfarming”**. 2001. 202 p. Teses (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

KIM, H. J.; GRAHAM, D. W. Effects of oxygen and nitrogen conditions on the transformation kinetics of 1,2-dichloroethenes by *Methylosinus trichosporium* OB3b and its sMMOC mutant. **Biodegradation**. v. 14, p. 407–414, 2003.

LEBKOWSKA, M., ZBOROWSKA, E., KARWOWSKA, E., MIASKIEWICZ, E., MUSZYNSKI, A., TABERNACKA, A., NAUMCZYK, J., JECZALIK, M. Bioremediation OF SOIL polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: Field-scale processes in Poland. **Ecological engineering**, Holanda, v.37, p. 1895-1900, 2011.

LEE, J.Y.; ROH, J.R.; KIM, H.S. Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for the simultaneous biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene mixture. **Biotechnology and bioengineering**. v.4, p.1146–52, 1994.

Lin, C.W.; Chen, L.H.; Yet Pole I.; Lai, C.Y. Microbial communities and biodegradation in lab-scale BTEX-contaminated groundwater remediation using an oxygen-releasing reactive barrier. **Bioprocess and biosystems bioengineering**. v.33, p.383–91, 2010.

LOURENÇO, E. S. O. **Avaliação físico-química da remediação de solos contaminados por BTEX**. 2006. 118 p. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola)–Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2006.

LOVLEY, D. R. Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. **Nature review microbiology**. v. 1, p. 35–44, 2003.

MAJOR, V. S.; KLEIN, K. J.; EHRHART, M. G. Work time, work interference with family, and psychological distress. **Journal of applied psychology**. v.87, n.3, p.427-436, 2002.

MARTINO, C.D.; NANCY, I. L.; LAURA, J. R. I. Isolation and characterization of benzene, toluene and xylene degrading *Pseudomonas* sp. selected as candidates for bioremediation. **Journal International biodeterioration and biodegradation**, n.67, p.15- 20, 2011.

MASSALHA, N.; BASHERR, S.; SABBAH, I. Effect of adsorption and bead size of immobilized biomass on the rate of biodegradation of phenol at high concentration levels. **Industrial engineering chemistry research**. v. 46, p.6820–6824. 2007.

MAZZEO, C. E. D., LEVY, E. C., DE ANGELIS, F.D., MORALE, M. A. M. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **Science of the total environment**. v.408, p. 4334-4340, 2010.

MCNAUGHTON S. J, STEPHEN JR, VENOSA A. D, DAVIS G. A, CHANG Y. J, WHITE DC. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. **Applied environmental microbiology**. v.65, p.3566–3574, 1999.

MELO, I. S, AZEVEDO, J. L. Microbiologia ambiental. Jaguariúna: **Embrapa-CNPMA**, ed. 2, v. 1, 2008.

MELO PLESE, L.P.; PARAIBA, L.C.; FOLONI, L.L.; PIMENTEL, T.R.R. Kinetics of carbosulfan hydrolysis to carbofuran and the subsequent degradation of this last compound in irrigated rice fields. **Chemosphere**. v.60, p.149–156, 2005.

MEYSAMI, P.; BAHERI, H. Pre-screening of fungi and bulking agents for contaminated soil bioremediation. **Research advance environmental**. v.7, p. 881-887, 2003.

MILLS, R.F.; KRIJGER, G.C.; BACCARINI, HALL, J.L.; WILLIAMS, L. E. Functional expression of AtHMA4, a P1B-type ATPase or the Zn/Co/Cd/Pb subclass. **Journal plant**. v. 35, p. 164-176, 2003.

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

NAKHLA G. Biokinetic modeling of in situ bioremediation of BTX compounds — impact of process variable and scale up implications. **Water research**.v. 3, p. 1296–307, 2003.

NIELSEN, D.R., MCLELLAN, P.J., DAUGULIS, A.J., Direct estimation of the oxygen requirements of *Achromobacter xylosoxidans* of aerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons (BTX) in abioscrubber. **Biotechnology letters**, Holanda, v.28, p. 1293-1298, 2006.

NOJIRI, H.; TSUDA, M. Functional evolution of bacteria in degradation of environmental pollutants. **Tanpakushitsukakusankoso**. v.50, p.1505–150, 2005.

OTENIO, M. H.; SILVA, M. T. L.; MARQUES, M. L. O.; ROSEIRO, J.C.; BIDOIA, E.D. Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCM 852. **Brazilian journal microbiology**. v.36, p.258–261. 2005.

PARALES, R. E.; HADDOCK, J.D. Biocatalytic degradation of pollutants. **Current opinion in biotechnology**. v.15, p. 374–379, 2004

PAUL, D.; PANDEY, G.; MEIER, C.; MEER, V. D. JR.; JAIN, R.K. Bacterial community structure of a pesticide-contaminated site and assessment of changes induced in community structure during bioremediation. **FEMS microbiology ecology**. v.57, p. 116–127, 2006a.

PEDROZO, M. F. M.; BARBOSA, E. M.; CORSEUIL, H. X.; SCHNEIDER, M. R.; LINHARES, M. M. Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo. Governo da Bahia, Secretaria do Planejamento. **Ciência e tecnologia**, Salvador, 2002.

PHALE, P. S.; BASU, A.; MAJHI, P. D.; DEVERYSHETTY, J.; VAMSEE; KRISHNA, C.; SHRIVASTAVA, R. Metabolic diversity in bacterial degradation of aromatic compounds. **Omics: a journal of integrative biology**. v.11, p. 252–279, 2007.

PHELPS, C.D.; YOUNG, L.Y. Anaerobic biodegradation of BTEX and gasoline in various aquatic sediments. **Biodegradation**. v.10, p. 15–25, 1999.

PUROHIT, H.J.; RAJE, D.V.; KAPLEY, A.; PADMANABHAN, P.; SINGH, R.N. Genomics tools in environmental impact assessment. **Environmental Science Technology**. v.37, p. 356a–363a, 2003.

QUEIROZ, A. F., OLIVEIRA, O. M. C, SANTANA, R. C., TRIGÜIS, J. A., CRUZ, M. J. M. Procedimentos de Biorremediação Aplicados na Limpeza do Substrato de Manguezal Impactado por Petróleo. **Plurais. Revista multidisciplinar da UNEB**, v. 1, p. 159-177, 2010.

RABUS, R. Functional genomics of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. **Applied microbiology biotechnology**. v.68, p. 580–587, 2005.

REGNO, V.; ARULGNANENDRAN, J.; NIRMALAKHANDAN, N. Microbial toxicity in soil medium. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 39, n. 1, p. 48-56, 1998.

SAMANTA, S.K.; CHAKRABORTI A.K.; JAIN, R.K. Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. **Applied microbiology biotechnology**. v.53, p. 98–107, 1999.

SCRAMIN, S.; DENTZIEN, A.F.M.; MELO, I.S. Indução da enzima pirocatecase por *Acinetobacterbaumanii* envolvida na biodegradação do herbicida Diuron. **Pesticidas: Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v.13, p. 113–118, 2003.

SHANNON, M. JR.; UNTERMAN, R. Evaluating bioremediation: distinguishing fact from fiction. **Annual reviews in microbiology**, v. 47, n. 1, p. 715-736, 1993.

SHIM, H.; HWANG, B.; LEE, S.S.; KONG, S.H. Kinetics of BTEX biodegradation by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* under hypoxic conditions. **Biodegradation**. v.16, p. 319–27, 2005.

SNELLINX, Z.; NEPOVIM, A.; TAGHAVI, S.; VANGRONSVELD, J.; VANEK, T.; VAN DER LELIE, D. Biological remediation of explosives and related nitroaromatic compounds. **Environmental science and pollution research**. v. 9, p. 48–61, 2002.

SOLYANIKOVA, I.P.; GOLOVLEVA, L.A. Bacterial degradation of chlorophenols: pathways, biochemical and genetic aspects. **Journal Environ scienc health biotechnology**. v.39, p. 333–351, 2004.

STOLZ, A.; KNACKMUSS, H.J. Degradation of 2, 4-dihydroxybenzoate by *Pseudomonas* sp. BN9. **FEMS Microbiology lettres**. v.108, p. 219–224, 1993.

SVEDRUZIC, D.; JONSSON, S.; TOYOTA, C.G.; REINHARDT, L.A.; RICAGNO, S.; LINDQVIST, Y.; RICHARDS, N.G. The enzymes of oxalate metabolism: unexpected structures and mechanisms. **Arch Biochem Biophys**. v.433, p. 176–192, 2005.

SYMONS, Z. C.; BRUCE, N. C. Bacterial pathways for degradation of nitroaromatics. **Natural product reports**.v. 23, n. 6, p. 845-850, 2006.

TAMURA, K. J.; DUDLEY, M. NEI, S. KUMAR. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular. Biology. Evoltion**. v.24, p.1596–1599, 2007.

VAN MEER, D. JR. Genetic adaptation of bacteria to chlorinated aromatic compounds. **FEMS Review. microbiology**. v.15, p.239–249, 1994.

VAN MEER, D.JR., Tropel, D. Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. **Microbiology Molecular Biology Review**. v.68, p.474–500, 2004.

VAN VEEN, J.A.; OVERBEEK, V.; ELSAS, L.S. V. J.D. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. **Microbiologymolecularbiologyreview**. v. 61, p. 121–135, 1997.

VIEIRA, P. A., VIEIRA, R. B, DE FRANÇA, F, F.P., CARDOSO, V.L., Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline, **Journal of hazardous materials**, Holanda, v.140, p. 52-59, 2007.

VIÑAS, M., SABATÉ, J., ESPUNY, M.J., SOLANAS, A.M. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. **Applied and environmental microbiology**, USA, v.71, p. 7008-7018, 2005.

VOLKERING, F.; BREURE, A.M.; RULKENS, W.H. Microbiological aspects of surfactant use for biological remediation. **Biodegradation**. v.8, p.401-417, 1998.

VOORDOUW, S.M.; AMSTRONG, M.F.; REIMER, B.; FOUTS, A.J.; TELANG, Y.; SHEN, D., GEVERTZ. Research on the Environment and Biotechnology. **Environmental microbiology**, v.62, p. 1623, 1996.

WANG, X.; MARLOWE, E. M.; MILLER-MAIER, R. M.; BRUSSEAU, M. L.; Cyclodextrin-enhanced biodegradation of phenanthrene. **Environmental science and technology**, v.32, p.1907-1912, 1998.

WATANABE, K.; TERAMOTO M., HARAYAMA S. Stable bioaugmentation of activated sludge with foreign catabolic genes harboured by an indigenous dominant bacterium. **Environmental microbiology**, v.4, n. 10, p. 577–583, 2002.

WATTS, R. J.; HALLER, D. R.; JONES, A. P.; TELL, A. L. A foundation for the risk-based treatment of gasoline-contaminated soils using modified Fenton's reactions. **Journal of hazardous materials**, v. 76, n. 1, p. 73-89, 2000.

WIDDEL, F.; RABUS, R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. **Current opinion in biotechnology**, v.12, p. 259–276, 2001.

YUN, T.; YUAN-RONG, L.; TIAN-LING, Z.; LI-ZHE, C.; XIAO X., MARINE, C. Contamination and potential biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments of Xiamen, China. **Pollution bulletin**. v.56, p.1184–1191, 2008.

ZABIEGAŁA, B.; KOT-WASIK, A.; URBANOWICZ, M.; NAMIEŚNIK, J. Passive sampling as a tool for obtaining reliable analytical information in environmental quality monitoring. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 396, n. 1, p. 273-296, 2010.

ZANAROLI, G.; DI TORO, S.; TODARO, D.; VARESE, G. C.; BERTOLOTTI, A.; FAVA, F., Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated complex source of microorganisms. **Microbial cell factories**, v. 9, n. 10, p. 1-13, 2010.

ZHANG, Z.; GAI, L.; HOU, Z.; YANG, C.; MA, C., WANG, Z.; SUN, B.; HE, X., TAMG, H.; XU, P. Characterization and biotechnological potential of petroleum degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. **Bioresource technology**, Holanda, v.101, p. 8452-8456, 2010.

ZHANG, J.; ZHANG, H.; LI, X.; SU, Z.; ZHANG, C. Soil microbial ecological process and microbial functional gene diversity. **Ying yong sheng taixuebao**. v.17, p. 1129–1132, 2006.

ZHAO, B.; POH, C.L. Insights in to environmental bioremediation by microorganisms through functional genomics and proteomics. **Proteomics**. v.8, p. 874–881, 2008.

5 CONCLUSÕES

As amostras oriundas de sedimento de manguezal apresentaram geneticamente o potencial de degradar os compostos benzeno, tolueno e xileno-BTX.

Os ensaios de cinética de crescimento e teste de oxidação em amostra ambiental contamina, refletiram diferentes comportamento de biodegradação evidenciados nos experimentos, porém todos os resultados foram positivos para biodegradação de BTX.

Por mais que saiba a identificação das cepas bacterianas através do 16S rRNA parcial e a caracterização da enzima responsável pelos estágios iniciais do processo de biorremediação, como a catecol 1,2 dioxigenase (C120), é importante em laboratório estudar a cinética de crescimento das amostras para saber quais dessas tem o melhor resultado para aplicação da biorremediação *in situ*, inoculando microrganismos endógenos capazes de degradar mais rápido o ambiente contaminado por ações petrolíferas em regiões portuárias.

Das amostras sequenciadas, através da análise filogenética, se constatou que das 10 cepas, mesmo com características morfológicas distintas, seis pertencem a mesma espécie no clado. Os resultados em cinética de crescimento em BTX e a cinética de consumo de oxigênio deveriam apresentar para essas cepas, os mesmos valores tanto em consumo de O₂ quanto em crescimento em meio mineral, no entanto essas cepas obtiveram valores diferentes nas análises, ou seja, por mais que essas bactérias sejam das mesmas espécies, elas são de cepas diferentes. Outro fator que pode explicar as diferentes cinéticas, são a existência de características metabólicas primárias e secundárias. As características que podem ter afetado no comportamento das cepas, por mais que tivesse feito o estudo da caracterização da dioxigenase e da identificação através do 16 S rRNA, algumas variantes podem ter interferido nas variantes, seja ela pela capacidade de produção de biossurfactantes ou mesmo no seu plasmídeo.

Com o processo de bioaugmentação, os microrganismos *in situ* podem degradar significativamente estes contaminantes (benzeno, tolueno e xileno), já que em teste em

laboratório foi possível observar e avaliar a velocidade de crescimento de biomassa por hora, tendo os BTX como única fonte de carbono. Portanto, processos de biorremediação são necessários para recuperar ambientes que são frequentemente contaminados por esses compostos como, em região de manguezal próximo a setores da cadeia produtiva do petróleo.

Vale salientar que o uso da técnica de biorremediação no processo de bioaugmentação, os microrganismos *in situ* podem degradar significativamente estes contaminantes (benzeno, tolueno e xileno), diminuindo sua vida média, já que em testes laboratoriais foi possível observar e avaliar a velocidade de crescimento de biomassa por hora, tendo os BTX como única fonte de carbono. Portanto, processos de biorremediação são necessários para recuperar ambientes que são frequentemente contaminados por esses compostos como, em região de mangue próximo a baía portuária.

RECOMENDAÇÕES

Identificar as variantes que afetam na capacidade de produção de biosurfactantes ou das rotas secundárias do metabolismo microbiano;

Testar outros primers como C23DO, PdoB, TodC1, xyIM, bphA1) a fim de identificação a variação metabólica entre as cepas bacterinas da mesma espécie com genes funcionais e o seu potencial biodegradador;

Investir em mais estudos sobre a aplicabilidade da estratégia de bioaugmentação em escala de campo;

Os experimentos feitos sirvam de base para outros trabalhos científicos.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Cepas selecionadas e isoladas a partir das amostras de do estudo anterior

Local*	Nº fonte	Características	Área na cadeia produtiva do petróleo
02P	28	Candeias	Área de refino
06P	7	Candeias	Área de refino
D03P	55	Madre de Deus	Área de transporte
J02P	02	Campo de Dom João-em São Francisco do Conde	Área de produção de petróleo
J02P	5	Campo de Dom João-em São Francisco do Conde	Área de produção de petróleo

*Elaboração: a autora (2015)

APÊNDICE B- Cepas microbianas selecionadas a partir do ensaio de degradação feito em placa de Petri com meio BH (1% de petróleo) e teste de gram.

Nº cepas	Cepas microbianas**	Características	Cadeia produtiva do petróleo
1	128 A	Bacilos-Gram negativo	Área de refino
2	128 B	Bacilos-Gram negativo	Área de refino
3	67 C	Bacilos-Gram negativo	Área de refino
4	67 E	Bacilos-Gram positivo (3 a 4 µc)	Área de refino
5	67 B	Bacilos-Gram positivo (3,5 a4 µc)	Área de refino
6	67 F	Bacilos-Gram negativo	Área de refino
7	155 A	Bacilos-Gram negativo	Área de transporte
8	155 C	Bacilos-Gram negativo	Área de transporte
9	155 I	Bacilos-Gram negativo	Área de transporte
10	155 E	Bacilos-Gram negativo	Área de transporte
11	102 A	Bacilos-Gram negativo	Área de produção de petróleo
12	05 A	Bacilos-Gram negativo	Área de produção de petróleo

*isolados microbianos a partir dos ensaios de degradação e preservados de manguezais em pesquisa anterior (FIORAVANTI, 2013).

*Elaboração: a autora (2015)

APÊNDICE C– Primers utilizados no teste de amplificação das amostras para identificação e caracterização da enzima catecol 1,2 dioxigenase. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

Primer	Sequência 5' - 3'	Amplitude (pb*)
<i>27 forward</i>	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	880
<i>907 reverse</i>	CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT	
<i>C120 forward</i>	GCC AAC GTC GAC GTC TGG CA	
<i>C120 reverse</i>	CGC CTT CAA AGT TGA TCT GCG TGG T	282

*(pb) pares de bases

Elaboração: a autora (2015)

APÊNDICE D – caracterização da enzima Catecol 1,2 dioxidase (C120) e identificação do 16S rRNA

Nº cepas	Cepas microbianas**	Primer 16S rRNA	Primer C120
1	LEPETRO-128 A	128 A	128 A
2	LEPETRO-128 B	128 B	128 B
3	LEPETRO-67 C	67 C	67 C
4	LEPETRO-67 F	67 F	67 F
5	LEPETRO-155 A	155 A	155 A
6	LEPETRO-155 C	155 C	155 C
7	LEPETRO-155 I	155 I	155 I
8	LEPETRO-155 E	155 E	155 E
9	LEPETRO-102 A	102 A	*
10	LEPETRO-05 A	05 A	05 A

*Cepa que não amplificou para o primer de degradação C120 Catecol 1,2 dioxydase

**Cepas microbianas utilizadas na caracterização enzimática

Elaboração: a autora (2015)

APÊNDICE E – Sequenciamento parcial dos genes RNA ribossomal 16S e do gene Catecol 1,2-dioxygenase (c120). Analisados usando o programa BLAST

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Sequenciamento das cepas microbianas (F)	16S ribosomal RNA gene, partial sequence	catechol 1,2-dioxygenase (c120) gene, complete	Espécie
128 A	<p> GMYTKKSSSMRGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGTCTTGTATTC AGCGGGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAG GAACGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTGCGCTATCAG ATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAATGGCTACCAAGGGCAGCATCCGTAAC GGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAATGAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGC AGTGGGGAATTTGGACAATGGGGCAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTC TTCGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGTCTTTGACG TTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGAAG CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCC CCGGGCTCAACCTGGGAATGCATCCAAAACGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGA ATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACACC TGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA GTCCACCGCTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTGTGGCGCAGCTAAC GCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGGCCCAAGGTTAAACTAAAAWKRAAATGRCRS MGGGA </p>	<p> GGGGGGTTTATTCTGACTTCGATTTCGACTCAGTC CGAATACAACCTGCGCCGCCATCATACCGATG CCGAGGGCCGCTACCGTGCCTCCATCGTCCG TCGGGTACGGTGCACCCGAGGGCCGACCA GGAATGCCTGGACCTGCTCGGCCCCACGGCCAGC GCCCGGCACGCTGCATCTTCATCTGGCACCT GGGTTCGCCACCTGACCACGAGATCAACTTTGA AGGCGA </p>	<p><i>Pseudomonas putida</i></p>
128 B	<p> GMYTKKSSSMRGGACTACACATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGTCTTGTATTCAG CGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGA ACGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTGCGCTATCAGAT GAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAATGGCTACCAAGGGCAGCATCCGTAAC TGTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAATGAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAG TGGGGAATATTGGACAATGGGGCAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTC CGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGTCTTTGACGTT ACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGAAGC GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCC CCGGGCTCAACCTGGGAATGCATCCAAAACGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGA TTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACACC GGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG TCCACCGCTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTGTGGCGCAGCTAACGCAT TAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGGCCCAAGGTTAAACTAAAAWKRAATKGACGRGGA </p>	<p> AAAGGGTAAATWATTCTGACTTCGATTTCGACTCAG TCCGAATACAACCTGCGCCGCCATCATACCGA TGCCGAGGGCCGCTACCGTGCCTCCATCGTGC CGTCCGGGTACGGTGCACCCGAGGGCCGACCA CAGGAATGCCTGGACCTGCTCGGCCCCACGGCCA GCGCCCGGCACGCTGCATCTTCATCTGGCAC CTGGGTTCCGCCACCTGACCACGAGATCAACTTT GAAGGSGA </p>	<p><i>Pseudomonas sp.</i></p>
67 C	<p> GSKWKKSSSMRGGCTAMACATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGTCTTGTATTCAG GCGGGGACGGGTGAGYAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCSAAAGGA ACGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTGCGCTATCAGAT GAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAATGGCTACCAAGGGCAGCATCCGTAAC TGTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAATGAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAG TGGGGAATATTGGACAATGGGGCAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTC CGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGTCTTTGACGTT ACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGAAGC GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCC CCGGGCTCAACCTGGGAATGCATCCAAAACGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGA ATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACACC TGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG CCACCGCTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTGTGGCGCAGCTAACGCAT TAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGGCCCAAGGTTAAACTMAAATGRATKRCRAGGA </p>	<p> AARRGGTGTATTCTGACTTCGATTTCGACTCAG TCCGAATACAACCTGCGCCGCCATCATACCGA TGCCGAGGGCCGCTACCGTGCCTCCATCGTGC CGTCCGGGTACGGTGCACCCGAGGGCCGACCA CAGGAATGCCTGGACCTGCTCGGCCCCACGGCCA GCGCCCGGCACGCTGCATCTTCATCTGGCAC CTGGGTTCCGCCACCTGACCACGAGATCAACTTT GAAGGCGA </p>	<p><i>Pseudomonas sp</i></p>
67 F	<p> GSYWKKKSGSMRGGCTTAMCATGCAAGTCGAGCGGAGAGAGGTAGCTTGTACTGATCTTAG CGGGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATTTGAAAGGAA TGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACTTGCCTAATAGATG AGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCATCAAGGGCAGCATCTGTAGCGGGT CTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAG TGGGGAATATTGGACAATGGGGCAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCT ATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGACTTTAGTTAATACCTAGAGATAGTGGGCTT TACTTCGACAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGAAG CGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCC CCGAGCTTAACCTGGGAATTGCATTCGATACTGGTTAGCTAGAGTGTGGGAGAGGATGGTAGAA </p>	<p> AMAAGTGGGAGGGGGCGTAGYTGGCGATCTTGA TCGACTCATCCGAATACCTGCGCCGCCATCAT CACCGATGCCRACGGTTCGTAACCTGCGCGCTCCA TCGTCCGTCGGGGTACGGTGCACCCGARGGC CCGACCCASGAATGCCTGGACCTGCTCGGCCGCCA CGGCCAGCGCCCGGCACGCTGCATCTTCATCT CGGCACCTGGGTTCCGCCACCTGACCACRAGATC AACTTTGAAGGCGA </p>	<p><i>Acinetobacter calcoaceticus</i></p>

	TTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCTAACACTGACCGTGAAGGTGCGAAAGCAATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGGCCGTAACGATGCTACTAGCCGTGGGGCCCTTGGAGGCTTAGTGCGCAGCTAACCGCATAGTAGACCCGCTKGGGAGTMCCTCGCAARACTAACTCAAARTGAATKGTACGGGA		
155 A	GSKGRKSSGSRGGCTAMCATGCAAGTCGRGCGGTAACAGGAGAAAGCTTGCTTTCCTGCTGACGAGCGCGGACGGGTAGTAATGTATGGGGATCTGCCCGATAGAGGGGATAACTACTGGAAA CGGTGGCTAATACCGCATGACGTCTACGGACCAAAGCAGGGGCTTTCGGACCTTGCGCTATCGGATGAACCCATATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAAAGGCTACCTAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATACGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCA GCAGTGGGAATATTGCACAAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAAGAGCCTTAGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTAAGATTAACTCTTAGCAATTG ACGTTACCCGACAGAAGAAGCAGCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGC AAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCTAAAGCGCACGCGGTAATTAAGTCAGATGTGAAA GCCCGGAGCTTAACTTGGAATTGCATCTGAAACTGGTTGGCTAGAGTCTGTAGAGGGGGTA GAATTCACGTGTAGCGGTGAAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGTGGCGAAAGCGGCC CCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTG GTAGTCCACGCTGTAACAGATGTCGATTTAGAGGTTGTGGTCTGTAACCGTGTCTGGAGCTAA CGCGTTAATCGACCCGCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAAWKRAATTGRCG GGGAA	ACCTTCTTGCGGGGAAGTMTTATTCGCTTTCGATTCGACTCAGTCCGAATACAACCTGGCCGCGCATCATCACCAGTCCGAGGGGCTACCGTGCAGCCGCTCCATCGTGCCGTCGGGTACGGCTGCGACCCGAGGGCCGACCCAGGAATGCCTGGACTGCTCGGCCGCCACGGCCAGCGCCGCGCACGCTGCACTTCTCATCTCGGCACCTGGGTTCGCCACCTGACCACGCAGATCAACTTTGAAGCGCA	<i>Proteus penneri</i>
155 C	GSRRRKSSGSMRGGCTACAMATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCTTGATTACGCGCGGACGGGTAGTAATGCCTAGGAACTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGG AACGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACTTTCGGCCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTGCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAATG GTCGAGAGGATGATCAGTACACTGGAATGAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCA GTGGGAAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCT TCGGATTGTAAAGCACTTAAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGT TACCGACAGAATAAGCAGCGCTAACTTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGAAGC GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGAATGTGAAAGCCC CGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAA TTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCCT GGACTGATACTACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAG TCCACGCCGTAACAGATGTRRACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGC ATTAAGTTGACCCGCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAAWKGAATTGMCSTRGA	CASGGGTAAATATTCGTACTTCGATTCGACTCAGTCCGAATACAACCTGCGCCCGCATCATCACCAGTCCGAGGGCGCTACCGTGCAGCCGCTCCAATCGTGCCGTCGGGTACGGCTGCGACCCGAGGGCCGACCCAGGAATGCCTGGACTGCTCGGCCGCCACGGCCAGCGCCGGCGCAGCTGCACTTCTCATCTCGGCACCTGGGTTCGCCACCTGACCACGCAGATCAACTTTGAAGCGCA	<i>Pseudomonas putida</i>
155 I	ASRYKKSGGGMRGGCTAAMAMATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCTTGATTCAGCGCGGACGGGTAGTAATGCCTAGGAACTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAG GAACGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACTTTCGGCCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTGCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAAC GGTCTGAGAGGATGATCAGTACACTGGAATGAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCGAGC AGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTC TTCGGATTGTAAAGCACTTAAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACG TTACCGACAGAATAAGCAGCGCTAACTTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAGC GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGAATGTGAAAGCC CCGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAA ATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACC TGGACTGATCTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTA GTCCACGCCGTAACAGATGTAACCTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTAGTGGCGCAGCTAAC GCATTAAGTTGACCCGCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAARTGRAATTGACM GMGGAA	ARGGGGTACTTATTCGTACTTCGATTCGACTCAGTCCGAATACAACCTGCGCCCGCATCATCACCAGTCCGAGGGCGCTACCGTGCAGCCGCTCCAATCGTGCCTGGGTACGGCTGCGACCCGAGGGCCGACCCAGGAATGCTGGACTGCTCGGCCGCCACGGCCAGCGCCCGCGCAGCTGCACTTCTCATCTCGGCACCTGGGTTCGCCACCTGACCACGCAGATCAACTTTGAAGGSGA	<i>Pseudomonas flavescens</i>
155 E	GMMRWSSGGRRGGSTTAAMMATGCAAGCCGAGGGGTATAGTCTTTCGGGAACTAGAGACCGCGCACCGGTGCGTAACCGGTATGCAACTTGCCCTACTGAAAAGGATAGCCCTTCGAAAGGAGGAT TAATACTTTAATAACAGATTTAATGGCATATTAGATTTTGAAGATTTATCGCAGTAGGATAGGC ATGCGTAAGATTAGTTAGTTGGTAGGTAACGGCTACCAAGACGATGATCTTTAGGGGGCTG AGAGGGTGAACCCACACTGCTACTGAGACACGGACAGACTCCACGGGAGGCGAGCAGTGA GGAATATTGGACAATGGGTGGAAGCCTGATCCAGCCATCCCGCTGTAGGATGACGGCCTTAG GGTTGTAAACTACTTTTATCTGGGGATAAACCCTTACTGTGTAAGTAGCTGAAGGTACCAGAAG AATAAGCAGCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTATCCGG ATTTATGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGCGGATTAATCAGTCAAGTGGTGAATCTCATAGCTTAA TATGAAACTGCCATTGATCTGTAGTCTGAGTGTGTTGAAGTTGCTGGAATGTGTAGTGTAG CGGTGAAATGCTTAGATATTACGAGAACCAATTGCGAAGGCAGGTGACTAAACATTAAGT ACGCTGATGGAGGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACCGCTAA CGATGGATACTGTGTGGGCTTTCGGRCTCAGTGGCTAAGCGAAAGTTAAGATATCCACCT GGGAGTACGTTCCAGAAATGAAACTCAAANKRAATTGACSGGA	CGKTYGWTMCTTAKWCGTACTTCGATTCGACTCAGTCCGAATRCRACCTGCGCCGCGCATCATCACCAGTCCGAGGGCGCTACCGTGCAGCCGCTCCAATCGTGCCTGGGTACGGCTGCGACCCGAGGGCCGACCCAGGAATGCTGGACTGCTCGGCCGCCACGGCCAGCGCCGGCGCAGCTGCACTTCTCATCTCGGCACTGGGTTCGCCACCTGACCACGCAGATCAACTTTGAAGGCGA	<i>Wautersiellafals enii</i>
102 A	ARKKGSSSGSMRGGCTAAMCATGCAAGTCGAGCGGAGAGGAGGTAGTCTGCTACTGATCTTAGCGCGGACGGGTAGTAATGCCTAGGAACTGCCTTAGTGGGGGACAACATTTTCGAAAGGAAAT GCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTAATAGATGA GCCTAAGTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGT TGAGAGGATGATCCGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGT	Não amplificou	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

	GGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACITTAAGCGAGGAGGAGGCCTTATTTAGTTAATACCTAGAGATAGTGGACGTACTCGCAGAAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCAGAGCTTAACTGGGAATGCAITCGATACTGGTTAGCTAGAGTGTGGGAGAGGATGGTAGAATTCAGGTTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCATGCCGTAAACGATGTCCTACTAGCCGTGGGGCCTTTGAGCTTTAGTGGCGCAGCTACGCGATAGTAGACCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAACTCAAAAAGAAATGRCMSMGRGRGA		
05 A	GSYYGKKKSSGSMGGCTWAAMCATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTGAGCGGGGACGGGTGAGTWTGCCTAGGAACTGCTGCTGGTAGTGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGCGACGATCCGTAACGGTCTGAGAGGATGATCAGTACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCCTCGGATTGTAAAGCACITTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCCTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCGGCTAACCTGGGAACGATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCAGCACCTGGACTGACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGCAACTAGCCGTGGAAATCCTTGAGATTTAGTGGCGCAGCTAACGATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAAATTKGACRG	AARRRGGGTAATWATTCGTACTTCGATTTCGACTCATGTCGAATACAACCTGCGCCCGCATCACCGATGCCGAGGGCGCTACCGTGCCTCCATCGTGCCGTGGGTACGGTGCACCCGAGGGCCGACCCAGGAATGCCTGGACTGCTCGGCCGCCAGGCCAGCGCCGGCGCACGTGACTTTCATCTCGGCACTGGGTTCGCCACCTGACCACGCAGATCAACTTGAAGGSGA	<i>Pseudomonas monteilii</i>

Elaboração: a autora (2015)

APÊNDICE F - Cálculo no Logaritmo Neperiano (LN) em Excel e cálculo da média final das diluições em UFC (Unidade Formadora de Colônia)

Para chegar ao cálculo LN, para Densidade Ótica, foram somadas as três repetições e tirada as médias e aplicado em seguida o cálculo de LN (=LN (média)) para confecção do gráfico. Para Unidade Formadora de colônia foram somadas as repetições e tiradas as médias (\bar{x}), multiplicado quantas vezes foi feita a diluição (n) multiplicado novamente pelo volume da microgota (10 μ l).

Fórmula:

$$\bar{x}_{\text{Final}} = \bar{x} \cdot 10^{-n} \times 10^{-1}$$

Onde:

\bar{x}_{Final} - média final obtida

\bar{x} - soma das triplicatas

10⁻¹ - volume da microgota

Ex:

$$\begin{aligned}\bar{x}_{\text{Final}} &= 3,8 \times 10^{-3} \times 10^{-1} \\ &= 3,8 \times 10^{-4} = 38000\end{aligned}$$

Na planilha do Excel, foi selecionado a coluna de tempo (que corresponde ao T2-T6) e coluna do LN (coeficiente Neperiano pela média), onde foi escolhido o tipo de gráfico de Dispersão (XY) com pontos de dados conectados por linhas suaves sem marcadores. Nos pontos do gráfico foi adicionada linha de tendência exibindo equação no gráfico e o valor de R-quadrado no gráfico. Fórmula:

$$Y = ax + b, \text{ chegamos ao coeficiente linear (a)}$$

APÊNDICE G - Cálculo para Determinação do Teor de umidade em sedimento (EMBRAPA)

Amostra seca = (PESA FILTRO – AMOSTRA SECA)

Umidade = AMOSTRA SECA/AMOSTRA ÚMIDA

Fator de umidade = (100-UMIDADE)/100

AMOSTRA	PESA FILTRO	AMOSTRA ÚMIDA	PESA FILTRO + AMOSTRA SECA	AMOSTRA SECA	UMIDADE
1.1	62,1152	0,5750	62,4637	0,3485	0,6499283
1.2	31,5785	0,5357	31,8892	0,3107	0,7241712
1.3	29,7036	0,5417	30,0227	0,3191	0,697587

Elaboração: a autora

APÊNDICE H - Cálculo da solução de hidróxido de potássio (KOH) com massa final de 16,8 gramas para 100 ml de solução, correspondente a 3 mol/L

Dados:

$$K=39 \quad O=16 \quad h=1$$

$$MM \text{ (KOH)} = 39 + 16 + 1 = 56 \text{ g/mol}$$

$$M = 3 \text{ mol/L}$$

$$V = 100 \text{ mL} = 0,1 \text{ L}$$

Usando a fórmula:

$$M = m_1 \div (MM \times V)$$

$$3 = m_1 \div (56 \times 0,1)$$

$$3 = m_1 \div 5,6$$

$$m_1 = \mathbf{16,8 \text{ gramas de KOH}}$$

APÊNDICE DAS TABELA

TABELA 1-CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS EM XILENO, onde o logaritmo leperiano (LN) ou logaritmo natural de um número (=ln(média))

D.O. CEPA 128 A XILENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln
0	T0	0,025	0,015	0,013	0,053	0,0177	0	T0	0,0177	-4,03608
1	T2	0,029	0,047	0,044	0,12	0,0400	1	T2	0,0400	-3,21888
2	T4	0,062	0,064	0,065	0,191	0,0637	2	T4	0,0637	-2,75409
3	T5	0,097	0,072	0,071	0,24	0,0800	3	T5	0,0800	-2,52573
4	T6	0,131	0,135	0,118	0,384	0,1280	4	T6	0,1280	-2,05573
5	T7	0,075	0,069	0,093	0,237	0,0790	5	T7	0,0790	-2,53831
6	T8	0,061	0,065	0,083	0,209	0,0697	6	T8	0,0697	-2,66403
7	T10	0,049	0,047	0,062	0,158	0,0527	7	T10	0,0527	-2,94377
8	T12	0,028	0,021	0,034	0,083	0,0277	8	T12	0,0277	-3,58753

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO(UFC) CEPA 128 A XILENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln
0	T0	4	4	3,7	11,7	3,9	0	T0	39000	10,57132
1	T2	4	4,7	4	12,7	4,2	1	T2	42000	10,64542
2	T4	7,7	7	6	20,7	6,9	2	T4	69000	11,14186
3	T5	9	11	10	30	10,0	3	T5	100000	11,51293
4	T6	12,7	13,3	12,3	38,3	12,8	4	T6	128000	11,75979
5	T7	9	9	9	27	9,0	5	T7	90000	11,40756
6	T8	7,7	7,3	6,7	21,7	7,2	6	T8	72000	11,18442
7	T10	4	4	4	12	4,0	7	T10	40000	10,59663
8	T12	2,3	2,7	3	8	2,7	8	T12	27000	10,20359

D.O. CEPA 128 A XILENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln
0	T0	0,045	0,027	0,025	0,097	0,032333	0	T0	0,0323	-3,43166
1	T2	0,038	0,043	0,029	0,11	0,036667	1	T2	0,0367	-3,30589
2	T4	0,052	0,055	0,037	0,144	0,048	2	T4	0,0480	-3,03655
3	T5	0,062	0,065	0,061	0,188	0,062667	3	T5	0,0627	-2,76993
4	T6	0,143	0,133	0,041	0,317	0,105667	4	T6	0,1057	-2,24747
5	T7	0,077	0,074	0,081	0,232	0,077333	5	T7	0,0773	-2,55963
6	T8	0,063	0,066	0,055	0,184	0,061333	6	T8	0,0613	-2,79143
7	T10	0,042	0,043	0,044	0,129	0,043	7	T10	0,0430	-3,14656
8	T12	0,022	0,033	0,021	0,076	0,025333	8	T12	0,0253	-3,67563

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO(UFC) CEPA 128 B XILENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln
0	T0	3	3	4	10	3,3	0	T0	33000	10,40426
1	T2	4,7	3,7	3,3	11,7	3,9	1	T2	39000	10,57132
2	T4	7	7,3	7	21,3	7,1	2	T4	71000	11,17044
3	T5	9,3	9,7	10,7	29,7	9,9	3	T5	99000	11,50288
4	T6	11,3	11	10,7	33	11,0	4	T6	110000	11,60824
5	T7	8,3	8	8	24,3	8,1	5	T7	81000	11,3022
6	T8	5,7	5	6	16,7	5,6	6	T8	56000	10,93311
7	T10	3,7	4	3,7	11,4	3,8	7	T10	38000	10,54534
8	T12	3,3	3,3	3	9,6	3,2	8	T12	32000	10,37349

D.O. CEPA 67 F XILENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0	0,011	0,079	0,051	0,141	0,047		0	T0	0,047	-3,05761
1	T2	0,082	0,029	0,011	0,122	0,041		1	T2	0,041	-3,20235
2	T4	0,041	0,058	0,047	0,146	0,049		2	T4	0,049	-3,02276
3	T5	0,051	0,063	0,054	0,168	0,056		3	T5	0,056	-2,8824
4	T6	0,13	0,114	0,118	0,362	0,121		4	T6	0,121	-2,11472
5	T7	0,105	0,091	0,101	0,297	0,099		5	T7	0,099	-2,31264
6	T8	0,081	0,088	0,089	0,258	0,086		6	T8	0,086	-2,45341
7	T10	0,041	0,056	0,043	0,14	0,047		7	T10	0,047	-3,06473
8	T12	0,027	0,031	0,036	0,094	0,031		8	T12	0,031	-3,46307

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO(UFC) CEPA 67 F XILENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0	3,7	5	4,7	13,4	4,5		0	T0	45000	10,71442
1	T2	4	4,7	5	13,7	4,6		1	T2	46000	10,7364
2	T4	9,7	9,3	10	29	9,7		2	T4	97000	11,48247
3	T5	10,7	11,3	11,3	33,3	11,1		3	T5	111000	11,61729
4	T6	14,7	12,7	13,7	41,1	13,7		4	T6	137000	11,82774
5	T7	9	6,3	5	20,3	6,8		5	T7	68000	11,12726
6	T8	6	5,7	6	17,7	5,9		6	T8	59000	10,98529
7	T10	5	4,3	4,7	14	4,7		7	T10	47000	10,7579
8	T12	4	3,3	3,3	10,6	3,5		8	T12	35000	10,4631

D.O. CEPA 155 C XILENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0	0,014	0,029	0,03	0,073	0,024333		0	T0	0,0243	-3,71591
1	T2	0,026	0,029	0,023	0,078	0,026		1	T2	0,0260	-3,64966
2	T4	0,041	0,029	0,026	0,096	0,032		2	T4	0,0320	-3,44202
3	T5	0,051	0,048	0,055	0,154	0,051333		3	T5	0,0513	-2,96941
4	T6	0,154	0,056	0,107	0,317	0,105667		4	T6	0,1057	-2,24747
5	T7	0,107	0,153	0,085	0,345	0,115		5	T7	0,1150	-2,16282
6	T8	0,089	0,12	0,081	0,29	0,096667		6	T8	0,0967	-2,33649
7	T10	0,063	0,089	0,061	0,213	0,071		7	T10	0,0710	-2,64508
8	T12	0,033	0,036	0,039	0,108	0,036		8	T12	0,0360	-3,32424

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO (UFC) CEPA 155 C XILENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0	3,7	3	3,3	10	3,3		0	T0	33000	10,40426
1	T2	4	3,7	3,3	11	3,7		1	T2	37000	10,51867
2	T4	5,3	5	5	15,3	5,1		2	T4	51000	10,83958
3	T5	10,7	12	11	33,7	11,2		3	T5	112000	11,62625
4	T6	14,3	13,3	13	40,6	13,5		4	T6	135000	11,81303
5	T7	10	11	10	31	10,3		5	T7	103000	11,54248
6	T8	8	8,3	7,7	24	8,0		6	T8	80000	11,28978
7	T10	6	5,7	7	18,7	6,2		7	T10	62000	11,03489
8	T12	3,3	3,7	5	12	4,0		8	T12	40000	10,59663

D.O. CEPA 155 I XILENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0	0,066	0,054	0,065	0,185	0,0617		0	T0	0,0617	-2,78601
1	T2	0,069	0,069	0,063	0,201	0,0670		1	T2	0,0670	-2,70306
2	T4	0,074	0,089	0,079	0,242	0,0807		2	T4	0,0807	-2,51743
3	T5	0,076	0,091	0,084	0,251	0,0837		3	T5	0,0837	-2,48091
4	T6	0,127	0,136	0,108	0,371	0,1237		4	T6	0,1237	-2,09017
5	T7	0,096	0,097	0,094	0,287	0,0957		5	T7	0,0957	-2,34689
6	T8	0,065	0,077	0,073	0,215	0,0717		6	T8	0,0717	-2,63573
7	T10	0,043	0,037	0,055	0,135	0,0450		7	T10	0,0450	-3,10109
8	T12	0,047	0,031	0,041	0,119	0,0397		8	T12	0,0397	-3,22724

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO (UFC)CEPA 155 I XILENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln
0	T0	6,7	6	4	16,7	5,6	0	T0	56000	10,93311
1	T2	8,7	8,7	4,7	22,1	7,4	1	T2	74000	11,21182
2	T4	12,6	12	2	26,6	8,9	2	T4	99000	11,50288
3	T5	12	13,3	6,3	31,6	10,5	3	T5	105000	11,56172
4	T6	15	11,6	14	40,6	13,5	4	T6	135000	11,81303
5	T7	12	12,3	3,7	28	9,3	5	T7	93000	11,44035
6	T8	11	5	9	25	8,3	6	T8	83000	11,3266
7	T10	10	5	7	22	7,3	7	T10	73000	11,19821
8	T12	9	5	5,7	19,7	6,6	8	T12	66000	11,09741

D.O. CEPA 155 I XILENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln
0	T0	0,057	0,077	0,063	0,197	0,066	0	T0	0,066	-2,72316
1	T2	0,105	0,078	0,077	0,26	0,087	1	T2	0,087	-2,44569
2	T4	0,106	0,089	0,085	0,28	0,093	2	T4	0,093	-2,37158
3	T5	0,124	0,132	0,124	0,38	0,127	3	T5	0,127	-2,0662
4	T6	0,272	0,175	0,228	0,675	0,225	4	T6	0,225	-1,49165
5	T7	0,202	0,16	0,145	0,507	0,169	5	T7	0,169	-1,77786
6	T8	0,111	0,143	0,113	0,367	0,122	6	T8	0,122	-2,10101
7	T10	0,082	0,108	0,069	0,259	0,086	7	T10	0,086	-2,44954
8	T12	0,077	0,092	0,053	0,222	0,074	8	T12	0,074	-2,60369

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO (UFC) CEPA 155 I XILENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln
0	T0	5	6,3	3,3	14,6	4,9	0	T0	49000	10,79958
1	T2	6	8	4	18	6,0	1	T2	60000	11,0021
2	T4	10,3	9	9,3	28,6	9,5	2	T4	95000	11,46163
3	T5	14,7	13,7	13	41,4	13,8	3	T5	138000	11,83501
4	T6	15,3	16	14,3	45,6	15,2	4	T6	152000	11,93164
5	T7	12,7	11	12	35,7	11,9	5	T7	119000	11,68688
6	T8	15,3	4	9	28,3	9,4	6	T8	94000	11,45105
7	T10	10	9	8	27	9,0	7	T10	90000	11,40756
8	T12	5,6	6,3	7,7	19,6	6,5	8	T12	65000	11,08214

TABELA 2 – CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS EM BENZENO, onde o logaritmo leperiano (LN) ou logaritmo natural de um número (=ln(média))

D.O. CEPA 128 A benzeno										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	LN
0	T0	0,025	0,024	0,031	0,08	0,026667	1	T0	0,036	-3,62434
1	T2	0,031	0,052	0,047	0,13	0,043333	2	T2	0,039	-3,13883
2	T4	0,036	0,044	0,066	0,146	0,048667	3	T4	0,049	-3,02276
3	T5	0,085	0,064	0,05	0,199	0,066333	4	T5	0,069	-2,71306
4	T6	0,185	0,147	0,123	0,455	0,151667	5	T6	0,152	-1,88607
5	T7	0,125	0,128	0,112	0,365	0,121667	6	T7	0,122	-2,10647
6	T8	0,121	0,123	0,101	0,345	0,115	7	T8	0,115	-2,16282
7	T10	0,109	0,099	0,087	0,295	0,098333	8	T10	0,098	-2,31939
8	T12	0,102	0,065	0,054	0,221	0,073667	9	T12	0,074	-2,6082

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 128 A benzeno											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	UFC	ln	
0	T0		5	5,3	4,3	14,6	4,866667	1	T0	48000	10,77896
1	T2		7,3	9	10	26,3	8,766667	2	T2	54000	10,89674
2	T4		9,3	9,6	8,3	27,2	9,066667	3	T4	90000	11,40756
3	T5		15,3	14,8	15	45,1	15,03333	4	T5	150000	11,91839
4	T6		18	16,6	18	52,6	17,53333	5	T6	175000	12,07254
5	T7		11	12,3	12,6	35,9	11,96667	6	T7	119000	11,68688
6	T8		7	6,7	7,6	21,3	7,1	7	T8	71000	11,17044
7	T10		4	3,1	3	10,1	3,366667	8	T10	33000	10,40426
8	T12		3	3,3	4	10,3	3,433333	9	T12	34000	10,43412

D.O. CEPA 128 B benzeno											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0		0,013	0,017	0,019	0,049	0,016	0	T0	0,016	-4,11455
1	T2		0,027	0,035	0,014	0,076	0,025	1	T2	0,075	-2,58583
2	T4		0,071	0,056	0,023	0,15	0,050	2	T4	0,116	-2,15417
3	T5		0,169	0,095	0,099	0,363	0,121	3	T5	0,121	-2,11196
4	T6		0,263	0,172	0,197	0,632	0,211	4	T6	0,211	-1,55748
5	T7		0,166	0,169	0,167	0,502	0,167	5	T7	0,167	-1,78777
6	T8		0,128	0,111	0,116	0,355	0,118	6	T8	0,118	-2,13425
7	T10		0,097	0,088	0,088	0,273	0,091	7	T10	0,091	-2,3969
8	T12		0,089	0,071	0,074	0,234	0,078	8	T12	0,078	-2,55105

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 128 B benzeno											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	UFC	ln	
0	T0		8	7	6	21,0	7,0	0	T0	70000	11,15625
1	T2		7,2	7,3	7,1	21,6	7,2	1	T2	72000	11,18442
2	T4		8,7	8	7	23,7	7,9	2	T4	79000	11,2772
3	T5		15,3	14,7	14,3	44,3	14,8	3	T5	148000	11,90497
4	T6		17	16	17	50,0	16,7	4	T6	167000	12,02575
5	T7		10	12	10	32,0	10,7	5	T7	107000	11,58058
6	T8		7	8	8	23,0	7,7	6	T8	77000	11,25156
7	T10		6,3	6	6	18,3	6,1	7	T10	61000	11,01863
8	T12		5	7	6	18,0	6,0	8	T12	60000	11,0021

D.O. CEPA 67 F BENZENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0		0,019	0,021	0,023	0,063	0,0210	0	T0	0,017667	-3,86323
1	T2		0,041	0,036	0,037	0,114	0,0380	1	T2	0,019667	-3,27017
2	T4		0,075	0,072	0,086	0,233	0,0777	2	T4	0,047667	-2,55533
3	T5		0,134	0,143	0,109	0,386	0,1287	3	T5	0,105	-2,05053
4	T6		0,141	0,151	0,117	0,409	0,1363	4	T6	0,153	-1,99265
5	T7		0,159	0,133	0,125	0,417	0,1390	5	T7	0,139	-1,97328
6	T8		0,134	0,181	0,111	0,426	0,1420	6	T8	0,142	-1,95193
7	T10		0,086	0,064	0,067	0,217	0,0723	7	T10	0,072333	-2,62647
8	T12		0,032	0,043	0,045	0,12	0,0400	8	T12	0,04	-3,21888

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 67 F benzeno											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	UFC	ln	
0	T0		3	4	4	11	3,7	0	T0	37000	10,51867
1	T2		4	4,3	4,3	12,6	4,2	1	T2	42000	10,64542
2	T4		13	12	13	38	12,7	2	T4	127000	11,75194
3	T5		14,7	14,7	15,3	44,7	14,9	3	T5	149000	11,9117
4	T6		17	17	17	51	17,0	4	T6	170000	12,04355
5	T7		10	11	9	30	10,0	5	T7	100000	11,51293
6	T8		9,3	10	8,7	28	9,3	6	T8	93000	11,44035
7	T10		5	6,6	4,6	16,2	5,4	7	T10	54000	10,89674
8	T12		4	3	5	12	4,0	8	T12	40000	10,59663

D.O. CEPA 155 C											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0	0,011	0,019	0,012	0,042	0,014		1	T0	0,012667	-4,2687
1	T2	0,018	0,032	0,015	0,065	0,021667		2	T2	0,014333	-3,83198
2	T4	0,024	0,051	0,044	0,119	0,039667		3	T4	0,049667	-3,22724
3	T5	0,043	0,068	0,047	0,158	0,052667		4	T5	0,052667	-2,94377
4	T6	0,16	0,135	0,106	0,401	0,133667		5	T6	0,133667	-2,01241
5	T7	0,128	0,127	0,094	0,349	0,116333		6	T7	0,116333	-2,1513
6	T8	0,121	0,125	0,078	0,324	0,108		7	T8	0,108	-2,22562
7	T10	0,083	0,098	0,063	0,244	0,081333		8	T10	0,081333	-2,5092
8	T12	0,057	0,064	0,042	0,163	0,054333		9	T12	0,054333	-2,91262

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 155 C benzeno												
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA	LN		TEMPO	UFC	ln	
0	T0	3	3,3	4	10,3	3,4	1,233532		1	T0	34000	10,43412
1	T2	4	4	3,3	11,3	3,8	1,32619		2	T2	38000	10,54534
2	T4	6	6,3	6,7	19	6,3	1,845827		3	T4	63000	11,05089
3	T5	16	17,3	17,7	51	17,0	2,833213		4	T5	170000	12,04355
4	T6	18,5	18,7	19	56,2	18,7	2,930304		5	T6	187000	12,13886
5	T7	12	13	14	39	13,0	2,564949		6	T7	130000	11,77529
6	T8	9	9	8	26	8,7	2,159484		7	T8	87000	11,37366
7	T10	4	6	6	16	5,3	1,673976		8	T10	53000	10,87805
8	T12	3,3	4	5	12,3	4,1	1,410987		9	T12	41000	10,62133

D.O. CEPA 155 I											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0	0,015	0,029	0,051	0,095	0,031667		1	T0	0,031667	-3,45249
1	T2	0,031	0,062	0,014	0,107	0,035667		2	T2	0,035667	-3,33354
2	T4	0,071	0,074	0,038	0,183	0,061		3	T4	0,061	-2,79688
3	T5	0,095	0,085	0,084	0,264	0,088		4	T5	0,088	-2,43042
4	T6	0,127	0,135	0,089	0,351	0,117		5	T6	0,117	-2,14558
5	T7	0,108	0,111	0,088	0,307	0,102333		6	T7	0,102333	-2,27952
6	T8	0,112	0,113	0,074	0,299	0,099667		7	T8	0,099667	-2,30592
7	T10	0,098	0,099	0,057	0,254	0,084667		8	T10	0,084667	-2,46903
8	T12	0,076	0,065	0,043	0,184	0,061333		9	T12	0,061333	-2,79143

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 155I benzeno											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	UFC	ln	
0	T0	4	3,3	4	11,3	3,8		0	T0	38000	10,54534
1	T2	5	6,6	6	17,6	5,9		1	T2	59000	10,98529
2	T4	14	13	14	41	13,7		2	T4	137000	11,82774
3	T5	18,3	16,8	18,3	53,4	17,8		3	T5	178000	12,08954
4	T6	23	20,6	21,6	65,2	21,7		4	T6	200000	12,20607
5	T7	10	11	9,3	30,3	10,1		5	T7	101000	11,52288
6	T8	8	9	9	26	8,7		6	T8	87000	11,37366
7	T10	5	5	4	14	4,7		7	T10	47000	10,7579
8	T12	3,3	4	3,6	10,9	3,6		8	T12	36000	10,49127

D.O. CEPA 05 A											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0	0,063	0,051	0,05	0,164	0,055		1	T0	0,055	-2,9065
1	T2	0,052	0,055	0,058	0,165	0,055		2	T2	0,055	-2,90042
2	T4	0,084	0,072	0,075	0,231	0,077		3	T4	0,077	-2,56395
3	T5	0,123	0,114	0,085	0,322	0,107		4	T5	0,107	-2,23182
4	T6	0,187	0,115	0,112	0,414	0,138		5	T6	0,138	-1,9805
5	T7	0,151	0,079	0,087	0,317	0,106		6	T7	0,106	-2,24747
6	T8	0,069	0,062	0,077	0,208	0,069		7	T8	0,069	-2,66883
7	T10	0,055	0,043	0,055	0,153	0,051		8	T10	0,051	-2,97593
8	T12	0,033	0,026	0,04	0,099	0,033		9	T12	0,033	-3,41125

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 05 A benzeno										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	UFC	ln
0	T0	6	5	4,3	15,3	5,1	1	T0	51000	10,83958
1	T2	7,3	6,7	5,3	19,3	6,4	2	T2	64000	11,06664
2	T4	10,7	9	9	28,7	9,6	3	T4	96000	11,4721
3	T5	17,7	13,6	13,3	44,6	14,9	4	T5	149000	11,9117
4	T6	15,7	15,3	14,3	45,3	15,1	5	T6	151000	11,92504
5	T7	12	12	10	34	11,3	6	T7	113000	11,63514
6	T8	9	10,3	8	27,3	9,1	7	T8	91000	11,41861
7	T10	7,3	7	7,3	21,6	7,2	8	T10	72000	11,18442
8	T12	5,7	3	4,3	13	4,3	9	T12	43000	10,66896

TABELA 3 – DADOS DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS EM TOLUENO, onde o logaritmo leperiano (LN) ou logaritmo natural de um número (=ln(média))

D.O. CEPA 128 A TOLUENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln
0	T0	0,107	0,121	0,098	0,326	0,109	0	T0	0,109	-2,21947
1	T2	0,114	0,117	0,125	0,356	0,119	1	T2	0,119	-2,13144
2	T4	0,141	0,151	0,165	0,457	0,152	2	T4	0,152	-1,88168
3	T5	0,193	0,224	0,199	0,616	0,205	3	T5	0,205	-1,58312
4	T6	0,277	0,254	0,291	0,822	0,274	4	T6	0,274	-1,29463
5	T7	0,173	0,185	0,155	0,513	0,171	5	T7	0,171	-1,76609
6	T8	0,108	0,111	0,102	0,321	0,107	6	T8	0,107	-2,23493
7	T10	0,083	0,071	0,063	0,217	0,072	7	T10	0,072	-2,62647
8	T12	0,051	0,033	0,041	0,125	0,042	8	T12	0,042	-3,17805

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 128 A TOLUENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln
0	T0	4	4	4	12	4,0	0	T0	40000	10,59663
1	T2	4,7	5	4,3	14	4,7	1	T2	47000	10,7579
2	T4	8	7,7	7,7	23,4	7,8	2	T4	78000	11,26446
3	T5	9,3	10	10	29,3	9,8	3	T5	98000	11,49272
4	T6	10,7	11,3	11,3	33,3	11,1	4	T6	111000	11,61729
5	T7	11	11,7	10	32,7	10,9	5	T7	109000	11,5991
6	T8	10,3	10	6,3	26,6	8,9	6	T8	89000	11,39639
7	T10	7,7	7,3	5	20	6,7	7	T10	67000	11,11245
8	T12	5	6	4	15	5,0	8	T12	50000	10,81978

D.O. CEPA 128 B TOLUENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln
0	T0	0,061	0,041	0,043	0,145	0,048	0	T0	0,048	-3,02963
1	T2	0,107	0,119	0,106	0,332	0,111	1	T2	0,111	-2,20123
2	T4	0,171	0,148	0,162	0,481	0,160	2	T4	0,160	-1,8305
3	T5	0,191	0,155	0,181	0,527	0,176	3	T5	0,176	-1,73917
4	T6	0,255	0,256	0,251	0,762	0,254	4	T6	0,254	-1,37042
5	T7	0,207	0,208	0,198	0,613	0,204	5	T7	0,204	-1,588
6	T8	0,201	0,173	0,193	0,567	0,189	6	T8	0,189	-1,66601
7	T10	0,181	0,143	0,175	0,499	0,166	7	T10	0,166	-1,79376
8	T12	0,103	0,093	0,099	0,295	0,098	8	T12	0,098	-2,31939

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 128 B TOLUENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	
0	T0		4	4	4,3	12,3	4,1	0	T0	41000 10,62133
1	T2		4,3	4,3	5,3	13,9	4,6	1	T2	46000 10,7364
2	T4		6,7	6,7	6	19,4	6,5	2	T4	65000 11,08214
3	T5		8,3	8,3	8	24,6	8,2	3	T5	82000 11,31447
4	T6		10	10,3	10	30,3	10,1	4	T6	101000 11,52288
5	T7		8	9	9	26	8,7	5	T7	87000 11,37366
6	T8		8	7	7,7	22,7	7,6	6	T8	76000 11,23849
7	T10		5,3	5,5	6,3	17,1	5,7	7	T10	57000 10,95081
8	T12		4,3	4	5,7	14	4,7	8	T12	47000 10,7579

D.O. CEPA 67 F TOLUENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	In
0	T0		0,014	0,015	0,012	0,041	0,014	0	T0	0,014 -4,2928
1	T2		0,015	0,006	0,144	0,165	0,055	1	T2	0,055 -2,90042
2	T4		0,115	0,141	0,15	0,406	0,135	2	T4	0,135 -2,00001
3	T5		0,135	0,155	0,153	0,443	0,148	3	T5	0,148 -1,9128
4	T6		0,142	0,131	0,154	0,427	0,142	4	T6	0,142 -1,94958
5	T7		0,123	0,107	0,135	0,365	0,122	5	T7	0,122 -2,10647
6	T8		0,114	0,109	0,123	0,346	0,115	6	T8	0,115 -2,15993
7	T10		0,113	0,104	0,121	0,338	0,113	7	T10	0,113 -2,18332
8	T12		0,099	0,1	0,105	0,304	0,101	8	T12	0,101 -2,28934

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 67 F TOLUENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	In
0	T0		5,7	5,7	6	17,4	5,8	0	T0	58000 10,9682
1	T2		6	6	6,3	18,3	6,1	1	T2	61000 11,01863
2	T4		10	10	10	30	10,0	2	T4	100000 11,51293
3	T5		12,3	12,7	12,7	37,7	12,6	3	T5	126000 11,74404
4	T6		15,3	14,7	14,7	44,7	14,9	4	T6	149000 11,9117
5	T7		10	9	10	29	9,7	5	T7	97000 11,48247
6	T8		8,3	7,7	9	25	8,3	6	T8	83000 11,3266
7	T10		6	6,7	7	19,7	6,6	7	T10	66000 11,09741
8	T12		5,7	5	6	16,7	5,6	8	T12	56000 10,93311

D.O. CEPA 155 C TOLUENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	In
0	T0		0,101	0,059	0,058	0,218	0,073	0	T0	0,073 -2,62187
1	T2		0,134	0,063	0,058	0,255	0,085	1	T2	0,085 -2,4651
2	T4		0,127	0,149	0,0234	0,2994	0,100	2	T4	0,100 -2,30459
3	T5		0,174	0,198	0,197	0,569	0,190	3	T5	0,190 -1,66249
4	T6		0,347	0,214	0,193	0,754	0,251	4	T6	0,251 -1,38098
5	T7		0,269	0,141	0,089	0,499	0,166	5	T7	0,166 -1,79376
6	T8		0,187	0,151	0,077	0,415	0,138	6	T8	0,138 -1,97809
7	T10		0,091	0,093	0,061	0,245	0,082	7	T10	0,082 -2,50511
8	T12		0,031	0,047	0,057	0,135	0,045	8	T12	0,045 -3,10109

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 155 C TOLUENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	In
0	T0		5,7	4,7	5	15,4	5,1	0	T0	51000 10,83958
1	T2		6,3	5,3	5	16,6	5,5	1	T2	55000 10,91509
2	T4		10	10	9,3	29,3	9,8	2	T4	98000 11,49272
3	T5		15,7	15,7	16,3	47,7	15,9	3	T5	159000 11,97666
4	T6		16,7	17,3	16,7	50,7	16,9	4	T6	169000 12,03765
5	T7		11,3	11,7	11	34	11,3	5	T7	113000 11,63514
6	T8		10	7	8	25	8,3	6	T8	83000 11,3266
7	T10		6	6	6,7	18,7	6,2	7	T10	62000 11,03489
8	T12		4,3	4	6	14,3	4,8	8	T12	48000 10,77896

D.O. CEPA 155 TOLUENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln
0	T0	0,026	0,016	0,014	0,056	0,019	0	T0	0,019	-3,98102
1	T2	0,041	0,069	0,074	0,184	0,061	1	T2	0,061	-2,79143
2	T4	0,123	0,117	0,144	0,384	0,128	2	T4	0,128	-2,05573
3	T5	0,155	0,147	0,154	0,456	0,152	3	T5	0,152	-1,88387
4	T6	0,192	0,161	0,233	0,586	0,195	4	T6	0,195	-1,63305
5	T7	0,181	0,111	0,101	0,393	0,131	5	T7	0,131	-2,03256
6	T8	0,157	0,053	0,083	0,293	0,098	6	T8	0,098	-2,32619
7	T10	0,127	0,051	0,079	0,257	0,086	7	T10	0,086	-2,45729
8	T12	0,111	0,043	0,076	0,23	0,077	8	T12	0,077	-2,56829

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 155 XILENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln
0	T0	4,3	5,3	4	13,6	4,5	0	T0	45000	10,71442
1	T2	5	5	5	15	5,0	1	T2	50000	10,81978
2	T4	9	9	9	27	9,0	2	T4	90000	11,40756
3	T5	11,3	11,3	10,7	33,3	11,1	3	T5	111000	11,61729
4	T6	15	15,7	16,3	47	15,7	4	T6	157000	11,964
5	T7	10	11,3	11	32,3	10,8	5	T7	108000	11,58989
6	T8	9	9	8	26	8,7	6	T8	87000	11,37366
7	T10	6	5,7	5,5	17,2	5,7	7	T10	57000	10,95081
8	T12	5,7	4,3	4,3	14,3	4,8	8	T12	48000	10,77896

D.O. CEPA 05 A TOLUENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln
0	T0	0,062	0,053	0,066	0,181	0,060	0	T0	0,060	-2,80787
1	T2	0,081	0,071	0,082	0,234	0,078	1	T2	0,078	-2,55105
2	T4	0,123	0,089	0,113	0,325	0,108	2	T4	0,108	-2,22254
3	T5	0,142	0,111	0,121	0,374	0,125	3	T5	0,125	-2,08211
4	T6	0,153	0,152	0,227	0,532	0,177	4	T6	0,177	-1,72972
5	T7	0,147	0,149	0,153	0,449	0,150	5	T7	0,150	-1,89934
6	T8	0,146	0,132	0,141	0,419	0,140	6	T8	0,140	-1,9685
7	T10	0,122	0,121	0,139	0,382	0,127	7	T10	0,127	-2,06095
8	T12	0,099	0,114	0,101	0,314	0,105	8	T12	0,105	-2,25697

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 05 A TOLUENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln
0	T0	4	4,3	5	13,3	4,4	0	T0	44000	10,69194
1	T2	5	5,3	5,3	15,6	5,2	1	T2	52000	10,859
2	T4	9,3	10,3	10,3	29,9	10,0	2	T4	100000	11,51293
3	T5	10,3	11	10,3	31,6	10,5	3	T5	105000	11,56172
4	T6	12	12,3	12,3	36,6	12,2	4	T6	122000	11,71178
5	T7	6,3	8,3	8	22,6	7,5	5	T7	75000	11,22524
6	T8	5,3	6	7	18,3	6,1	6	T8	61000	11,01863
7	T10	4,7	5,3	5	15	5,0	7	T10	50000	10,81978
8	T12	4	5	4	13	4,3	8	T12	43000	10,66896

*Elaboração: a autora

ANEXO

ANEXO 1 –Protocolo de coloração de Gram – kit NewProv®

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Instituto de Ciências da Saúde

LABORATÓRIO DE VIROLOGIA

- 1) Identificar as lâminas previamente antes da preparação
- 2) Colocar uma gota de solução salina sobre a lâmina,
- 3) Retirar com uma alça de platina o material bacteriano das placas e levar a lâmina;
- 4) Cobrir o esfregaço totalmente com violeta-de-metila por 1 minuto;
- 5) Lavar cuidadosamente com água destilada com um picete em fluxo contínuo;
- 6) Colocar sobre a lâmina com lugol cobrindo-a totalmente e deixando por 1 minuto;
- 7) Escoar o lugol e lavar em cuidadosamente em água corrente;
- 8) Adicionar álcool etílico (99,5° GL) sobre a lâmina
- 9) Lavar com um picete formando uma corrente de água contínua
- 10) Cobrir a lâmina com fucsina por 30 segundos e retirar com picete com água corrente;
- 11) Secar ao ar livre e levar ao microscópio, com a objetiva de imersão (100x) com uma gota de óleo de imersão sobre a lâmina.

ANEXO 2 –Protocolo Extraction – kit extraçãoPROMEGA® Purification Systems Wizard

http://ccdb.ca/docs/CCDB_DNA_Extraction.pdf

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Instituto de Ciências da Saúde

LABORATÓRIO DE VIROLOGIA

EXTRAÇÃO DE DNA

- 1) Adicionar 1,0mL de cultura bacteriana em meio de cultura (Mueller Hinton) *overnight* e
- 2) Retirar com a ajuda da alça de platina em fluxo laminar e transferir para microtubos de 2 mL, contendo 1,5 mL água estéril.
- 3) Centrifugar as amostras a $14.000 \times g$, por 2 minutos para formar um *pellet* de células.
- 4) Retirar o sobrenadante e adicionar 480 µl de EDTA 50mM e ressuspender em vortex para as células.
- 5) Adicionar 600 µl de *NucleiLysisSolution* (Kit)
- 6) Encubar a 80° C por 5 minutos em banho maria.
- 7) Adicionar 3 µl de *RNaseSolution*(Kit) e inverter os tubos gentilmente de 2 a 5 vezes para homogeneizar
- 8) Incubar novamente a 37 ° C por 30 minutos.
- 9) Adicionar 200 µl de *ProteinPrecipitationSolution* (Kit) e ressuspender em vortex vigorosamente
- 10) Incubar no gelo por 5 minutos
- 11) Centrifugar a $14.000 \times g$ por 3 minutos
- 12) Transferir o sobrenadante contendo o DNA para outro microtubo de 1,5 ml estéril, e adicionar 600 µl de isopropanol cuidadosamente.
- 13) Gentilmente misturar por inversão até formar uma nuvem de DNA
- 14) Centrifugar novamente por $14.000 \times g$ por 2 minutos.
- 15) Descartar cuidadosamente o sobrenadante e secar o microtubo em papel absorvente limpo
- 16) Adicionar 600 µl de etanol a 70% e suavemente foi inverter o microtubo várias vezes para lavar o *pellet* de DNA,
- 17) Centrifugar a $14.000 \times g$ por 2 minutos e cuidadosamente aspirar o etanol com a ajuda de uma micropipeta.
- 18) Escoar o microtubo em papel absorvente limpo e deixar o *pellet* secando por 15 minutos a temperatura ambiente
- 19) Finalizar com a adição de 100 µl de DNA re-hidratação (Kit) e incubar a 65 ° C durante 1 hora
- 20) Acondicionar a freezer -80° C.