



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Guillermo Ladino Orjuela

Isolamento de cepas bacterianas degradadoras
de hidrocarbonetos aromáticos

São José do Rio Preto
2016

Guillermo Ladino Orjuela

Isolamento de cepas bacterianas degradadoras
de hidrocarbonetos aromáticos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes

São José do Rio Preto
2016

Ladino Orjuela, Guillermo.

Isolamento de cepas bacterianas degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos / Guillermo Ladino Orjuela. -- São José do Rio Preto, 2016
109 f. : il., tabs.

Orientador: Eleni Gomes

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Hidrocarbonetos – Biodegradação. 3. Fenóis – Biodegradação. 4. Catecolaminas. I. Gomes, Eleni. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 547.555

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Guillermo Ladino Orjuela

Isolamento de cepas bacterianas degradadoras
de hidrocarbonetos aromáticos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof.^a. Dr.^a. Eleni Gomes
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
USP – São Paulo

Prof. Dr. Marcelo Campos
UNESP – São José do Rio Preto

Prof.^a. Dr.^a. Janaína Rigonato
CENA-USP - Piracicaba

Prof. Dr. Fernando Alves de Melo
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
11 de fevereiro de 2016

DEDICATÓRIA

À minha amada família

Minha esposa Esther, fiel companheira de lutas, comprometida e generosa,

Minha filha Daniela, sensível e carinhosa,

Meu filho Juan Guillermo, gentil e tranquilo,

Que foram a força vital para conseguir esta dura empreitada.

Aos meus irmãos Margarita, Wilson Hernando, Janeth, Alcira e Nelcy
que sempre apoiaram este projeto.

AGRADECIMENTOS

A Eleni Gomes, por tudo!!

A todas as pessoas que me ajudaram de uma ou outra forma nas diferentes etapas desta pesquisa, obrigado.

Devo expressar especial agradecimento ao Diego, companheiro de todo momento, de leitura, dos seminários, da pesquisa, do papo filosófico, das aulas ministradas e à Maitê quem participou de modo definitivo no avanço das análises de degradação, muito obrigado!!

RESUMO

Este documento foi organizado em dois capítulos. O Capítulo I é um artigo de revisão intitulado “*Metabolic Pathways for Aromatic Compounds Degradation by Bacteria*”, no qual são descritas as fontes naturais e antrópicas dos hidrocarbonetos aromáticos e suas características químicas. Relacionaram-se os fatores ambientais que afetam a degradação aeróbia e anaeróbia desses compostos por bactérias e os principais compostos intermediários produzidos. É descrita passo a passo a sequência de preparação e desaromatização do anel benzênico e os compostos finais dessa degradação. O artigo foi publicado no volume 237 da série *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* em janeiro de 2016 (Springer http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8_5). O Capítulo II contém os resultados da pesquisa desenvolvida. O objetivo geral foi isolar cepas bacterianas de amostras de solo e avaliar o potencial degradador de fenol e outros hidrocarbonetos aromáticos. Foram realizadas coletas de amostras de solo de cinco postos de combustíveis, para a seleção das cepas bacterianas e para análises químicas e granulométricas. Alíquotas das amostras de solo foram transferidas para meio de cultura seletivo contendo querosene como única fonte de carbono. Testes morfológicos e bioquímicos indicaram que as cepas isoladas são Gram negativas, móveis, catalase positivas, produtoras de cápsula e de biossurfactantes. O sequenciamento do gene 16S rRNA mostrou 99 a 100% de similaridade com o gênero *Pseudomonas* sp. Todas as cepas degradaram o fenol em concentração de 120 mg L⁻¹ em menos de 24 horas. Testes da atividade enzimática mostraram que algumas das cepas expressaram a catecol 1,2-dioxigenase que catalisa a *orto*-clivagem do anel benzênico e outras expressaram a catecol 2,3 dioxigenase da *meta*-clivagem do anel aromático. Uma cepa não apresentou atividade para nenhuma dessas duas enzimas e uma apresentou atividade de ambas. Todas as cepas foram capazes de crescer em presença de fenantreno, fluoranteno e pireno.

Palavras chave: Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos, Biodegradação do fenol, Catecol 1,2-dioxigenase, Catecol 2,3-dioxigenase

ABSTRACT

This document is organized in two chapters. The Chapter I is a review paper entitled “Metabolic Pathways for Aromatic Compounds Degradation by Bacteria” in which are described natural and anthropogenic sources of aromatic hydrocarbons and their chemical characteristics. There are listed environmental factors that affect the aerobic and anaerobic degradation by bacteria and the central intermediates yielded. It is described step to step of sequence of preparation and dearomatization of benzene ring and the final metabolites of breakdown. The manuscript was published in the volume 237 of Reviews of Environmental Contamination and Toxicology in January of 2016 (Springer http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8_5). Chapter II has the results of developed research. The general objective was to isolate bacterial strains from samples of soil and to evaluate the potential of them for breakdown hydrocarbons. Soil samples from five gas stations were collected to isolate the bacterial strains and chemical and granulometric analysis was made. Aliquots of the soil samples were cultured with selective media with kerosene as only carbon and energy sources. Morphological and biochemical tests showed that bacterial strains were Gram negatives, motile, positive catalase, capsule-producers and biosurfactant producers. The sequencing of 16S rRNA gene showed 99 to 100% similarity with *Pseudomonas* sp genera. All bacterial strains were able to degrade phenol 120 mg L⁻¹ in less than 24 hours. Tests of enzymatic activity showed that some bacteria expressed the catechol 1,2-dioxygenase that catalyze ortho-clivage of benzene ring, others showed activity for the catechol 2,3-dioxygenase that catalyze the meta-cleavage of the ring. One strain did not show activity for any of these enzymes and one strain had activity for both. All strains were able to growth with fenantrene, fluoranthene and pyrene.

Keywords: Biodegradation of aromatic hydrocarbons, Biodegradation of phenol, Catechol 1,2-dioxygenase, Catechol 2,3-dioxygenase

SUMÁRIO

	Pag
DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
SUMÁRIO	9
LISTA DE ABREVIACÕES	11
CAPÍTULO 1. ARTIGO DE REVISÃO. “Metabolic pathways for aromatic compounds degradation by bacteria” PUBLICADO NO VOLUME 237 DO Reviews of Environmental Contamination and Toxicology DA SPRINGER http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8_5	12
CAPÍTULO 2. ISOLAMENTO DE CEPAS BACTERIANAS DEGRADADORAS DE FENOL A PARTIR DE AMOSTRAS DE SOLO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NA DEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS POLIAROMÁTICOS FENANTRENO, FLUORANTENO E PIRENO.	30
RESUMO.....	30
ABSTRACT.....	32
LISTA DE FIGURAS	34
LISTA DE TABELAS.....	36
LISTA DE ANEXOS	38
2.1 INTRODUÇÃO.....	39
2.2. OBJETIVOS.....	42
2.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.3.1. Área de coleta	43
2.3.2 Análise das amostras de solo	44
2.3.3 Número mais provável de microrganismos heterótrofos totais (NMP-HT) e de degradadores de hidrocarbonetos (NMP-DH).....	44
2.3.4 Análises estatísticas	46
2.3.5. Isolamento de cepas bacterianas degradadoras de hidrocarbonetos	46
2.3.6. Nomenclatura às cepas bacterianas	47
2.3.7. Características metabólicas, morfológicas e de coloração das cepas.....	47
2.3.7.1. Características metabólicas.....	48
2.3.7.2. Características morfológicas e de coloração.	49
2.3.8. Padronização dos inóculos.....	49
2.3.9. Determinação do efeito da temperatura e do pH na curva de crescimento	50
2.3.10. Testes de tolerância ao fenol.....	51
2.3.11. Avaliação da degradação de fenol.....	52
2.3.12. Identificação das cepas por técnicas de biologia molecular	54

2.3.12.1. Cultura de células competentes de <i>Escherichia coli</i> DH5 α TM	54
2.3.12.2. Obtenção dos ácidos nucleicos.....	55
2.3.12.3. Amplificação do gene 16S rRNA.....	55
2.3.12.4. Transformação e clonagem.....	56
2.3.13. Análise cromatográfica do fenol, catecol e ácido cis,cis-mucônico.....	57
2.3.14. Avaliação da atividade das enzimas catecol 1,2-dioxigenase e catecol 2,3-dioxigenase.....	60
2.3.14.1. Atividade da catecol 1,2-dioxigenase, EC 1.13.11.1.	62
2.3.14.2. Atividade da catecol 2,3-dioxigenase, EC 1.13.11.2.....	63
2.3.15. Crescimento das cepas usando fenantreno, fluoranteno e pireno.....	64
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
2.4.1. Análises químicas e granulométricas das amostras de solo.....	67
2.4.2. Número mais provável de microrganismos heterótrofos totais (NMP-HT) e de degradadores de hidrocarbonetos (NMP-DH) e análises de correlação com concentrações de macronutrientes, micronutrientes e granulometria.	68
2.4.3. Cepas bacterianas isoladas.....	70
2.4.4. Caracterização bioquímica e morfológica.....	71
2.4.5. Efeitos da temperatura e o pH nas curvas de crescimento das cepas.....	72
2.4.6. Ensaios de tolerância.....	75
2.4.7. Avaliação da degradação de fenol.....	77
2.4.8. Identificação das cepas por sequenciamento do gene 16S rRNA.....	80
2.4.9. Análise cromatográfica do fenol, catecol e ácido cis,cis-mucônico.....	81
2.4.10. Análise de atividade das enzimas catecol 1,2-dioxigenase e 2,3-dioxigenase.....	83
2.4.11. Características das cepas em presença de fenantreno, fluoranteno e pireno.....	84
2.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
2.6. CONCLUSÕES.....	89
2.7. PERSPECTIVAS.....	90
REFERÊNCIAS.....	91
ANEXOS.....	99

LISTA DE ABREVIACÕES

16S rRNA: Ácido Ribonucleico do ribossomo.

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*.

CETESB: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo.

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente do Brasil

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia líquida de alto desempenho)

LBMA: Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada.

MLM : Meio Líquido Mineral.

MLN: Meio Líquido Nutritivo.

MO: Materia Orgânica.

COT: Carbono Orgânico Total.

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*.

NMP-HT: Número mais provável de micro-organismos heterótrofos totais.

NMP-DH: Número mais provável de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos.

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase).

RCF: Força centrífuga relativa, tradução livre de: *Relative Centrifugal Force*.

UFC: Unidades Formadoras de Colônia.

CAPÍTULO 1. ARTIGO DE REVISÃO. “Metabolic pathways for aromatic compounds degradation by bacteria” PUBLICADO NO VOLUME 237 DO Reviews of Environmental Contamination and Toxicology DA SPRINGER http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8_5

Metabolic Pathways for Degradation of Aromatic Hydrocarbons by Bacteria

Guillermo Ladino-Orjuela, Eleni Gomes, Roberto da Silva,
Christopher Salt, and John R. Parsons

Contents

1	Introduction.....	105
2	Biodegradation of Aromatic Compounds	107
2.1	Aromatic Hydrocarbon Biodegradation Under Aerobic Conditions	108
2.2	Aromatic Hydrocarbon Biodegradation Under Anaerobic Conditions.....	112
3	Practical Applications of Knowledge About Metabolic Pathways	116
4	Summary	116
	References.....	117

1 Introduction

The aromatic compounds present in the environment are from natural sources and anthropogenic activities. The chemical characteristic of these compounds is the presence of one benzene ring (monoaromatic hydrocarbon—MAHs) or more than one fused rings (polyaromatic hydrocarbon—PAHs) (Favre and Powell 2013). The ring provides structural and chemical stabilities due to a symmetric π -electron system and therefore recalcitrance of these compounds (Vogt et al. 2011). In accordance with Molecular Orbital Theory, in a molecule of benzene the p electrons on

G. Ladino-Orjuela (✉) • E. Gomes • R. da Silva
Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology, Institute of Biosciences,
Letters and Exact Sciences (IBILCE) – São Paulo State University (Unesp),
Rua Cristóvão Colombo, 2265, São José do Rio Preto, São Paulo 15013-000, Brazil
e-mail: ambos.ong@gmail.com; eleni@ibilce.unesp.br; dasilva@ibilce.unesp.br

C. Salt • J.R. Parsons
Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics (IBED), Universiteit Van Amsterdam,
P.O. Box 94248, Amsterdam 1090 GE, The Netherlands
e-mail: christopher.salt@student.uva.nl; J.R.Parsons@uva.nl

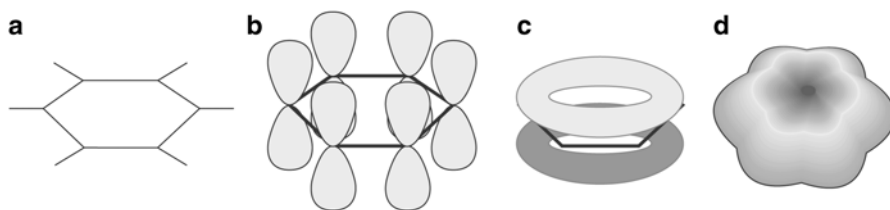


Fig. 1 Electron delocalization of π -electron system in benzene ring. (a) Shows the sigma-bonding framework of benzene. (b) Shows the p orbitals which form the delocalized π -bonding system in benzene. (c) Shape of the π -electron clouds above and below the plane of the ring in benzene. (d) Electrostatic potential map of benzene (Bruce 2004)

each carbon atom are delocalized and contribute to the development of the so-called π system. An electrostatic potential map of benzene (Fig. 1) shows that the electrons in the π -system are evenly distributed around the ring (Bruce 2004).

Aromatic hydrocarbons are classified as biological and non-biological compounds. Biological aromatic hydrocarbons are produced by plants and by microorganisms. In plants, this is mainly through the shikimic acid pathway (Ghosh et al. 2012) and microorganisms mainly via the malonic acid pathway (Zhan 2009). Capsaicin, estradiol, caffeine, theobromine, gallic acid, aromatic aminoacids (tyrosine, phenylalanine, and tryptophan), salicylic acid and the monolignols (p-coumaryl, coniferyl, and sinapyl) of lignin are the most well-known.

The monolignols are synthesized in plants via the shikimic acid pathway and are the most important natural aromatic compounds since they appear in large quantities in the environment as lignin and humic acids. p-coumaryl is a minor component of grass and forage type lignins, and coniferyl is the predominant lignin monomer found in softwoods (hence the name). Both coniferyl and sinapyl are the building blocks of hardwood lignin (Li and Chapple 2010).

The main sources of non-biological aromatics hydrocarbons are the effluents from fuel, chemical, plastic, explosive, ink, metal, pharmaceutical, and electric industries among others (Table 1). These compounds are called xenobiotics in function of their non-biological origin and their bioaccumulation, toxicity and carcinogenic action are well documented (USEPA 2005).

The physico-chemical properties of aromatic hydrocarbons have environmental significance because they determine fate in soil, water and atmosphere. For instance, adsorption on soils or sediments, due to hydrophobicity, is a major factor in their transportation and eventual degradation (Karickhoff 1981). The soil organic carbon-water partitioning coefficient (K_{OC}), that reflects the ratio between the quantity of the compound absorbed in the soil (normalized to organic carbon content) and the concentration in water has been used in predicting the mobility and bioavailability of organic soil contaminants. Low K_{OC} values correlate to more mobile organic chemicals and higher bioavailability (Wilczyńska-Piliszek et al. 2012) (Table 1).

The United States Environmental Protection Agency (USEPA 2005) published in 1986 guidelines to characterize the human carcinogenic potential of agents according to the Weight of Evidence (WoE). The characterization was done by a six-category

Table 1 Aromatic compounds from industrial activities

Compound	Formula	WoE*	K _{oc}	CASRN
Aniline	C ₆ H ₅ NH ₂	B2	0.96	62-53-3
Phenol	C ₆ H ₆ O	D	1.24	108-95-2
Benzene	C ₆ H ₆	A	1.82	71-43-2
2,4,6 Trinitrotoluene	C ₆ H ₂ CH ₃ (NO ₂) ₃	C	2.48	118-96-7
Bisphenol A	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	N.A.	2.74	80-05-7
Tetrachlorobenzene 1,2,3,4	C ₆ H ₂ Cl ₄	N.A.	4.60	634-66-2
Benzo-a-pyrene	C ₂₀ H ₁₂	B2	5.98	50-32-8

*WoE weight of evidence approach, N.A. not applicable, K_{oc} sorption coefficient (log L/Kg), CASRN chemical abstract service registry numbers

alphanumeric classification system (A, B1, B2, C, D and E). Group A includes human carcinogenic agents and Group E is for substances with evidence of non-carcinogenicity. The approach outlined in USEPA's guidelines for carcinogen risk assessment (USEPA 2005) considers all scientific information in determining whether, and under what conditions, an agent may cause cancer in humans and provides a narrative approach to characterize carcinogenicity rather than categories (Table 1).

Among the techniques for the study of metabolic pathways of aromatic hydrocarbon degradation by bacteria, the molecular biology technique Stable Isotope Probing (SIP) is particularly interesting because it allows for detailed metabolic and taxonomic analysis. SIP involves the incorporation of heavy isotopes (¹³C, ¹⁵N or ¹⁸O) into newly synthesized nucleic acids allowing the metabolic capacity of cultivated or uncultivated microorganisms to be linked to taxonomic identity (Aanderud and Lennon 2011; Abu Laban et al. 2015; Cupples 2011; Rettedal and Brözel 2015; Taubert et al. 2012; Zhang et al. 2012b). Briefly, in the nucleic acid-based SIP with carbon, light ¹²C nucleic acid and heavy ¹³C nucleic acid (DNA or RNA) are separated through ultracentrifugation and then characterized by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) or terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and sequencing of 16S rRNA gene. These results are used for genomic and/or metagenomic analysis (Cupples 2011; Kim et al. 2014; Kleinstaubert et al. 2012; Zhang et al. 2012b). The protein-based SIP relies on the detection and quantification of the peptides that incorporate heavy isotope ¹³C or ¹⁵N for proteomic and/or metaproteomic analysis using high-resolution mass spectrometry (Kleinstaubert et al. 2012; Taubert et al. 2012).

2 Biodegradation of Aromatic Compounds

The hydrophobicity and chemical stability of aromatic hydrocarbons, described above, give negligible biological activity to these molecules. Therefore, to break them down, in either aerobic or anaerobic conditions, bacteria need to destabilize the benzene ring through reversible and irreversible chemical modifications (Díaz et al. 2013).

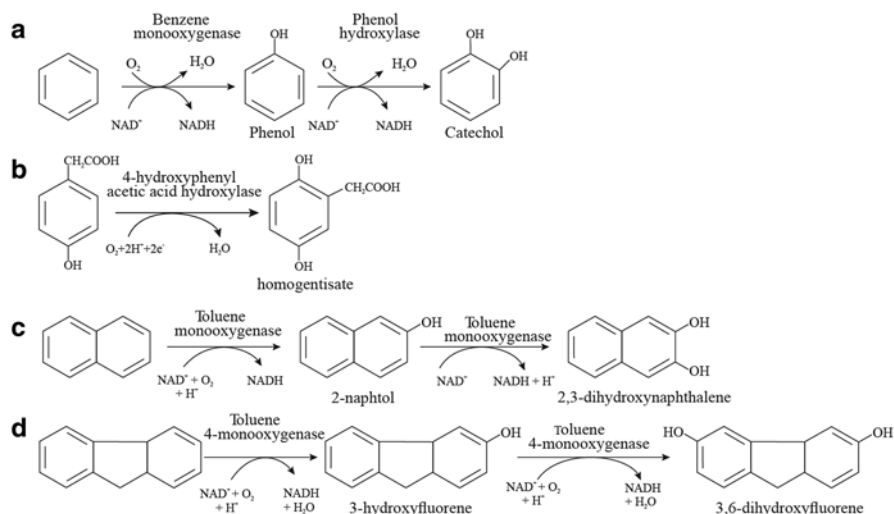


Fig. 2 Process of oxidation of benzene (a), 4-hydroxyphenyl acetic acid (b), naphthalene (c), and fluorene (d) catalyzed by monooxygenases

monooxygenases (EC 1.14.13) includes enzymes whose cofactor is the Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) and the electron donor is the Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate NAD(P)H. They are able to catalyze hydroxylation, sulf-oxidation, heteroatom oxygenation, N-hydroxylation and oxidative decarboxylation reactions. Group C-D monooxygenases (EC 1.14.14) require FAD or flavin mononucleotide (FMN) as cofactor and FMNH_2 or FADH_2 as electron donor and catalyzes hydroxylation, sulfoxidation, oxidation, epoxidation and desulfurization reactions. Group E–G has FAD as cofactor and FADH_2 or a substrate as electron donor. This group includes internal flavoprotein monooxygenases that reduce the flavin cofactor through substrate oxidation, and catalyze halogenation, sulfoxidation and oxidative decarboxylation (Huijbers et al. 2014).

Monooxygenases can oxidize both monoaromatic and polyaromatic hydrocarbons. Some examples are phenol hydroxylase and toluene/o-Xylene monooxygenase catalyzing benzene and phenol oxidation as reported by Cafaro et al. (2004) from *Pseudomonas stutzeri* OX1 and 4-hydroxyphenyl acetate 1-monooxygenase catalyzing oxidation of 4-hydroxyphenyl acetate as reported by Hareland et al. (1975) from *P. acidovorans*. In the case of PAHs, there was reported oxidation of naphthalene and fluorene catalyzed by a toluene 4-monooxygenase following a similar route to monoaromatic hydrocarbons (Tao et al. 2005) (Fig. 2).

While monooxygenases sequentially add hydroxyl groups to the aromatic ring, using molecular oxygen as substrate, forming phenols and then catechols, the dioxygenases catalyze, in the upper pathway, the reductive dihydroxylation of the aromatic ring forming cis-dihydrodiols (Fig. 3), then funneled by specific cis-dihydrodiol dehydrogenases to catechols as central intermediates. These dioxygenases are cofactor-requiring multicomponent heteromultimeric proteins (EC 1.14.12) (Parales and Resnick 2004).

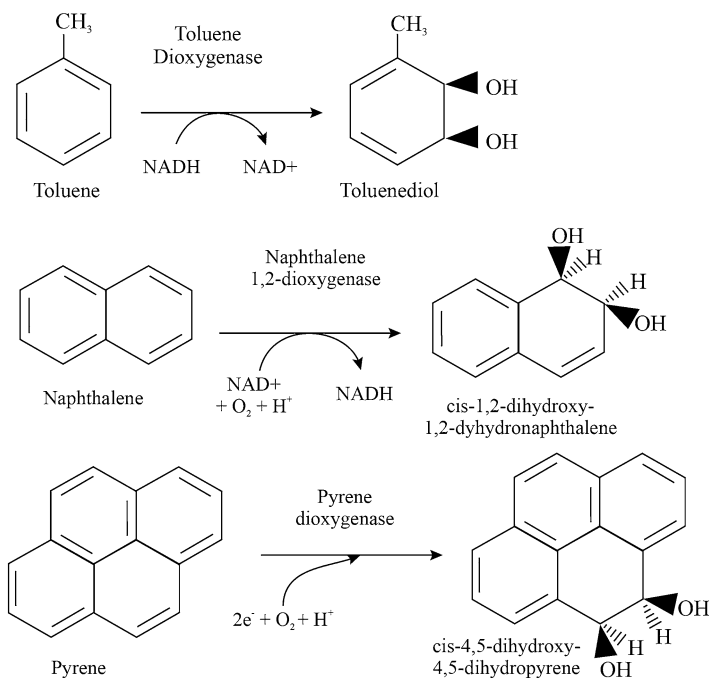


Fig. 3 Formation of cis-dihydrodiols of toluene, naphthalene and pyrene catalyzed by dioxygenases

A group named Rieske non-heme iron-dependent oxygenase systems, also important in aromatic hydrocarbon oxidation, are NADH-dependent and composed of a flavoprotein reductase, an iron-sulfur ferredoxin, and an iron-sulfur ferredoxin as catalytic component (Barry and Challis 2013; Ferraro et al. 2005).

The upper pathways begin with an oxidation and finish with the formation of central intermediates, which can be catechols or non-catecholic compounds (Fig. 4). The former have cis-dihydrodiols groups (Ma et al. 2013; Tao et al. 2005) and latter are hydroxy-substituted aromatic carboxylic acids (Fetzner 2012) resulting from reactions catalyzed by monooxygenases and dioxygenases.

Catechol was found by Loh and Chua (2002) evaluating the ability of *P. putida* ATCC 49451 to degrade sodium benzoate. Catechol was also reported by Karigar et al. (2006) as an intermediate of the phenol metabolic pathway by *Arthrobacter citreus*. (Chloro)hydroxyquinol was reported by Pérez-Pantoja et al. (2008) as a central intermediate of 2,4,6 trichlorophenol degradation by *Cupriavidus necator* JMP134. It was also reported by Khan et al. (2013) in the metabolism of 2-chloro-4-nitroaniline by *Rhodococcus* sp. Strain MB-P1. In the metabolism of para-nitrophenol in *Pseudomonas* sp. strain 1-7, Zhang et al. (2012a, b) found the hydroquinone and hydroxyhydroquinone as central intermediates.

The central intermediates that are non-catechols are hydroxy-substituted aromatic carboxylic acids (Fetzner 2012) (Fig. 4). Among the intermediates reported are the gentisate found by Romero-Silva et al. (2013) studying the peripheral pathways of 3-hydroxybenzoate and 4-hydroxybenzoate degradation by *Burkholderia xenovorans* LB400. Protocatechuate was reported by Kim et al. (2006) as an intermediate in

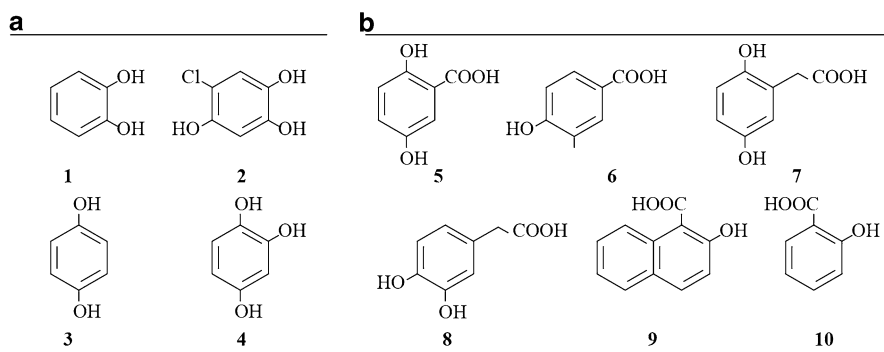


Fig. 4 Central intermediates formed in upper pathway under aerobic conditions. **(a)** Dihydrodiols (1) Hydroquinone, (2) Catechol, (3) (Chloro)hydroxyquinol, (4) Hydroxyhydroquinone, **(b)** hydroxy-substituted aromatic carboxylic acids, (5) Gentisate, (6) Protocatechuate, (7) Homogentisate, (8) Homoprotocatechuate, (9) 2-hydroxy-1-naphthoic acid, (10) Salicylic acid

the metabolism of para-hydroxybenzoate and vanilline in *P. putida* KT2440. The homogentisate and homoprotocatechuate were reported by Méndez et al. (2011) in studies with *Burkholderia xenovorans* LB400 degrading 3-hydroxybenzoate.

2-Hydroxy-1-naphthoic acid and salicylic acid were reported by Mallick and Dutta (2008) studying naphthalene degradation by *Staphylococcus* sp. strain PN/Y. The 3-hydroxyanthranilate was reported by Hasegawa et al. (2000) as part of degradative pathway of 2-nitrobenzoate by *P. fluorescens* strain KU-7.

The lower pathways refer to the dearomatization of central intermediates and ring cleavage to tricarboxylic acids (Fig. 5). The first reaction of lower pathways comprises of the de-aromatization of central intermediates, which, thereafter, undergo ortho-, meta- or para-cleavage by dioxygenases (Harwood and Paraes 1996). Ortho-cleavage, also known as the β -ketoadipate pathway, is between two hydroxyl groups and catalyzed by intradiol-type dioxygenases using Fe(II) as cofactor (Guzik et al. 2013). Meta-cleavage is on the carbon-carbon bond adjacent to the hydroxyl groups through the formation of an α -keto-lactone intermediate, catalyzed by extradiol-type dioxygenases, using Fe(III) as cofactor (Suenaga et al. 2014). Ortho cleavage of the catechol ring is catalyzed by catechol 1,2-dioxygenase to cis,cis-muconate; catechol meta-cleavage is catalyzed by catechol 2,3-dioxygenase to 2-hydroxy-muconic semialdehyde. Both cleavage pathways were reported by Loh and Chua (2002) in benzoate degradation by *P. putida*. The para-cleavage pathway is followed in hydroxy-substituted aromatic carboxylic acids between the carboxyl-substituted and the adjacent hydroxylated carbon atom. This para-cleavage pathway was reported by Dagley (1971) catalyzed by 2,3-gentisate dioxygenase to gentisate. Crawford (1975) also reported para-cleavage to protocatechuate, catalyzed by 2,3-protocatechuate dioxygenase in *Bacillus circulans* metabolizing 4-hydroxyphenyl propionic acid.

The ring cleavage, of hydroxy-substituted aromatic carboxylic acids, is catalyzed by enzymes that belong to the cupin superfamily. Most cupin-type ring cleavage dioxygenases use an Fe(II) center for catalysis and an action mechanism similar to extradiol dioxygenases (Fetzner 2012).

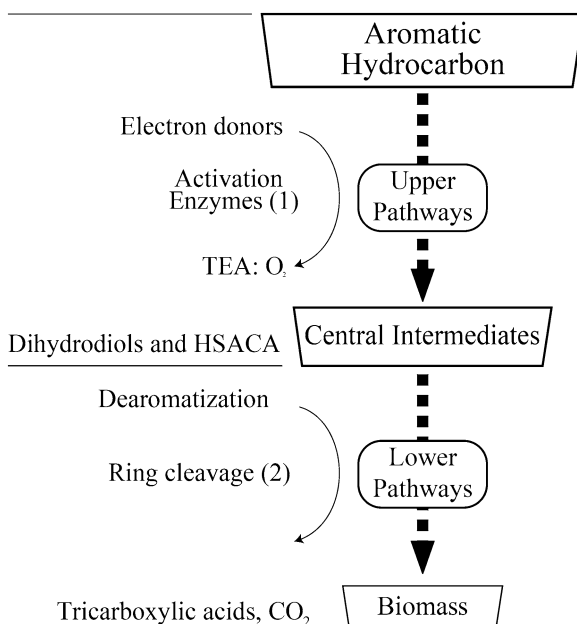


Fig. 5 Schematic representation of metabolic pathways of aromatic hydrocarbons by bacteria under aerobic conditions. Upper pathways are through hydrocarbon molecule to central intermediates. Lower pathways go from destabilization of central intermediates to biomass yield. Electron donors: NAD(P)H, FMNH₂ or FADH₂, ferredoxin, NADH. *TEA* terminal electron acceptor, Dihydrodiols = catechol, (chloro)catechol, (nitro)catechol, (chloro)hydroxyquinol, hydroquinone, hydroxyhydroquinone, (1) Moxygenases or dioxygenases enzymes. HSACA (hydroxy-substituted aromatic carboxylic acids) = gentisate, protocatechuate, homogentisate, homoprotocatechuate, 2-hydroxy-1-naphthoic acid, salicylic acid, 3-hydroxyanthranilate

2.2 Aromatic Hydrocarbon Biodegradation Under Anaerobic Conditions

In the absence of oxygen, oxidized inorganic compounds such as nitrate (NO₃⁻), manganese (Mn(IV)), iron (Fe(III)), sulfate (SO₄⁻²) and carbon dioxide (CO₂) act as the terminal electron acceptors (TEAs) (Fuchs et al. 2011; Vogt et al. 2011). The methanogenic reduction also plays an important role in anaerobic biodegradation, particularly at sites that have been contaminated for longer periods of time where other TEAs have been depleted (Lovley 1997).

Most studies reported that, under anaerobic conditions, activation in the upper pathways is by a reduction catalyzed by synthases, dehydrogenases and carboxylases (Chakraborty and Coates 2005; Heider 2007; Meckenstock and Mouttaki 2011). However, Philipp and Schink (1998) reported evidence of two oxidative reactions as the activation reaction in anaerobic degradation of resorcinol.

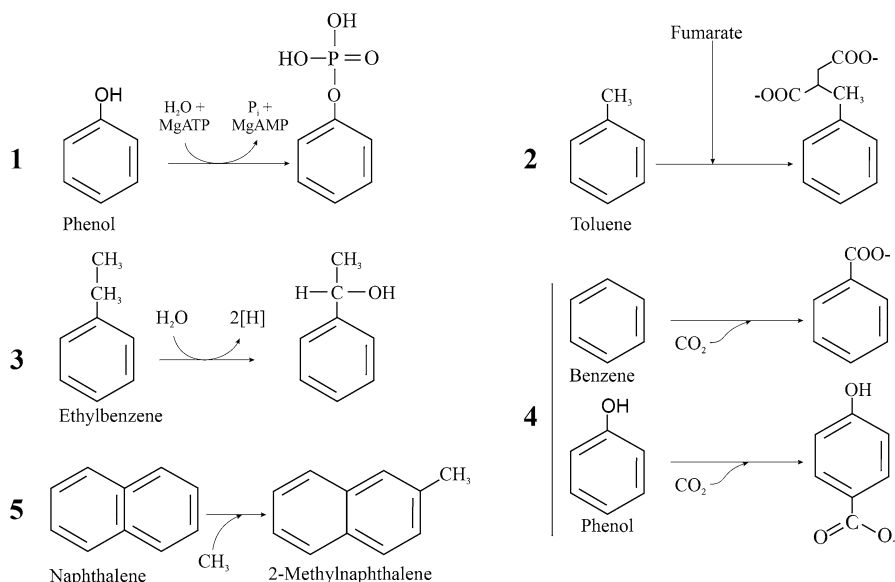
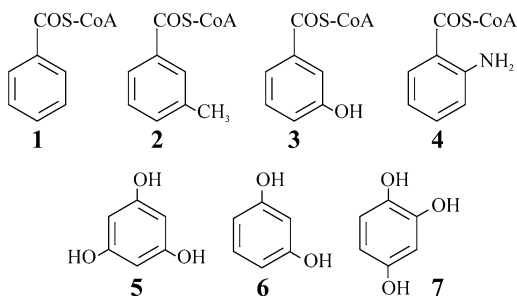


Fig. 6 The current five activation ways studied as the first step of upper pathways under anaerobic conditions. (1) Phosphorylation, (2) Fumarate insertion, (3) O_2 -independent hydroxylation, (4) Carboxylation, (5) Methylation. Phenol can be phosphorylated or carboxylated

Currently, the following five ways of activation of aromatic hydrocarbons activation are being discussed: (1) *Phosphorylation*. Activation occurs by insertion of a phosphate group. In the case of phenol in *Tauera aromatica* catalysis occurs by a phenylphosphate synthase (Narmandakh et al. 2006; Schmeling et al. 2004). (2) *Fumarate insertion*. Alkylated aromatic hydrocarbons such as toluene, cresols and xylenes are activated by radical-based addition of a fumarate to the methyl group and, in the case of ethylbenzene onto the side chain (Heider 2007). (3) *O_2 -independent hydroxylation*. Vogel and Grbìc-Galić (1986) using partially ^{18}O -labelled water in an enrichment culture in methanogenic incubations presented toluene and benzene hydroxylation indicating that the hydroxyl group originated from water. Johnson et al. (2001) showed that an ethylbenzene dehydrogenase in *Azoarcus* sp. strain EB1 catalyzes the insertion of one hydroxyl group onto ethylbenzene to produce (S)-(-)-1-phenylethanol (Fig. 6). (4) *Carboxylation*. Also called the “biological Kolbe-Schmitt reaction”, the carboxylation reaction has been suggested for monoaromatic hydrocarbons and non-substituted PAHs as follows. The carboxylation of phenol in para-position yielding 4-hydroxybenzoate by strains K172 and S100 was proposed by Tschuch and Fuchs (1987). Zhang and Young (1997) working with enrichment cultures with $[^{13}C]$ bicarbonate and sulfate reducing conditions found 2-naphthoate and phenanthrene carboxylic acid indicating that naphthalene and phenanthrene carboxylation. (5) *Methylation*. Also called Friedel-Crafts-type methylation, it was reported by Safinowski and Meckenstock (2006) as the initial reaction in the anaerobic degradation of naphthalene by sulfate-reducing enrichment cultures. Mouttaki et al. (2012) reported the methylation of naphthalene as the first breakdown reaction by enrichment culture N47 in sulphate-reducing conditions.

Fig. 7 Central intermediates of anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons. (1) Benzoyl-CoA, (2) 3-methylbenzoyl-CoA, (3) 3-hydroxybenzoyl-CoA, (4) 2-amino-benzoyl-CoA, (5) Phloroglucinol, (6) Resorcinol, (7) Hydroxyhydroquinone



The upper pathways are characterized by different metabolic pathways with several central intermediates, here we review seven of them (Fig. 7). The most common is benzoyl-CoA with 2-amino, 3-hydroxy and 3-methyl derivatives (Boll and Fuchs 1995; Koch and Fuchs 1992; Laempe et al. 1999; Merkel et al. 1989; Philipp and Schink 2012). Resorcinol was reported by Boyd et al. (1983) in studies of degradation of several aromatic hydrocarbons. Phloroglucinol was reported by Brune et al. (1992) as the intermediate in the metabolism of pyrogallol by *Pelobacter massiliensis*. Hydroxyhydroquinone (HHQ) was reported in the nitrate-reducing bacterium *Azoarcus anaerobius* strain LuFRes1 from hydroxylation of resorcinol (Philipp and Schink 1998).

The lower pathways begin with dearomatization of the central intermediates and can be by reductive or oxidative reactions throughout as will be described below.

Dearomatization of *benzoyl-CoA* is catalyzed by benzoyl-CoA reductase that seems to follow a Birch-like mechanism to yield cyclohexadiene-carbonyl-CoA (1,5-dienoyl-CoA).

Two classes of benzoyl-CoA reductases (BCR) have been reported. Class I BCR is ATP-consuming and found in facultative microorganisms (Boll and Fuchs 1995; Egland et al. 1997) and class II BCR is found in strictly anaerobic microorganisms being ATP-independent (Holmes et al. 2012). Both classes of BCR produce 1,5-dienoyl-CoA. However, when class I BCR catalyzes, the reaction requires one molecule of the reduced protein ferredoxin as electron donor ($E^\circ = -420$ mV), two molecules of ATP and two molecules of water (Boll and Fuchs 1995). The electron donor for class II BCR is unknown (Holmes et al. 2012).

For the de-aromatization of resorcinol (1,3-dihydrobenzene), two different pathways have been reported. The first is a reductive reaction as reported by Tschach and Schink (1985) and by Kluge et al. (1990) in *Clostridium* sp. and *Campylobacter* sp. co-culture named KN245, catalyzed by a resorcinol reductase yielding 1,3 cyclohexanedione. The second one, is an oxidative reaction releasing hydroxyhydroquinone (HHQ) described for the nitrate reducing bacterium *Azoarcus anaerobius* strain LuFRes1 (Philipp and Schink 1998).

De-aromatization of phloroglucinol had been studied in detail with *Eubacterium oxidoreducens* and *Pellobacter acidigallici*. This compound is reduced to dihydrophloroglucinol by an NADPH-dependent reductase (Armstrong and Patel 1994; Boll 2005; Brune and Schink 1992).

There are three metabolic pathways to de-aromatize Hydroxyhydroquinone (HHQ). The isomerization to phloroglucinol by the fermentative bacterium *Pellobacter massiliensis* (Brune et al. 1992), the reduction to dihydro-HHQ was observed with the sulfate reducing bacterium *Desulfovibrio inopinatus* (Philipp and Schink 2012) and an oxidative degradation to 2-hydroxy-1,4-benzoquinone by the nitrate-reducing bacterium *Azoarcus anaerobius* strain LuFRes1 (Philipp and Schink 1998).

The ring cleavage is a reductive step of the lower pathways. Benzoyl-CoA is transformed to 6-oxo-2-hydroxycyclo-hexane-1-carboxyl-CoA that still maintains the carbon ring. Fission of this ring is catalyzed by the 6-oxo-2-hydroxycyclo-hexane-1-carboxyl-CoA hydrolase using one molecule of water to produce 3-hydroxypimelyl-CoA (UM-BBD 2015).

Philipp and Schink (2012) reported that 1,3-cyclohexadione, a reductive intermediate of resorcinol, is hydrolytically cleaved to 5-oxocaproic acid that is broken down to an acetate and a butyrate.

Dihydroxyphloroglucinol, originated from phloroglucinol de-aromatization, is cleaved hydrolytically yielding 3-hydroxy-5-oxohexanoic acid, which is then oxidized to triacetic acid (3,5-dioxohexanoic acid) (Brune and Schink 1992).

The first reaction for ring cleavage of HHQ is an oxidation catalyzed by a membrane-bound HHQ-dehydrogenase and then channeled to acetate, malate and succinate (Darley et al. 2007) (Fig. 8). Information about particular compounds undergoing ring cleavage was not found.

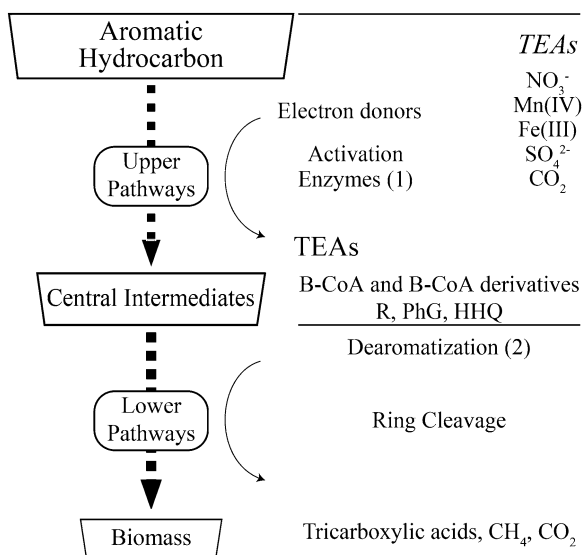


Fig. 8 Schematic representation of upper and lower pathways of aromatic hydrocarbon degradation under anaerobic conditions by bacteria. Electron donors: NAD(P)H, Ferredoxin. Enzymes (1): Synthases, Carboxylases, Dehydrogenases. B-CoA: Benzoyl-CoA; B-CoA derivatives are 2-amino benzoyl-CoA, 3-hydroxy benzoyl-CoA, 4-methyl benzoyl-CoA. R resorcinol, PhG phloroglucinol, HHQ hydroxyhydroquinone. dearomatization (2) is the initial step of lower pathway

3 Practical Applications of Knowledge About Metabolic Pathways

The knowledge about the metabolism of aromatic hydrocarbons could result in environmentally-friendly practical applications. The cleanup of pollutants by bioaugmentation (introducing bacteria from external sites), and/or biostimulation (providing nutrients or electron acceptors stimulating native populations) in natural or enhanced conditions are the best-known techniques (Prince 2010).

The 1,2- and 1,3-cyclohexanedione, derivatives of the metabolism of resorcinol are cyclic β -triketones able to inactivate toxin A (enterotoxin) and toxin B (cytotoxin) of *C. difficile* with a promising use in medicine (Balfanz and Rautenberg 1989). Their food, antibiotic, antimalarial, antidiabetic and anticancer therapeutical properties have also been reviewed (Blanco et al. 2003).

Muconic acid obtained from the ortho-cleavage of catechol has potential applications in the production of resins, bio-plastics, food additives, agrochemicals and pharmaceuticals (Xie et al. 2014). Lin et al. (2014) devised a novel artificial pathway for the efficient production of muconic acid based on the salicylic acid degradation pathway.

4 Summary

The aim of this review was to build an updated collection of information focused on the mechanisms and elements involved in metabolic pathways of aromatic hydrocarbons by bacteria. Enzymes as an expression of the genetic load and the type of electron acceptor available, as an environmental factor, were highlighted. In general, the review showed that both aerobic routes and anaerobic routes for the degradation of aromatic hydrocarbons are divided into two pathways. The first, named the upper pathways, entails the route from the original compound to central intermediate compounds still containing the aromatic ring but with the benzene nucleus chemically destabilized. The second, named the lower pathway, begins with ring de-aromatization and subsequent cleavage, resulting in metabolites that can be used by bacteria in the production of biomass. Under anaerobic conditions the five mechanisms of activation of the benzene ring described show the diversity of chemical reactions that can take place. Obtaining carbon and energy from an aromatic hydrocarbon molecule is a process that exhibits the high complexity level of the metabolic apparatus of anaerobic microorganisms. The ability of these bacteria to express enzymes that catalyze reactions, known only in non-biological conditions, using final electron acceptors with a low redox potential, is a most interesting topic. The discovery of phylogenetic and functional characteristics of cultivable and non-cultivable hydrocarbon degrading bacteria has been made possible by improvements in molecular research techniques such as SIP (stable isotope probing) tracing the incorporation of ^{13}C , ^{15}N and ^{18}O into nucleic acids and proteins.

Since many metabolic pathways in which enzyme and metabolite participants are still unknown, much new research is required. Therefore, it will surely allow enhancing the known and future applications in practice.

Acknowledgements We thank the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for their financial support with grant 870102/2011-7 and the Universidade Estadual Paulista—UNESP—campus São José do Rio Preto where this work and other research are being developed.

References

- Aanderud ZT, Lennon JT (2011) Validation of heavy-water stable isotope probing for the characterization of rapidly responding soil bacteria. *Appl Env Microbiol* 4589–4596. doi:[10.1128/aem.02735-10](https://doi.org/10.1128/aem.02735-10)
- Abu Laban N, Tan B, Dao A, Foght J (2015) Draft genome sequence of uncultivated *Desulfosporosinus* sp. strain Tol-M, obtained by stable isotope probing using [¹³C₆]toluene. *Genome Announ* doi:[10.1128/genomeA.01422-14](https://doi.org/10.1128/genomeA.01422-14)
- Armstrong SM, Patel TR (1994) Microbial degradation of phloroglucinol and other polyphenolic compounds. *J Basic Microbiol* 123–135. doi:[10.1002/jobm.3620340208](https://doi.org/10.1002/jobm.3620340208)
- Balfanz J, Rautenberg P (1989) Inhibition of *Clostridium difficile* toxin A and B by 1,2-cyclohexanedione modification of an arginine residue. *Biochem Biophys Res Commun* 1364–1370. doi:[10.1016/0006-291X\(89\)92754-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)92754-X)
- Barry SM, Challis GL (2013) Mechanism and catalytic diversity of rieske non-heme iron-dependent oxygenases. *ACS Catal* 2362–2370. doi:[10.1021/cs400087p](https://doi.org/10.1021/cs400087p)
- Blanco CA, Caballero I, Rojas A, Gomez M, Alvarez J (2003) Chelation of aqueous iron(III) by 2-acetyl-1,3-cyclohexanedione and beer ageing. *Food Chem* 561–568. doi:[10.1016/S0308-8146\(02\)00491-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00491-0)
- Boll M (2005) Dearomatizing benzene ring reductases. *J Mol Microbiol Biotechnol* 132–142. doi:[10.1159/000091560](https://doi.org/10.1159/000091560)
- Boll M, Fuchs G (1995) Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. *Eur J Biochem* 921–933. doi:[10.1111/j.1432-1033.1995.921_a.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.921_a.x)
- Boyd SA, Shelton DR, Berry D, Tiedje JM (1983) Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge. *Appl Environ Microbiol* 50–54. doi:<http://aem.asm.org/content/46/1/50.abstract>
- Bruice PY (2004) *Organic Chemistry*. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ
- Brune A, Schink B (1992) Phloroglucinol pathway in the strictly anaerobic *Pelobacter acidigallici*: fermentation of trihydroxybenzenes to acetate via triacetic acid. *Arch Microbiol* 417–424. doi:[10.1007/BF00249098](https://doi.org/10.1007/BF00249098)
- Brune A, Schnell S, Schink B (1992) Sequential transhydroxylations converting hydroxyhydroquinone to phloroglucinol in the strictly anaerobic, fermentative bacterium *Pelobacter massiliensis*. *Appl Environ Microbiol* 1861–1868. doi:<http://aem.asm.org/content/58/6/1861.abstract>
- Cafaro V, Izzo V, Scognamiglio R, Notomista E, Capasso P, Casbarra A, Pucci P, Di Donato A (2004) Phenol hydroxylase and toluene/o-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: interplay between two enzymes. *Appl Environ Microbiol* 2211–2219. doi:[10.1128/aem.70.4.2211-2219.2004](https://doi.org/10.1128/aem.70.4.2211-2219.2004)
- Carmona M, Zamarro MT, Blázquez B, Durante-Rodríguez G, Juárez JF, Valderrama JA, Barragán MJL, García JL, Díaz E (2009) Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiol Mol Biol Rev* 71–133. doi:[10.1128/mmbr.00021-08](https://doi.org/10.1128/mmbr.00021-08)
- Chakraborty R, Coates JD (2005) Hydroxylation and carboxylation—two crucial steps of anaerobic benzene degradation by *dechloromonas* strain RCB. *Appl Env Microbiol* 5427–5432. doi:[10.1128/aem.71.9.5427-5432.2005](https://doi.org/10.1128/aem.71.9.5427-5432.2005)

- Crawford RL (1975) Novel pathway for degradation of protocatechuic acid in *Bacillus* species. *J Bacteriol* 531–536. doi:<http://jb.asm.org/content/121/2/531.abstract>
- Cupples AM (2011) The use of nucleic acid based stable isotope probing to identify the microorganisms responsible for anaerobic benzene and toluene biodegradation. *J Microbiol Methods* 83–91. doi:[10.1016/j.mimet.2011.02.011](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.02.011)
- Dagley S (1971) Catabolism of aromatic compounds by micro-organisms. In: Rose AH, Wilkinson JF (eds) *Advances in microbial physiology*. Academic, Waltham, MA, pp 1–46
- Darley PI, Hellstern JA, Medina-Bellver JI, Marqués S, Schink B, Philipp B (2007) Heterologous expression and identification of the genes involved in anaerobic degradation of 1,3-dihydroxybenzene (resorcinol) in *Azoarcus anaerobius*. *J Bacteriol* 3824–3833. doi:[10.1128/jb.01729-06](https://doi.org/10.1128/jb.01729-06)
- DeLaune RD, Reddy KR (2005) REDOX POTENTIAL. In: Hillel D (ed) *Encyclopedia of soils in the environment*. Elsevier, Oxford, pp 366–371
- Díaz E, Jiménez JJ, Nogales J (2013) Aerobic degradation of aromatic compounds. *Curr Opin Biotechnol* 431–442. doi:[10.1016/j.copbio.2012.10.010](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.10.010)
- Egland PG, Pelletier DA, Dispensa M, Gibson J, Harwood CS (1997) A cluster of bacterial genes for anaerobic benzene ring biodegradation. *Proc Natl Acad Sci* 6484–6489. doi:<http://www.pnas.org/content/94/12/6484.abstract>
- Favre HA, Powell WH (2013) Nomenclature of organic chemistry. IUPAC recommendations and preferred names. Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Ferraro DJ, Gakhar L, Ramaswamy S (2005) Rieske business: structure–function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochem Biophys Res Commun* 175–190. doi:[10.1016/j.bbrc.2005.08.222](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.222)
- Fetzner S (2012) Ring-cleaving dioxygenases with a cupin fold. *Appl Env Microbiol* 2505–2514. doi:[10.1128/aem.07651-11](https://doi.org/10.1128/aem.07651-11)
- Fuchs G, Boll M, Heider J (2011) Microbial degradation of aromatic compounds—from one strategy to four. *Nat Rev Microbiol* 803–816. doi:[10.1038/nrmicro2652](https://doi.org/10.1038/nrmicro2652)
- Ghosh S, Chisti Y, Banerjee UC (2012) Production of shikimic acid. *Biotechnol Adv* 1425–1431. doi:[10.1016/j.biotechadv.2012.03.001](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.001)
- Gibson JS, Harwood C (2002) Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu Rev Microbiol* 345–369. doi:[10.1146/annurev.micro.56.012302.160749](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160749)
- Guzik U, Hupert-Kocurek K, Wojcieszynska D (2013) Intradiol dioxygenases – the key enzymes in xenobiotics degradation.
- Hareland WA, Crawford RL, Chapman PJ, Dagley S (1975) Metabolic function and properties of 4-hydroxyphenylacetic acid 1-hydroxylase from *Pseudomonas acidovorans*. *J Bacteriol* 272–285. doi:<http://jb.asm.org/content/121/1/272.abstract>
- Harwood CS, Parales RE (1996) The β -ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annu Rev Microbiol* 553–590. doi:[10.1146/annurev.micro.50.1.553](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.553)
- Hasegawa Y, Muraki T, Tokuyama T, Iwaki H, Tatsuno M, Lau PCK (2000) A novel degradative pathway of 2-nitrobenzoate via 3-hydroxyanthranilate in *Pseudomonas fluorescens* strain KU-7. *FEMS Microbiol Lett* 185–190. doi:<http://femsle.oxfordjournals.org/content/190/2/185.abstract>
- Heider J (2007) Adding handles to unhandy substrates: anaerobic hydrocarbon activation mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 188–194. doi:[10.1016/j.cbpa.2007.02.027](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.02.027)
- Holmes DE, Rizzo C, Smith JA, Lovley DR (2012) Genome-scale analysis of anaerobic benzoate and phenol metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Ferroglobus placidus*. *ISME J* 146–157. doi:<http://www.nature.com/ismej/journal/v6/n1/supinfo/ismej201188s1.html>
- Huijbers MME, Montersino S, Westphal AH, Tischler D, van Berkel WJH (2014) Flavin dependent monooxygenases. *Arch Biochem Biophys* 2–17. doi:[10.1016/j.abb.2013.12.005](https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.12.005)
- Johnson HA, Pelletier DA, Spormann AM (2001) Isolation and characterization of anaerobic ethylbenzene dehydrogenase, a novel Mo-Fe-S enzyme. *J Bacteriol* 4536–4542. doi:[10.1128/jb.183.15.4536-4542.2001](https://doi.org/10.1128/jb.183.15.4536-4542.2001)
- Karickhoff SW (1981) Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. *Chemosphere* 833–846. doi:[10.1016/0045-6535\(81\)90083-7](https://doi.org/10.1016/0045-6535(81)90083-7)

- Karigar C, Mahesh A, Nagenahalli M, Jin D (2006) Phenol degradation by immobilized cells of *Arthrobacter citreus*. Biodegradation 47–55. doi:[10.1007/s10532-005-3048-y](https://doi.org/10.1007/s10532-005-3048-y)
- Khan F, Pal D, Vikram S, Cameotra SS (2013) Metabolism of 2-chloro-4-nitroaniline via novel aerobic degradation pathway by *Rhodococcus* sp. strain MB-P1. PLoS ONE e62178. doi:[10.1371/journal.pone.0062178](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062178)
- Kim YH, Cho K, Yun S-H, Kim JY, Kwon K-H, Yoo JS, Kim SI (2006) Analysis of aromatic catabolic pathways in *Pseudomonas putida* KT 2440 using a combined proteomic approach: 2-DE/MS and cleavable isotope-coded affinity tag analysis. Proteomics 1301–1318. doi:[10.1002/pmic.200500329](https://doi.org/10.1002/pmic.200500329)
- Kim S-J, Park S-J, Cha I-T, Min D, Kim J-S, Chung W-H, Chae J-C, Jeon CO, Rhee S-K (2014) Metabolic versatility of toluene-degrading, iron-reducing bacteria in tidal flat sediment, characterized by stable isotope probing-based metagenomic analysis. Environ Microbiol 189–204. doi:[10.1111/1462-2920.12277](https://doi.org/10.1111/1462-2920.12277)
- Kleinstueber S, Schleinitz K, Vogt C (2012) Key players and team play: anaerobic microbial communities in hydrocarbon-contaminated aquifers. Appl Microbiol Biotechnol 851–873. doi:[10.1007/s00253-012-4025-0](https://doi.org/10.1007/s00253-012-4025-0)
- Kluge C, Tschech A, Fuchs G (1990) Anaerobic metabolism of resorcylic acids (m-dihydroxybenzoic acids) and resorcinol (1,3-benzenediol) in a fermenting and in a denitrifying bacterium. Arch Microbiol 68–74. doi:[10.1007/BF00291277](https://doi.org/10.1007/BF00291277)
- Koch J, Fuchs G (1992) Enzymatic reduction of benzoyl-CoA to alicyclic compounds, a key reaction in anaerobic aromatic metabolism. Eur J Biochem 195–202. doi:[10.1111/j.1432-1033.1992.tb16768.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16768.x)
- Laempe D, Jahn M, Fuchs G (1999) 6-Hydroxycyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA dehydrogenase and 6-oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA hydrolase, enzymes of the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. Eur J Biochem 420–429. doi:[10.1046/j.1432-1327.1999.00504.x](https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00504.x)
- Li X, Chapple C (2010) Understanding lignification: challenges beyond monolignol biosynthesis. Plant Physiol 449–452. doi:[10.1104/pp.110.162842](https://doi.org/10.1104/pp.110.162842)
- Lin Y, Sun X, Yuan Q, Yan Y (2014) Extending shikimate pathway for the production of muconic acid and its precursor salicylic acid in *Escherichia coli*. Metab Eng 62–69. doi:[10.1016/j.ymben.2014.02.009](https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.02.009)
- Loh K-C, Chua S-S (2002) Ortho pathway of benzoate degradation in *Pseudomonas putida*: induction of meta pathway at high substrate concentrations. Enzyme Microb Technol 620–626. doi:[10.1016/S0141-0229\(02\)00016-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00016-9)
- Lovley DR (1997) Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers. J Ind Microbiol Biotechnol 75–81. doi:[10.1038/sj.jim.2900246](https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900246)
- Ma F, Shi S-N, Sun T-H, Li A, Zhou J-T, Qu Y-Y (2013) Biotransformation of benzene and toluene to catechols by phenol hydroxylase from *Arthrobacter* sp. W1. Appl Microbiol Biotechnol 5097–5103. doi:[10.1007/s00253-012-4301-z](https://doi.org/10.1007/s00253-012-4301-z)
- Mallick S, Dutta TK (2008) Kinetics of phenanthrene degradation by *Staphylococcus* sp. strain PN/Y involving 2-hydroxy-1-naphthoic acid in a novel metabolic pathway. Process Biochem 1004–1008. doi:[10.1016/j.procbio.2008.04.022](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.04.022)
- Meckenstock RU, Mouttaki H (2011) Anaerobic degradation of non-substituted aromatic hydrocarbons. Curr Opin Biotechnol 406–414. doi:[10.1016/j.copbio.2011.02.009](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.02.009)
- Méndez V, Agulló L, González M, Seeger M (2011) The homogentisate and homoprotocatechuate central pathways are involved in 3- and 4-hydroxyphenylacetate degradation by *Burkholderia xenovorans* LB400. PLoS ONE e17583. doi:[10.1371/journal.pone.0017583](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017583)
- Merkel SM, Eberhard AE, Gibson J, Harwood CS (1989) Involvement of coenzyme A thioesters in anaerobic metabolism of 4-hydroxybenzoate by *Rhodospseudomonas palustris*. J Bacteriol 1–7. doi:[http://jb.asm.org/content/171/1/1.abstract](https://doi.org/http://jb.asm.org/content/171/1/1.abstract)
- Mouttaki H, Johannes J, Meckenstock RU (2012) Identification of naphthalene carboxylase as a prototype for the anaerobic activation of non-substituted aromatic hydrocarbons. Environ Microbiol 2770–2774. doi:[10.1111/j.1462-2920.2012.02768.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02768.x)

- Narmandakh A, Gad'on N, Drepper F, Knapp B, Haehnel W, Fuchs G (2006) Phosphorylation of Phenol by phenylphosphate synthase: role of histidine phosphate in catalysis. *J Bacteriol* 7815–7822. doi:[10.1128/jb.00785-06](https://doi.org/10.1128/jb.00785-06)
- Parales R, Resnick S (2004) Aromatic hydrocarbon dioxygenases. In: Singh A, Ward O (eds) *Biodegradation and bioremediation*. Springer, Berlin, pp 175–195
- Pérez-Pantoja D, De la Iglesia R, Pieper DH, González B (2008) Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *FEMS Microbiol Rev* 736–794. doi:[10.1111/j.1574-6976.2008.00122.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00122.x)
- Philipp B, Schink B (1998) Evidence of two oxidative reaction steps initiating anaerobic degradation of resorcinol (1,3-dihydroxybenzene) by the denitrifying bacterium *Azoarcus anaerobius*. *J Bacteriol* 3644–3649. doi:<http://jb.asm.org/content/180/14/3644.abstract>
- Philipp B, Schink B (2012) Different strategies in anaerobic biodegradation of aromatic compounds: nitrate reducers versus strict anaerobes. *Environ Microbiol Rep* 469–478. doi:[10.1111/j.1758-2229.2011.00304.x](https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00304.x)
- Pilloni G, von Netzer F, Engel M, Lueders T (2011) Electron acceptor-dependent identification of key anaerobic toluene degraders at a tar-oil-contaminated aquifer by Pyro-SIP. *FEMS Microbiol Ecol* 165–175. doi:[10.1111/j.1574-6941.2011.01083.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01083.x)
- Prince RC (2010) Bioremediation of marine oil spills. In: Timmis K (ed) *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Springer, Berlin, pp 2617–2630
- Rettedal EA, Brözel VS (2015) Characterizing the diversity of active bacteria in soil by comprehensive stable isotope probing of DNA and RNA with H218O. *Microbiol Open* 208–219. doi:[10.1002/mbo3.230](https://doi.org/10.1002/mbo3.230)
- Romero-Silva MJ, Méndez V, Agulló L, Seeger M (2013) Genomic and functional analyses of the gentisate and protocatechuate ring-cleavage pathways and related 3-hydroxybenzoate and 4-hydroxybenzoate peripheral pathways in *Burkholderia xenovorans* LB400. *PLoS ONE* e56038. doi:[10.1371/journal.pone.0056038](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056038)
- Safinowski M, Meckenstock RU (2006) Methylation is the initial reaction in anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. *Environ Microbiol* 347–352. doi:[10.1111/j.1462-2920.2005.00900.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00900.x)
- Schink B, Philipp B, Müller J (2000) Anaerobic degradation of phenolic compounds. *Naturwissenschaften* 12–23. doi:[10.1007/s001140050002](https://doi.org/10.1007/s001140050002)
- Schmeling S, Narmandakh A, Schmitt O, Gad'on N, Schühle K, Fuchs G (2004) Phenylphosphate synthase: a new phosphotransferase catalyzing the first step in anaerobic phenol metabolism in *Thauera aromatica*. *J Bacteriol* 8044–8057. doi:[10.1128/jb.186.23.8044-8057.2004](https://doi.org/10.1128/jb.186.23.8044-8057.2004)
- Staats M, Braster M, Rölting WFM (2011) Molecular diversity and distribution of aromatic hydrocarbon-degrading anaerobes across a landfill leachate plume. *Environ Microbiol* 1216–1227. doi:[10.1111/j.1462-2920.2010.02421.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02421.x)
- Suenaga H, Mizuta S, Miyazaki K, Yaoi K (2014) Diversity of extradiol dioxygenases in aromatic-degrading microbial community explored using both culture-dependent and culture-independent approaches. *FEMS Microbiol Ecol* 367–379. doi:<http://femsec.oxfordjournals.org/content/90/2/367.abstract>
- Tao Y, Bentley WE, Wood TK (2005) Regiospecific oxidation of naphthalene and fluorene by toluene monooxygenases and engineered toluene 4-monooxygenases of *Pseudomonas mendocina* KR1. *Biotechnol Bioeng* 85–94. doi:[10.1002/bit.20414](https://doi.org/10.1002/bit.20414)
- Taubert M, Vogt C, Wubet T, Kleinsteuher S, Tarkka MT, Harms H, Buscot F, Richnow H-H, von Bergen M, Seifert J (2012) Protein-SIP enables time-resolved analysis of the carbon flux in a sulfate-reducing, benzene-degrading microbial consortium. *ISME J* 2291–2301. doi:<http://www.nature.com/ismej/journal/v6/n12/supinfo/ismej201268s1.html>
- Tschech A, Fuchs G (1987) Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads. *Arch Microbiol* 213–217. doi:[10.1007/BF00414814](https://doi.org/10.1007/BF00414814)
- Tschech A, Schink B (1985) Fermentative degradation of resorcinol and resorcylic acids. *Arch Microbiol* 52–59. doi:[10.1007/BF00414768](https://doi.org/10.1007/BF00414768)

- UM-BBD (2015) Biocatalysis/biodegradation database (on line). University of Minnesota, Minneapolis, MN
- USEPA (ed) (2005) Guidelines for carcinogen risk assessment. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC
- Vogel TM, Grbic-Galic D (1986) Incorporation of oxygen from water into toluene and benzene during anaerobic fermentative transformation. *Appl Env Microbiol* 200–202. doi:<http://aem.asm.org/content/52/1/200.abstract>
- Vogt C, Kleinsteuber S, Richnow H-H (2011) Anaerobic benzene degradation by bacteria. *Microbial Biotechnol* 710–724. doi:[10.1111/j.1751-7915.2011.00260.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00260.x)
- Wilczyńska-Piliszek AJ, Piliszek S, Falandysz J (2012) QSPR models for prediction of the soil sorption coefficient (log KOC) values of 209 polychlorinated trans-azobenzenes (PCt-ABs). *J Environ Sci Health A* 441–449. doi:[10.1080/10934529.2012.646138](https://doi.org/10.1080/10934529.2012.646138)
- Xie N-Z, Liang H, Huang R-B, Xu P (2014) Biotechnological production of muconic acid: current status and future prospects. *Biotechnol Adv* 615–622. doi:[10.1016/j.biotechadv.2014.04.001](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.001)
- Zhan J (2009) Biosynthesis of bacterial aromatic polyketides. *Curr Topics Med Chem* 1598–1610. doi:<http://www.ingentaconnect.com/content/ben/ctmc/2009/00000009/00000017/art00002>
- Zhang X, Young LY (1997) Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia. *Appl Env Microbiol* 4759–4764. doi:<http://aem.asm.org/content/63/12/4759.abstract>
- Zhang S, Sun W, Xu L, Zheng X, Chu X, Tian J, Wu N, Fan Y (2012a) Identification of the para-nitrophenol catabolic pathway, and characterization of three enzymes involved in the hydroquinone pathway, in *Pseudomonas* sp. 1–7. *BMC Microbiol* 27. doi:<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/12/27>
- Zhang S, Wang Q, Xie S (2012b) Stable isotope probing identifies anthracene degraders under methanogenic conditions. *Biodegradation* 221–230. doi:[10.1007/s10532-011-9501-1](https://doi.org/10.1007/s10532-011-9501-1)

CAPÍTULO 2. ISOLAMENTO DE CEPAS BACTERIANAS DEGRADADORAS DE FENOL A PARTIR DE AMOSTRAS DE SOLO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NA DEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS POLIAROMÁTICOS FENANTRENO, FLUORANTENO E PIRENO.

RESUMO

Grandes quantidades de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos, produzidos por processos naturais e antrópicos, contaminam permanentemente o ambiente. O fenol e seus derivados, chamados em conjunto de fenóis, estão entre os poluentes mais comuns do solo, o ar e os corpos de água. Sua presença pode acontecer tanto em corpos de água naturais como em efluentes de atividades domésticas e industriais. Entre os microrganismos, as bactérias desempenham papel fundamental na degradação desses compostos. Os solos, contaminados ou não por hidrocarbonetos, apresentam populações de bactérias capazes de utilizá-los como fonte de carbono e energia. O objetivo deste trabalho foi isolar cepas bacterianas, a partir de amostras de solo, com capacidade degradadora de hidrocarbonetos aromáticos. Foram tomadas amostras de solo de 5 postos de combustível e analisadas para as composições de macronutrientes, micronutrientes e granulométricos assim como para as populações de bactérias heterótrofas totais e degradadoras de hidrocarbonetos. As cepas bacterianas foram isoladas pelo método de estriamento em meio com nutrientes minerais e querosene como fonte de carbono. Culturas sucessivas permitiram obter isolados puros. Assim, selecionaram-se dez cepas bacterianas, duas para cada local amostrado, as quais foram caracterizadas por meio de provas bioquímicas e de coloração de Gram. As correlações entre as características químicas e físicas do solo e o número mais provável de microrganismos indicaram que as amostras com maior concentração de matéria orgânica (Carbono Orgânico Total – COT) tiveram número significativamente maior de bactérias cultivadas. O conteúdo de micronutrientes apresentaram coeficientes de correlação negativos com o número de bactérias, sendo o ferro o de menor valor. Testes de tolerância com fenol mostraram que concentrações de até 400 mg L⁻¹ não afetaram significativamente o crescimento, no entanto, em concentrações maiores de 1600 mg L⁻¹ o crescimento foi mínimo. As cepas bacterianas

foram identificadas pelo sequenciamento do gene da subunidade 16S do rRNA amplificado pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). As sequências de nucleotídeos mostraram 99,0% a 100% de similaridade com registros para gênero *Pseudomonas* sp. A análise dos intermediários metabólicos da degradação do fenol, usando Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) mostrou a presença de catecol e ácido *cis,cis*-mucônico. As análises de atividade enzimática, usando catecol como substrato, mostraram aumento da absorbância em 260 nm das cepas LBMA-003, LBMA-004, LBMA-005 e LBMA-006. Este resultado indicou aumento da concentração do ácido *cis,cis*-mucônico que é formado pela *orto*-clivagem do catecol, reação catalisada pela catecol 1,2-dioxigenase. As cepas LBMA-001, LBMA-002, LBMA-007, LBMA-010 mostraram um aumento da absorbância em 375 nm pelo aumento da concentração do 2,3-hidroximucônico semialdeído formado pela *meta*-clivagem do catecol cuja reação é catalisada pela enzima catecol 2,3-dioxigenase. A cepa LBMA-009 não mostrou mudanças de absorbância em nenhum desses comprimentos de onda. Todas as cepas bacterianas isoladas foram capazes de crescer usando fenantreno, fluoranteno e pireno como fontes de carbono e energia.

Palavras Chave: *Pseudomonas* sp. degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos, Catecol 1,2-dioxigenase, Catecol 2,3-dioxigenase.

ISOLATION OF PHENOL DEGRADING BACTERIA STRAINS FROM SOIL SAMPLES
AND EVALUATION OF THEM IN POLYAROMATIC HYDROCARBONS
FENANTRENE, FLUORANTHENE AND PYRENE DEGRADATION

ABSTRACT

High quantities of aromatic and aliphatic hydrocarbons, produced by natural and anthropic processes, led to permanent environment contamination. Phenol and its derivatives, all named phenols, are among the most common pollutants of soil, air and water bodies. Their occurrence can be in natural water bodies as in domestic and industrial effluents. Amongst microorganisms, bacteria develop main role in the degradation of these compounds. Soils, contaminated or not contaminated by hydrocarbons, contain bacteria populations able to use them as carbon and energy sources. The objective of this work was to isolate bacterial strains, from soil samples, able to degrading aromatic hydrocarbons. Soils samples from areas near to five gas stations were taken and chemical composition, macronutrients content, micronutrients content and granulometric characteristics were analyzed. Most probable number of total heterotrophic and hydrocarbon degrading bacteria of soil samples were evaluated also. Isolation of bacterial strains by streak plate method with mineral medium and kerosene or phenol as carbon source was made. Successive cultures allowed obtaining pure isolates. Ten bacterial strains, two for each place, were selected and underwent biochemical tests and Gram stain characterization. The correlations between soil's chemical and physical characteristics and organic matter content (as Total Organic Carbon – TOC) of soil and the most probable number of microorganisms showed that samples with high concentration of organic matter had a higher number of bacteria cultivated. Micronutrient contents shown negative coefficient correlation, the iron was the lowest. Phenol tolerance tests showed that growth of bacteria was little affected up to 400 mg L⁻¹, however, concentrations higher than 1600 mg L⁻¹ the growth was minimal. Bacterial strains were identified by amplification of 16S rRNA gene using Polymerase Chain Reaction (PCR) technic. The sequencing of nucleotides showed 99% to 100% similarity to *Pseudomonas* sp. genera. Analysis of intermediate metabolites of phenol breakdown using Liquid Chromatography Mass

Spectrometry – HPLC – MS – showed catechol and *cis-cis*, muconic acid. Enzymatic analysis using catechol as substrate showed an increase of absorbance at 260 nm of LBMA-003, LBMA-004, LBMA-005 e LBMA-006 strains. This result point out a rise of *cis,cis*-muconic acid yielded by *orto*-cleavage of catechol, reaction catalyzed by catechol 1,2-dioxygenase. LBMA-001, LBMA-002, LBMA-007 and LBMA-010 strains showed an increase of absorbance at 375 nm by the production of 2,3-hydroxymuconic semialdehyde yielded by *meta*-cleavage of catechol catalyzed by the catechol 2,3-dioxygenase. LBMA-009 strain did not show changes of absorbance in any of these wavelengths. All bacteria strains isolated were able to growth using fenantrene, fluoranthene and pyrene as carbon and energy sources.

Keywords: Aromatic hydrocarbons-degrading *Pseudomonas* sp., Catechol 1,2-dioxygenase, Catechol 2,3-dioxygenase

LISTA DE FIGURAS

Pag.

- Figura 1- Mapa da área urbana do município de São José do Rio Preto – SP. Os números 1 a 5 representam as zonas dos lugares de amostragem. Os pontos vermelhos indicam o local da amostragem. 43
- Figura 2 - Desenho das placas de microtitulação com a distribuição das quintuplicatas de cada uma das diluições das amostras. Em ordem descendente a primeira diluição é 10⁻⁴ até 10⁻⁸ para a determinação do NMP-HT e NMP-DH. Os poços externos, marcado com um “X” foram preenchidos como MLM para diminuir o efeito de borda e a evaporação das unidades experimentais..... 45
- Figura 3 - Desenho de placa de microtitulação com a distribuição aleatorizada dos poços contendo as culturas com diferentes concentrações de fenol (100 até 1600 mg L⁻¹). Os poços com um “X” foram preenchidos com MLM para diminuir o efeito de borda no crescimento e a evaporação. 52
- Figura 4 - Reação da 4 amino antipirina com fenol em meio alcalino..... 53
- Figura 5 – Modelo conceitual do método da 4 amino antipirina (APHA, 1999; Faust, 1967). 54
- Figura 6 - Método de biologia molecular para a identificação das cepas bacterianas 56
- Figura 7 - Modelo conceitual da oxidação do fenol e da subsequente *orto*-clivagem e *meta*-clivagem do catecol..... 61
- Figura 8 - Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos 65
- Figura 9 - Planejamento experimental da degradação dos hidrocarbonetos aromático policíclicos e reação do cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazolio 66
- Figura 10 - Frascos cônicos contendo 50 mL de MLM com querosene 2%. O frasco querosene branco corresponde com o controle abiótico (ausência de inóculo). Os frascos contendo cepa bacteriana apresentaram mudança na cor. A cepa LBMA GPMA001 formou uma camada amarel amarela na superfície do meio de cultura. A cepa 002, apresentou turvamento, a cepa 004 apresentou coloração amarela e a formação de uma camada de espuma na superfície como as cepas 004, 007 e 008. A cepa 007 turvou o meio mas não apresentou coloração amarela. 71
- Figura 11 - Curvas de crescimento das cepas a 27 °C em MLN, pH 7,0±0,1; agitação 150 rpm..... 73

- Figura 12 - Curvas de crescimento das cepas a 30 °C em MLN, pH 7,0±0,1; agitação 150 rpm..... 73
- Figura 13 - Curvas de crescimento das cepas a 33 °C em MLN, pH 7,0 ±0,1; agitação 150 rpm..... 74
- Figura 14 - Curvas de crescimento das cepas a pH 6,0 ±0,1; em MLN, temperatura 30°C; agitação 150 rpm 74
- Figura 15 - Curvas de crescimento das cepas a pH 6,5; MLN, temperatura 30 °C; agitação 150 rpm..... 75
- Figura 16 - Absorbância das culturas bacterianas em diferentes concentrações de fenol em placa de microtitulação após 24 horas de cultivo em MLN. Temperatura 30°C. pH 7,0 ±0,1..... 76
- Figura 17 - Placas de petri de 10 cm de diâmetro com 5 mL de MSM e fenol a 120 mg L⁻¹. Tempo de cultivo 24 horas. Temperatura 30°C. pH 7,0 ±0,1. Os meios apresentaram mudança de cor. Tons de amarelo das cepas 002, 003, 005, 006, 007 e 009 até marrom da cepa 008 sugerem o uso de rotas metabólicas diferentes no uso do fenol como fonte de carbono e energia. 77
- Figura 18 - Frascos de vidro de 50 mL de volume com 20 mL de MLM e fenol a 120 mg L⁻¹. Os números nas etiquetas correspondem com a cepa inoculada no frasco. Tempo de cultura 24 horas. Temperatura 30°C. pH 7,0 ±0,1. O crescimento das cepas mudou a coloração dos meios de cultura, as diferentes colorações sugerem comportamentos metabólicos diferentes. 78
- Figura 19 - Curva analítica da 4-aminoantipirina construída com os dados do anexo 3..... 78
- Figura 20 - Curvas de degradação do fenol pelas cepas isoladas 79
- Figura 21 - Espectros de absorbância de fenol, ácido cis-cis,mucônico, e catecol..... 81

LISTA DE TABELAS

Pag.

• Tabela 1 - Zonas de amostragem na área urbana de São José do Rio Preto e coordenadas geográficas dos lugares de amostragem	43
• Tabela 2 - Escala de McFarland em cubeta	50
• Tabela 3 - Concentrações e volumes dos reagentes em testes de tolerância em microplaca....	51
• Tabela 4 - Compostos a partir da <i>meta</i> -clivagem do catecol.....	58
• Tabela 5 - Compostos a partir da <i>orto</i> -clivagem do catecol.....	59
• Tabela 6 - Programação da Cromatografia Líquida para detecção de fenol, catecol e ácido <i>cis,cis</i> -mucônico	60
• Tabela 7 - Concentração dos macronutrientes P, K, Ca, Mg, H+Al e Matéria Orgânica das amostras de solo de cada uma das zonas	67
• Tabela 8 - Concentração dos micronutrientes enxofre (S-SO ₄) e alumínio (Al) nas amostras de solo de cada uma das zonas	67
• Tabela 9 - Análise granulométrica das amostras do solo – Com fracionamento de areia.....	68
• Tabela 10 - Número mais provável de Heterotróficos totais (NMP-HT) e de degradadores de hidrocarbonetos (NMP-DH) por posto amostrado	68
• Tabela 11 - Coeficientes de correlação de macronutrientes, micronutrientes e análise granulométrica com a população de bactérias heterótrofas totais (HT) e degradadoras de hidrocarbonetos (DH).....	69
• Tabela 12 - Nomenclatura das cepas bacterianas isoladas	70
• Tabela 13 - Características bioquímicas, morfológicas e de coloração das cepas bacterianas isoladas.	72
• Tabela 14 - Determinação da escala de McFarland por absorbância em placa de microtitulação comparando com absorbância em cubeta	72
• Tabela 15 - Identificação e propriedades físico-químicas do fenol	76
• Tabela 16 - Resultado da consulta das sequências de nucleotídeos dos amplicons das cepas isoladas com a ferramenta BLAST da base de dados do NCBI.....	80
• Tabela 17 - Valores de área dos picos de absorbância nas análises HPLC das culturas bacterianas LBMA-001 a LBMA-009 em MLM com fenol 120 mg L ⁻¹	82

- Tabela 18 - Valores de área dos picos de absorbância nas análises cromatográficas da culturas bacteriana LBMA-010 em MLM com fenol 120 mg L⁻¹ 83
- Tabela 19 - Valores de proteína total e atividade das enzimas catecol 1,2-dioxigenase e da catecol 2,3-dioxigenase..... 84
- Tabela 20 - Características das cepas crescendo em meio líquido mineral com Fenantreno 50 mg L⁻¹ 85
- Tabela 21 - Características das cepas crescendo em meio líquido mineral com Fluoranteno 50 mg L⁻¹ 85
- Tabela 22 - Características das cepas crescendo em meio líquido mineral com Pireno 50 mg L⁻¹ 86

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
• Anexo 1 - Valores de absorvância das culturas bacterianas em concentrações crescentes de fenol. Temperatura 30 °C, MLM, pH 7,0.....	99
• Anexo 2 - Valores de absorvância das culturas bacterianas em MLM e fenol a 120 mgL ⁻¹ . Amostragem a cada duas horas.	100
• Anexo 3 - Valores de absorvância em 500 nm das triplicatas das soluções padrão de fenol para a construção da curva analítica de determinação do fenol pelo método da 4-aminoantipirina	101
• Anexo 4 - Nomenclatura das cepas isoladas, número de nucleotídeos da sequência de identificação, nome científico da cepa segundo o NCBI e sequência de nucleotídeos das cepas.	102

ISOLAMENTO DE CEPAS BACTERIANAS DEGRADADORAS DE FENOL A PARTIR DE AMOSTRAS DE SOLO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NA DEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS POLIAROMÁTICOS FENANTRENO, FLUORANTENO E PIRENO.

2.1 INTRODUÇÃO

As diversas atividades antrópicas e naturais colocam, a cada ano, grandes quantidades de hidrocarbonetos no ambiente com a consequente contaminação do solo, o ar e os corpos de água. O fenol junto com seus derivados, chamados em seu conjunto de fenóis, está entre os poluentes de solo e água mais comuns. Sua presença pode acontecer em corpos de água naturais, em efluentes de atividades domésticas e industriais - refinaria de petróleo, fábrica de tintas, destilaria de vinho, extração de azeite de oliva, explosivos e plásticos, etc - assim como em fontes de água potável (AGARRY *et al.*, 2008). No processo de potabilização dessas águas, a cloração pode produzir cloro fenóis que dão características de odor e sabor rejeitáveis além de aumentar a toxicidade (APHA *et al.*, 1999)

A dissipação dos hidrocarbonetos do ambiente envolvendo atividades biológicas é chamada de biorremediação. No caso particular dos micro-organismos, a despoluição de locais contaminados com hidrocarbonetos pode ser feita de duas maneiras: pela bioestimulação que consiste em fomentar a produção de biomassa microbiana nativa do local adicionando-se nutrientes minerais ou; por um segundo método conhecido como bioaugmentação que corresponde à introdução de populações de micro-organismos, com comprovada capacidade degradadora do composto e que são nativas de lugares diferentes daquele que está sendo tratado (ANGELIM *et al.*, 2013).

No solo, existe uma ampla diversidade de populações microbianas com capacidade degradadora de hidrocarbonetos (MARGESIN *et al.*, 2003). Em termos gerais, é possível achar de 10^6 até 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) cultiváveis por grama de solo (TARDY *et al.*, 2014).

Jeon e Madsen (2013) reportaram que a quantidade e tipo de população microbiana (fungos, microalgas e bactérias) presente no solo é responsável pelo processo natural de biorremediação e, os níveis dessas populações afetam o tempo de degradação dos hidrocarbonetos.

Há muito tempo as bactérias vêm sendo avaliadas em estudos de prospecção para a biorremediação de hidrocarbonetos (BUSHNELL e HAAS, 1941; BAK e WIDDEL, 1986; DE ALMEIDA *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2010). De acordo com a base de dados Biocatalysis/Biodegradation da Universidade de Minnesota – UM-BBD (2015), existe uma grande diversidade de bactérias Gram negativas (*Acinetobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Burkholderia* sp., *Pseudomonas* sp., *Sphingomonas* sp., etc) e Gram positivas (*Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Mycobacterium* sp., *Paenibacillus* sp., *Rhodococcus* sp., *Staphylococcus* sp., etc), já cultivadas, com capacidade de degradar hidrocarbonetos. No entanto, a grande diversidade metabólica desses micro-organismos e a baixa porcentagem de bactérias cultiváveis conhecidas, indicam que o potencial existente pode ser muito maior.

Na degradação dos hidrocarbonetos aromáticos por bactérias são conhecidas duas rotas metabólicas: as periféricas e as centrais (CARMONA *et al.*, 2009; CASPI *et al.*, 2014; LADINO-ORJUELA *et al.*, 2016). As duas dependem das condições ambientais (químicas e físicas) e da informação genética dos micro-organismos. Entre as condições ambientais, a disponibilidade de oxigênio é fator condicionante do tipo de micro-organismo e das reações a ocorrer.

Devido a sua hidrofobicidade e à estabilidade química, as moléculas de hidrocarbonetos aromáticos não tem atividade biológica, sendo necessária uma etapa de ativação. Em condições de aerobiose a ativação é feita pela incorporação de um ou dois átomos de oxigênio e é catalisada por enzimas do grupo das mono-oxigenases ou das dioxigenases respectivamente (MADIGAN *et al.*, 2012). Em anaerobiose, tem sido reportados 5 mecanismos de ativação: fosforilação, inserção de um fumarato, hidroxilação independente de oxigênio, carboxilação e metilação (LADINO-ORJUELA *et al.*, 2016).

Nesse contexto, o presente trabalho buscou conhecer parte da microbiota presente no solo de postos de combustível e avaliar seu potencial na degradação do fenol como hidrocarboneto monoaromático e de fenantreno, fluoranteno e pireno como hidrocarbonetos poliaromáticos.

HIPÓTESE

Em amostras de solo, na cidade de São José do Rio Preto, existem bactérias capazes de usar hidrocarbonetos aromáticos como fonte de carbono e energia.

2.2. OBJETIVOS

GERAL

Isolar cepas bacterianas degradadoras de fenol a partir de amostras de solos de postos de combustíveis na área urbana de São José do Rio Preto – SP.

ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença de cepas bacterianas capazes de crescer em meio contendo querosene, em amostras de solo de adjacências de postos de combustíveis, isolá-las e identificá-las;
- determinar a capacidade degradadora de fenol pelas cepas isoladas;
- identificar enzimas envolvidas na degradação do fenol;
- determinar o crescimento das cepas selecionadas em fenantreno, fluoranteno e pireno.

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1. Área de coleta

A área urbana do município de São José do Rio Preto foi dividida em cinco zonas e em cada uma foi escolhido um posto de combustível segundo a seguinte localização (Tabela 1, **Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

Tabela 1 - Zonas de amostragem na área urbana de São José do Rio Preto e coordenadas geográficas dos lugares de amostragem

Zona/Posto	Localização Posto	
	Latitude	Longitude
1	20°47'09,5"S	49°21'15,2"W
2	20°46'30,6"S	49°23'06,7"W
3	20°50'33,5"S	49°21'06,8"W
4	20°48'35,4"S	49°24'04,4"W
5	20°49'52,9"S	49°24'17,0"W

Figura 1- Mapa da área urbana do município de São José do Rio Preto – SP. Os números 1 a 5 representam as zonas dos lugares de amostragem. Os pontos vermelhos indicam o local da amostragem.



2.3.2 Análise das amostras de solo

Os pontos de amostragem dos postos 1 e 2 (item 1.1.) foram áreas de 100 cm² e 5 cm de profundidade no caso dos postos 3, 4 e 5 foram selecionadas as caixas de drenagem. Em cada amostragem foram retirados aproximadamente 500 g de solo e transferido para embalagens plásticas estéreis. O material foi levado para o laboratório, devidamente etiquetado, mantido em refrigeração e utilizado para as análises físico-químicas e microbiológicas.

Cerca de 300 g de amostra de solo de cada posto foram enviados para análises granulométrica e química de macro e micronutrientes no Laboratório de Análise de Solo e Planta da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP – Campus de Jaboticabal.

2.3.3 Número mais provável de microrganismos heterótrofos totais (NMP-HT) e de degradadores de hidrocarbonetos (NMP-DH).

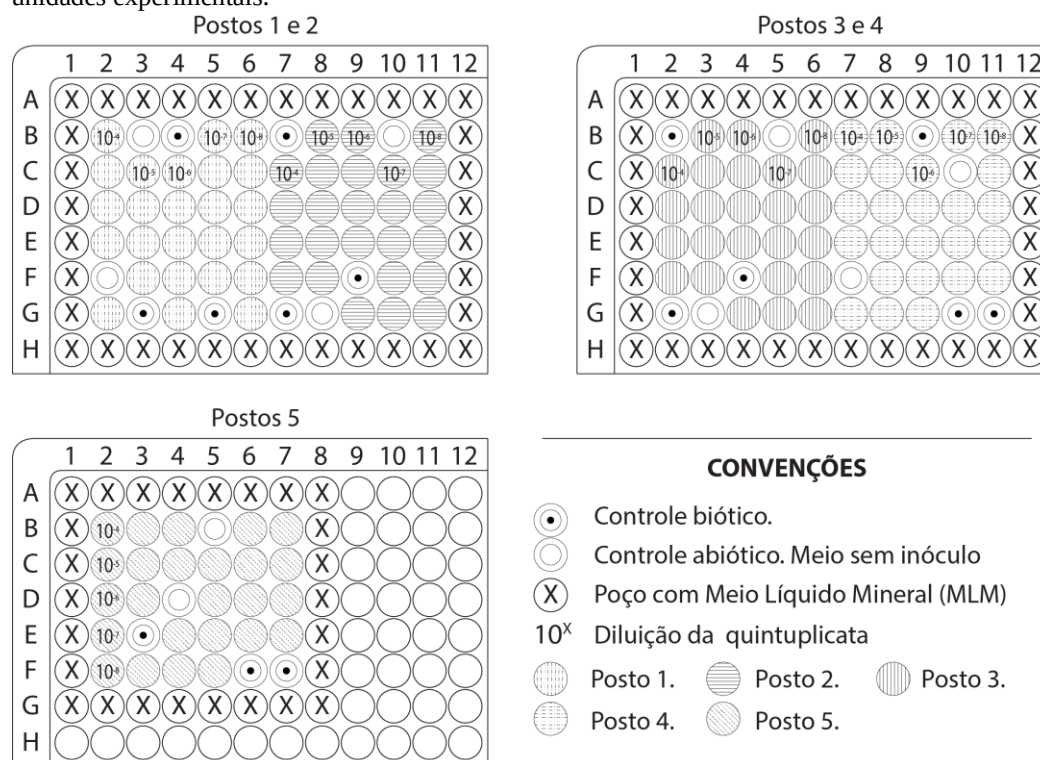
Em béquer de 200 mL foram colocados 50 mL do meio líquido mineral (MLM) e 1,0 g de solo, agitou-se durante 5 min. e deixado sedimentar por 10 minutos. Uma alíquota de um mililitro do sobrenadante foi tomada e submetida a diluições sucessivas 10^{-1} até 10^{-8} . As diluições 10^{-4} a 10^{-8} foram plaqueadas para a determinação do NMP

Para a determinação dos heterótrofos totais (NMP-HT), a amostra de cada posto de combustíveis foi organizada em quintuplicata por cada diluição de 10^{-4} até 10^{-8} , em placa de microtitulação (poliestireno, marca Costar® 3599 da Corning®), de 96 poços de fundo plano com volume de poço 360 µL. Em cada poço foram colocados 20 µL das diluições 10^{-4} até 10^{-8} e 80 µL de meio líquido nutritivo (MLN) para um volume total de 100 µL (Figura 2). As placas foram tampadas e incubadas por 24 horas a 27°C, em ausência de luz, sob agitação de 300 rpm. Após esse tempo foram colocados 20 µL de uma solução a 1% de 2,3,5-trifenil tetrazolio (JOHNSEN *et al.*, 2005).

O número de unidades formadoras de colônia (UFC) nos poços foi determinada utilizando a calculadora EPA (USEPA, 2012) que usa como entradas a quantidade de diluições, o volume do inóculo usado para a diluição e o número de diluições que apresentaram crescimento celular. O crescimento foi determinado pelo método do 2,3,5 trifenil tetrazolio. Este composto age como acceptor de elétrons na cadeia respiratória e por ser

um corante de oxi-redução, apresenta-se incolor na forma oxidada e ao ser reduzido pela liberação de H^+ pelas desidrogenases, forma um composto avermelhado, o trifenil formazan insolúvel em água que indica atividade metabólica (FRIEDEL *et al.*, 1994). Para calcular o NMP de heterótrofos totais (HT) e de degradadores de hidrocarbonetos (DH) foi utilizado o método de Klee (1993) e da USEPA (2012) com um nível de 95% de confiança, com uma quintuplicata por cada diluição. Esse método calcula o valor do NMP tendo em conta as entradas descritas acima.

Figura 2 - Desenho das placas de microtitulação com a distribuição das quintuplicatas de cada uma das diluições das amostras. Em ordem descendente a primeira diluição é 10^{-4} até 10^{-8} para a determinação do NMP-HT e NMP-DH. Os poços externos, marcado com um "X" foram preenchidos como MLM para diminuir o efeito de borda e a evaporação das unidades experimentais.



A determinação do número de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos (NMP-DH) foi feita no mesmo tipo de placa, com uma quintuplicata por cada diluição de 10^{-4} até 10^{-8} . Em cada poço foram colocados 20 μ L das diluições 10^{-4} até 10^{-8} e 80 μ L de uma solução 2% de querosene em meio líquido mineral (MLM) para um volume total de 100 μ L (Figura 2**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). As placas foram tampadas e incubadas por 48 horas a 27°C, em ausência de luz e com agitação de 300 rpm. A presença de unidades formadoras de colônia (UFC) nos poços foi determinada pelo método da atividade das desidrogenases com o cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazolio descrito acima.

2.3.4 Análises estatísticas

Procurou-se determinar a existência de relações estatísticas entre características físico-químicas das amostras e o número mais provável de unidades formadoras de colônia totais e degradadoras de hidrocarbonetos. Para isso, foi feita uma análise de regressão linear simples entre os valores obtidos para características granulométricas, as concentrações de macronutrientes e de micronutrientes com o número mais provável de bactérias heterótrofas totais e heterótrofas degradadoras de hidrocarbonetos. Foi utilizado o software Statistica 8®.

2.3.5. Isolamento de cepas bacterianas degradadoras de hidrocarbonetos

Diferentes estudos mostram o querosene como um composto adequado para avaliar a degradação de hidrocarbonetos por bactérias (GOUDA *et al.*, 2007; AGARRY *et al.*, 2010; BACOSA *et al.*, 2010).

O isolamento das cepas bacterianas, duas por posto de combustível (as de mais rápido crescimento), foi feito pelo método de esgotamento por estrias em placas de petri segundo Benson (2002) com meio sólido mineral (MSM) e querosene 2%. O critério de seleção das cepas foi o de crescimento mais rápido. As cepas selecionadas foram obtidas das diluições 10^{-8} (item 2.3.3.).

Os meios utilizados para os estudos de crescimento e avaliação da degradação dos hidrocarbonetos foram:

Meio líquido mineral (MLM). Foram preparadas as soluções A e B em concentração 10X de acordo com Viñas (2005) e Hareland *et al.* (1975) assim:

- *Solução estoque A (concentração 10X):* em 800 mL de água estéril se colocaram 42,5 g de K_2HPO_4 , 10,0 g de KH_2PO_4 e 20,0 g de NH_4NO_3 com agitação vigorosa até diluição total dos solutos, completando volume até 1.000 mL, o pH foi ajustado em $7,0 \pm 0,1$.

- *Solução estoque B (concentração 10X).* em 800 mL de água estéril destilada se colocaram 2,0 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,12 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,03 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,03 g de $ZnSO_4$; 0,1 g de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 1,23 g de ácido nitrilotriacético e agitados vigorosamente até diluição, depois foi completado o volume até 1.000 mL, ajustou-se o pH em $7,0 \pm 0,1$.

- *Meio sólido nutritivo (MSN) e Meio líquido nutritivo (MLN)*. Os meios MSN e MLN foram preparados segundo Viñas (2005) contendo glicose, 2,0 g; NaCl, 10,0 g; triptona ou bactopectona, 10,0 g e extrato de levedura, 5,0 g. Suspendidos em 800 mL de água destilada, o volume foi completado até 1000 mL. Para o preparo do MSN foram acrescentados 15 g de ágar. O pH foi ajustado para $7,0 \pm 0,1$.

A esterilização dos meios e soluções foi feita em autoclave por 20 minutos a 1,0 atm. e 120°C . Os meios e soluções não autoclaváveis foram esterilizados por filtração com membrana de $0,22\ \mu\text{m}$ de diâmetro de poro. Depois de esterilizadas foram mantidas em refrigeração até uso. Para evitar contaminação com resíduos de matéria orgânica, a vidraria foi sonicada por 15 minutos com sabão alcalino e enxaguado com abundante água deionizada.

Os reagentes utilizados foram comprados da Sigma-Aldrich® e da Analítica®, em grau analítico. O querosene foi de grau comercial adquirido no mercado.

2.3.6. Nomenclatura às cepas bacterianas

Obtenção das culturas puras. As diluições 10^{-8} (item 2.3.3.), de cada posto de combustível, foram plaqueadas por método *pour plate* ou em superfície e incubadas a 27°C , foram selecionadas duas colônias e feitas repicagens sucessivas de culturas em meio sólido mineral (MSM) e fenol em concentração $100\ \text{mg L}^{-1}$ até se obterem as culturas puras. Para cada cepa foi dada uma nomenclatura própria do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada e o Grupo de Pesquisa em Microbiologia Ambiental e um número que foi do 001 até 010 ficando identificadas como LBMA-001 até LBMA-010. 20 criotubos (dois para cada cepa) contendo MLM e glicerol 15% segundo Hollander e Nell (1954) foram inoculados com os isolados e etiquetados para estocar freezer a -80°C .

2.3.7. Características metabólicas, morfológicas e de coloração das cepas.

A caracterização metabólica foi feita para identificar reações que requerem enzimas específicas como é o caso da catalase e os aspectos morfológicos foram feitos para determinar o alongamento –bacilos- ou esfericidade –cocos- assim como a organização ou não em arranjos multicelulares. No caso da coloração, para identificar como Gram positivas ou Gram negativas o que indica a presença ou não de parede celular.

2.3.7.1. Características metabólicas.

- Catalase. Em 10 lâminas para microscopia foi colocada uma gota de peróxido de hidrogênio e uma alíquota de cultura de bactérias. A produção de bolhas de gás indica reação positiva para este teste (BENSON, 2002).
- Teste da triptofanase (Indol). Algumas bactérias têm a capacidade de degradar o aminoácido triptofano em indol e ácido pirúvico. A presença do indol é detectada usando o reagente de Kovacs. O teste ajuda a diferenciar bactérias com metabolismos semelhantes. Tubos de ensaio de 10 mL contendo 6 mL de meio triptona (1%) foram inoculados e 24 horas depois colocadas 10 gotas de reagente de Kovacs. Uma camada vermelha indicará atividade positiva para triptofanase (BENSON, 2002).
- Produção de ácido sulfídrico. Algumas cepas bacterianas produzem ácido sulfídrico a partir do aminoácido cisteína. Esses microrganismos produzem a cisteína desulfurase. Em tubos de ensaio de 10 mL de volume colocaram-se 6 mL de meio de cultura contendo sais de ferro as quais reagem com o ácido sulfídrico. A presença de um precipitado preto será positiva para cisteína desulfurase (BENSON, 2002).
- Mobilidade. Em tubos de ensaio de 10 mL, colocaram-se 6 mL de meio sólido nutritivo contendo 2% de ágar para uma menor rigidez. A inoculação foi feita introduzindo a alça em sentido vertical no meio e retirando-a sim movimentos horizontais. O crescimento além da linha de inoculação será confirmatório de mobilidade (BENSON, 2002).
- Citrato. Em testes de degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, os ensaios de crescimento bacteriano em microplaca requerem o uso de doadores de elétrons. Johnsen *et al.* (2002) indicaram que algumas cepas bacterianas têm melhor habilidade para utilizar o citrato que o piruvato ou o succinato como fonte de elétrons. Para saber o potencial uso do citrato pelas cepas foram cultivadas em ágar Citrato-SIMMONS (BENSON, 2002).
- Comportamento do pH. Para determinar a mudança do pH do meio, foram extraídas alíquotas de 2,0 mL de cultura a cada dia e medido o pH.
- Produção de biosurfactante. Foi utilizado o método do tensiômetro de De Dunoy. Alíquotas de 5 mL de cultura foram centrifugados a 4.000 rcf por 5 minutos, e determinada a mudança na tensão superficial inicial e final do sobrenadante (COOPER e GOLDENBERG, 1987).
- Determinação do Índice de Emulsificação (IE₂₄). Neste estudo avaliou-se a presença de biosurfactante e a estabilidade de emulsões formadas em presença de querosene. As análises

foram realizadas em temperatura ambiente. O IE_{24} foi determinado, segundo Cooper e Goldenberg (1987) com modificações. Foram adicionados 2 mL de querosene em 2 mL de cultivo livre de células em tubos de ensaio, seguido por agitação em alta velocidade em vórtex durante 2 minutos. Os tubos foram deixados em repouso por 24 horas e o índice de emulsificação foi calculado através da equação:

$$IE_{24} = (\text{altura da camada de emulsão/altura total}) \times 100.$$

2.3.7.2. Características morfológicas e de coloração.

Cápsula. Algumas cepas bacterianas estão rodeadas por material gelatinoso chamado de capsula. Em uma lâmina de vidro foi colocada uma gota de solução salina estéril e adicionada uma alíquota da cultura bacteriana seguindo-se um esfregaço. Deixou-se secar à temperatura ambiente. E em uma ponta da lâmina foi colocada uma gota de tinta nankin que foi espalhada com uso de uma lâmina de vidro. Depois de secar a lâmina foi levada ao microscópio e observada com aumento de 100X com óleo de imersão (BENSON, 2002)

Forma e coloração. Para determinar a forma das células bacterianas, foram preparadas lâminas de vidro com alíquotas da cultura bacteriana e desenvolvido o método de coloração de Gram segundo Benson (2002) e observadas ao microscópio em aumento de 100X com óleo de imersão.

2.3.8. Padronização dos inóculos.

A reativação das células foi feita com duas culturas sucessivas como segue: os criotubos com as cepas bacterianas foram retirados do freezer de -80°C e colocados no freezer de -20°C por uma hora, depois colocados em geladeira em 4°C até descongelamento. Foram tomados 50 μL e colocados em Erlenmeyer de 50 mL de volume, devidamente identificados, com 20 mL de MLN. As cepas foram incubadas a 27°C e agitação de 150 rpm. O crescimento foi acompanhado pelas variações de absorbância com espectrofotômetro de luz UV visível marca Molecular Devices Spectra Max, determinadas em triplicata, em microplaca, com leituras em comprimento de onda de 600 nm. A segunda cultura foi feita com alíquotas de 50 μL da primeira cultura, quando atingiu uma absorbância $DO_{600} = 0,3$ em Erlenmeyer de 50 mL com as mesmas condições iniciais.

Para a padronização dos inóculos foi utilizada a escala de McFarland (1907). Os diferentes números dessa escala (Tabela 2) são obtidos pela mistura de soluções de cloreto de bário diidratado e ácido sulfúrico.

A turbidez da solução feita com estes dois compostos é medida por espectrofotometria e é usada como padrão. O número 0,5 da escala é preparado com 0,05 mL de 1,175% de cloreto de bário diidratado ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 9,95 mL de solução 1% de ácido sulfúrico (H_2SO_4) (MCFARLAND, 1907).

Tabela 2 - Escala de McFarland em cubeta

Padrão				
No	D.C.*	Absorbância**	$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ mL	H_2SO_4 mL
0,5	1,5	0,08 – 0,1	0,05	9,95
1	3,0	0,257	0,1	9,9
2	6,0	0,451	0,2	9,8
3	9,0	0,582	0,3	9,7
4	12,0		0,4	9,6

* D.C.: Densidade celular aproximada $\times 10^8$ UFC mL^{-1} .

**Absorbância 600 nm em cubeta de 1,0 mL

2.3.9. Determinação do efeito da temperatura e do pH na curva de crescimento

Testes de temperatura. Erlenmeyers contendo 20 mL de MLN, pH $7,0 \pm 0,1$ foram inoculados com 10 μL de cultura das cepas bacterianas com $\text{DO}_{600} = 0,1$ e incubados a 27°C , 30°C e 33°C . Um Erlenmeyer com MLN sem inóculo foi utilizado como branco. A cada duas horas, em câmara de fluxo, foram extraídas alíquotas de 100 μL e determinada, em triplicata, a absorbância em 600 nm em espectrofotômetro Molecular Devices SpectraMax. As placas de microtitulação foram de 96 poços de fundo plano, volume poço 360 μL , poliestireno, marca Costar® 3599 da Corning® (JOHNSON *et al.*, 2005).

Testes de pH. Erlenmeyers contendo 20 mL de MLN, pH $7,0 \pm 0,1$ foram inoculados com 10 μL de cultura das cepas bacterianas com $\text{DO}_{600} = 0,1$ e incubados em pH 6,0; 6,5 e 7,0 a 30°C em escuridão total. A cada duas horas, em câmara de fluxo, foram extraídas alíquotas de 100 μL e determinada, em triplicata, a absorbância em espectrofotômetro em 600 nm. As placas de microtitulação foram de 96 poços de fundo plano, volume poço 360 μL , poliestireno, marca Costar® 3599 da Corning® (BENSON, 2002)

2.3.10. Testes de tolerância ao fenol

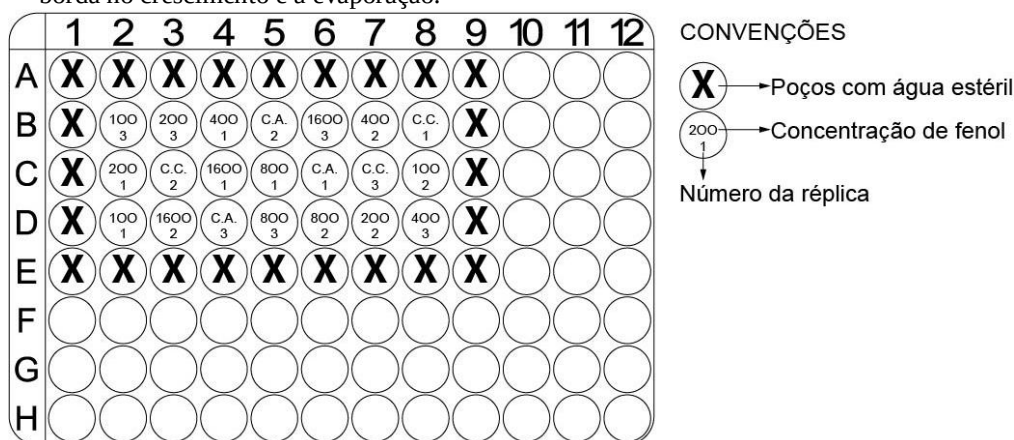
Estudou-se o efeito de concentrações crescentes de fenol sobre o crescimento das cepas. Foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços de fundo plano, volume poço 360 μL , poliestireno, marca Costar® 3599 da Corning®, pipeta 200 μL , MLN com 2% de glicose, ponteiros plásticos estéreis de 200 μL , soluções estoque de fenol 5.000 e 1.000 mg L^{-1} . As concentrações finais do fenol no meio de cultura foram 100, 200, 400, 800 e 1.600 mg L^{-1} . A descrição dos materiais colocados em cada unidade experimental está na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentrações e volumes dos reagentes em testes de tolerância em microplaca

[] Solução estoque do hidrocarboneto (mg L^{-1})	1.000	1.000	5.000	5.000	5.000
Volume da solução de hidrocarboneto (μL)	10	20	8	16	32
Volume do meio de cultura (μL)	80	70	82	74	58
Volume de inóculo bacteriano (μL)	10	10	10	10	10
Volume total cultivo (μL)	100	100	100	100	100
Volume disponível – ar (μL)	260	260	260	260	260
Concentração final de fenol nos poços (mg L^{-1})	100	200	400	800	1600

Preparo dos inóculos. No intuito de ter estabilidade e homogeneidade do inóculo, foram feitas duas culturas sucessivas das cepas em 20 mL de MLN em Erlenmeyer de 50 mL de capacidade, $T = 30^\circ\text{C}$, 150 rpm. O acompanhamento do crescimento foi feito pelo aumento na absorbância. Quando a primeira cultura atingiu a $\text{DO}_{600} = 0,3$, uma alíquota de 50 μL subcultivou-se em Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de MLN. Uma vez alcançada absorbância de $\text{DO}_{600} = 0,3$, essa segunda cultura foi utilizada como inóculo. A distribuição das unidades experimentais na placa foi completamente aleatorizada (Figura 3), a aleatorização foi feita utilizando o software Excel 2010®.

Figura 3 - Desenho de placa de microtitulação com a distribuição aleatorizada dos poços contendo as culturas com diferentes concentrações de fenol (100 até 1600 mg L⁻¹). Os poços com um "X" foram preenchidos com MLM para diminuir o efeito de borda no crescimento e a evaporação.



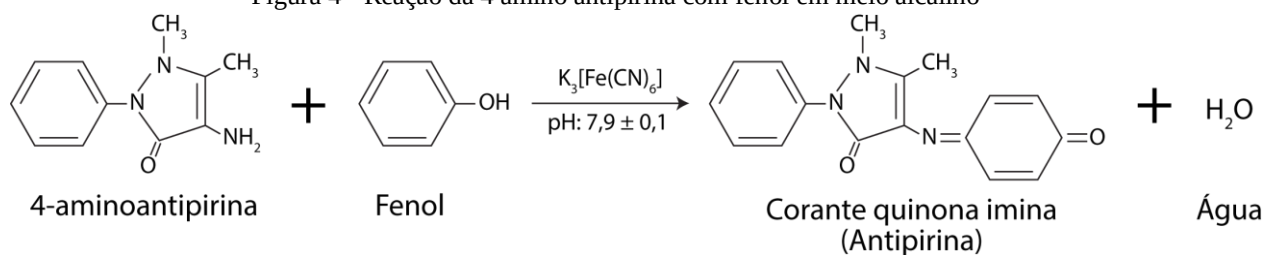
Todos os poços ao redor das unidades experimentais foram preenchidos com 300 μ L de água estéril para diminuir as perdas por evaporação de água e evitar o efeito de borda no crescimento bacteriano. A leitura em espectrofotômetro foi em 600 nm, 24 horas após a inoculação.

2.3.11. Avaliação da degradação de fenol

Delineamento experimental. Para cada cepa bacteriana foram feitas culturas em triplicata em Erlenmeyer de 100 mL de volume contendo 50 mL de meio líquido mineral (MLM), pH 7,0 $\pm$ 0,1 com fenol a 120 mg L⁻¹, um controle abiótico (ausência de inóculo) com MLM e fenol a 120 mg L⁻¹, um controle biótico (ausência de fenol) com MLM e a cultura teste. A temperatura de incubação foi 30 °C e 150 rpm de agitação.

Para acompanhar as variações da concentração do fenol nas culturas foi utilizado o método da 4-aminoantipirina o qual é baseado na determinação espectrofotométrica da formação da antipirina (EMERSON, 1943; ETTINGER *et al.*, 1951), derivado colorido imino quinona que resulta da reação do resíduo de fenol e a 4-aminoantipirina em presença do ferricianeto de potássio em pH 7,9 $\pm$ 0,1 (Figura 4). A concentração da antipirina foi determinada por leitura em espectrofotômetro em 500 nm de comprimento de onda (FAUST, 1967; APHA *et al.*, 1999).

Figura 4 - Reação da 4 amino antipirina com fenol em meio alcalino



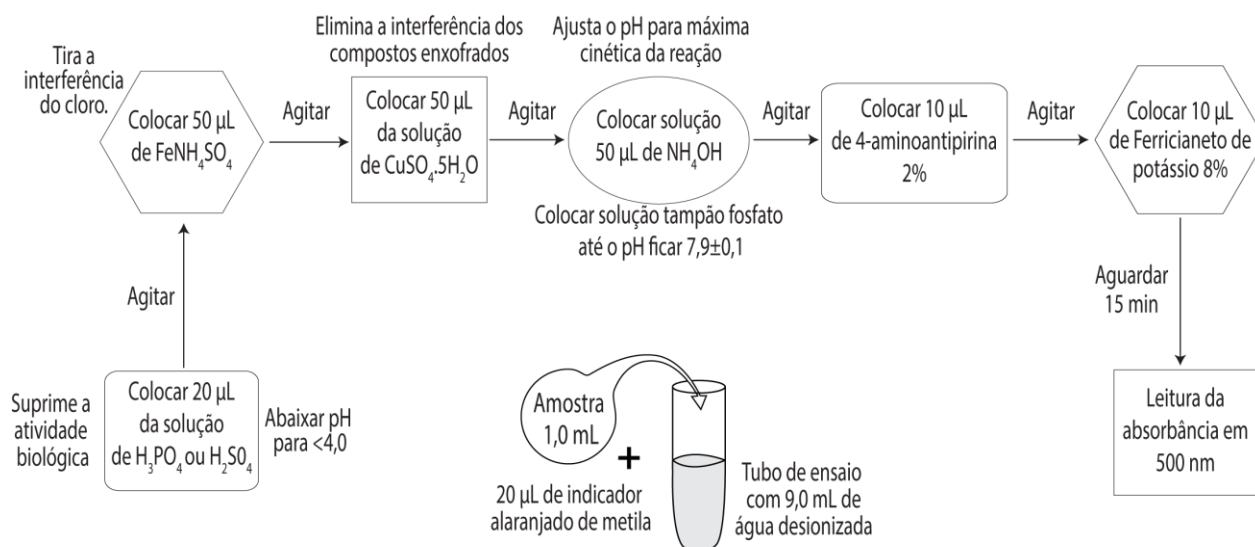
Método da 4-aminoantipirina.

Reagentes. Solução de ácido sulfúrico a 1N; solução de ácido fosfórico a 10%; indicador laranja de metila a 0,05%; solução tampão fosfato (10,45 g K_2HPO_4 + 7,23 g KH_2PO_4 em 100 mL de água deionizada); solução de sulfato de cobre a 10%; solução de sulfato ferroso amoniacal a 0,22%; solução de ferricianeto de potássio a 8%; solução de 4-aminoantipirina a 2%; solução de hidróxido de amônia a 0,5N; solução de fenol a 1.000 mg L^{-1} . Todas as soluções foram preparadas e mantidas em frascos âmbar.

Curva analítica. Em tubos de ensaio de 15 mL foram preparadas triplicatas de 10 mL de sete soluções padrão de fenol: 1,2; 2,4; 3,2; 4,8; 6,4; 8,0 e 9,6 mg L^{-1} usando a solução de fenol 1.000 mg L^{-1} . Acrescentou-se 20 μL de solução de H_3PO_4 para abaixar o pH para $< 4,0$; 20 μL de alaranjado de metila foram usados como indicador do pH; colocaram-se 50 μL de FeNH_4SO_4 com agitação seguido de 50 μL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sob agitação. Foram acrescentados 50 μL de solução NH_4OH 0,5 N e 10 μL da solução a 2% de 4-aminoantipirina e 10 μL de ferricianeto de potássio 8% e deixou-se completar a reação por 15 minutos, sempre com agitação. Após esse tempo foi feita a leitura em espectrofotômetro em 500 nm de comprimento de onda.

Concentração de fenol nas amostras de cultura. Em tubos de ensaio de 15 mL de volume, foram preparadas 11 triplicatas de 9,0 mL de água destilada. Dez triplicatas para as cepas bacterianas e uma triplicata usada como branco com 1,0 mL de meio líquido mineral para um volume total de 10,0 mL. O tempo zero do experimento foi o início da cultura e depois a cada 2 horas foram coletadas 3 alíquotas de 1,0 mL de cada cultura e colocadas nas triplicatas respectivas. Acrescentaram-se 20 μL de solução de H_3PO_4 para abaixar o pH para $< 4,0$; 20 μL de alaranjado de metila; 50 μL de FeNH_4SO_4 , 50 μL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 50 μL de solução NH_4OH 0,5 N, 10 μL da solução a 2% de 4-aminoantipirina e 10 μL de ferricianeto de potássio a 8% deixou-se completar a reação por 15 minutos, sempre sob agitação. Após esse tempo uma alíquota de 1,0 mL foi colocada em cubeta plástica e feita a leitura em espectrofotômetro em 500 nm de comprimento de onda (Figura 5).

Figura 5 – Modelo conceitual do método da 4 amino antipirina (APHA, 1999; Faust, 1967)



2.3.12. Identificação das cepas por técnicas de biologia molecular

A identificação foi feita pelo método de amplificação do gene e clonagem em células quimio-competentes de *E. coli* DH5 α , kit de extração de DNA Ultra Clean Microbial DNA Isolation® da MoBio Laboratories, primers 27F1, 1494Rc, M13F, Sp6R, 357F e 704R, GelRed®, termociclador Veriti 96 well da Applied Biosystems (Life Technologies).

2.3.12.1. Cultura de células competentes de *Escherichia coli* DH5 α ™.

Em tubo Falcon® estéril de 50 mL contendo 10 mL de MLN, foram inoculadas células de uma colônia isolada de *E. coli* DH5 α ™ crescidas em placas de Petri, MSN, repicada pelo método de esgotamento por estrias. A incubação foi a 37°C, 14-16 horas, sob agitação constante de 200 rpm. Após a incubação, em outro tubo Falcon® de 50 mL contendo 25 mL de MLN, foram inoculados 100 µL da pré-cultura e incubado a 37°C, sob agitação de 200 rpm, até absorbância de 0,38 – 0,40 a 550 nm e, em seguida, manteve-se no gelo por 10 minutos. O tubo foi centrifugado 4.000 rcf por 5 minutos, a 15°C. O pellet foi descartado e as células precipitadas ressuspensas com ½ volume de CaCl₂/glicerol gelado [25 mL (volume inicial) – 3 mL (usado para a curva de crescimento) = 22 mL, portanto usados 11 mL de

CaCl₂] e mantidas no gelo por 15 minutos. O foi centrifugado a 4000 rcf por 5 minutos a 15°C, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspendido com com 1/5 do volume de CaCl₂/glicerol gelado [25 mL (volume inicial) – 3 mL (usado para a curva de crescimento) = 22 mL, portanto usados 4,4 mL de CaCl₂] e aliqotado (~50 µL) em tubos Eppendorf de 1,5 mL (mantidos no gelo). As células foram mantidas em freezer a -20°C e -80° até sua utilização (HANAHAN, 1983).

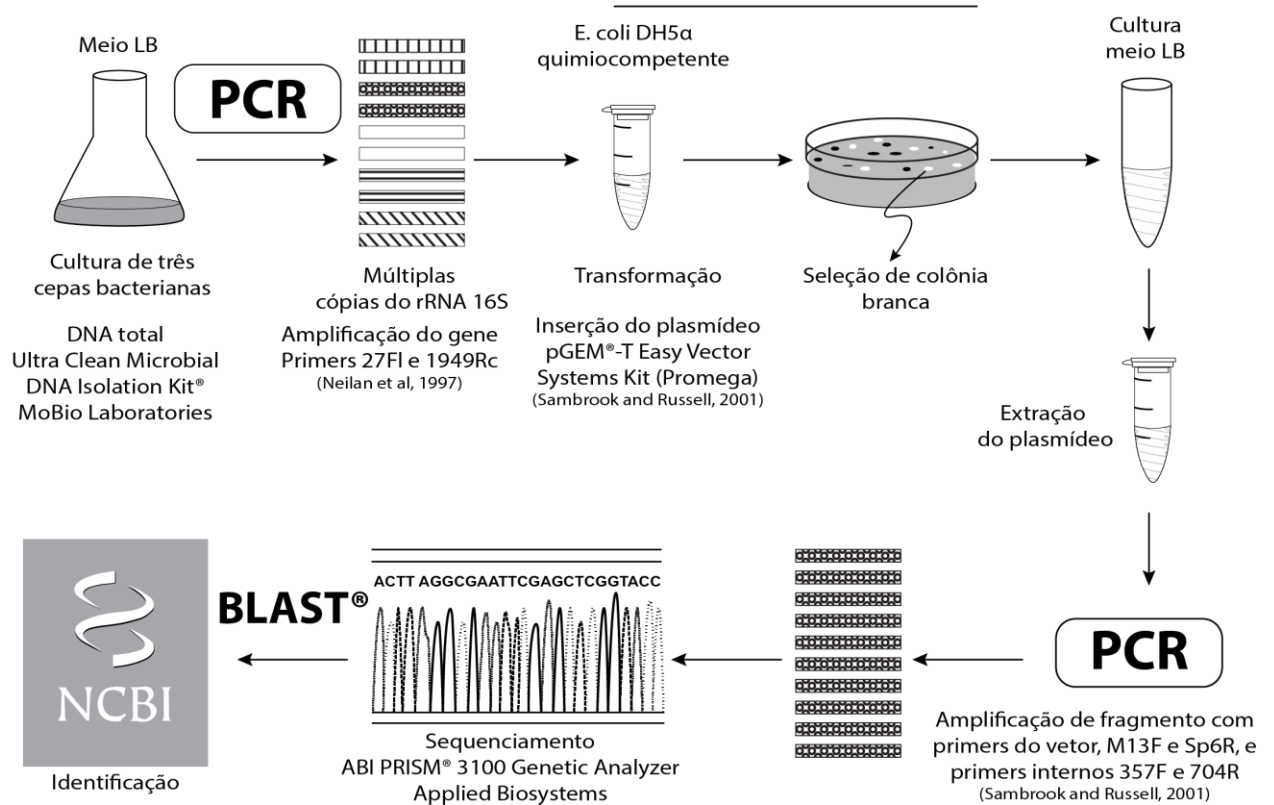
2.3.12.2. Obtenção dos ácidos nucleicos

100 µL das cepas crioconservadas, prévio processo de descongelação, foram inoculadas em Erlenmeyer de 50 mL de capacidade contendo 10 mL de MLN e cultivadas a 30°C, 150 rpm, escuridão total. Após atingir DO₆₀₀=0,1 em microplaca, foram repicadas em outro Erlenmeyer de 50 mL com 10 mL de MLN. Quando alcançaram DO₆₀₀=0,1, foram retiradas alíquotas de 2,0 mL e centrifugadas a 4.000 rcf por 5 minutos a 4°C. A extração do DNA genômico foi feita usando o protocolo do Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit® da MoBio Laboratories. (Figura 6).

2.3.12.3. Amplificação do gene 16S rRNA

A amplificação da região do gene 16S rRNA, foi pela técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR), utilizando os primers 27Fl (5'-TAG TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3') e 1494Rc (5'-TAG CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3') (NEILAN *et al.*, 1997) empregando um ciclo térmico com começo em 94°C por 2 minutos seguido de 30 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 15 segundos e 72°C por 45 segundos. A extensão final teve 5 minutos a 72°C. (Figura 6).

Figura 6 - Método de biologia molecular para a identificação das cepas bacterianas



2.3.12.4. Transformação e clonagem

O fragmento amplificado de rDNA foi ligado em um vetor (plasmídeo) usando os primers M13F (5'-GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG A-3') e Sp6R (5'-AAT TAG GTG ACA CTA TAG AA-3'). A transformação da *E. coli* DH5α foi com a inserção do plasmídeo por choque térmico. A seleção das bactérias recombinantes foi feita por clonagem em meio sólido LB. As unidades formadoras de colônia (UFC) brancas são as que contêm o inserto, por tanto, foram selecionadas e cultivadas em meio LB líquido durante 24 horas. Uma alíquota de (1 mL) da cultura foi utilizada para a extração do vetor (plasmídeo). A amplificação foi feita pela técnica de PCR utilizando os primers internos 357F (CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') e 704R (TCT ACG STA TTC ACC SCT AC). Para comprovação das UFC recombinantes e descartar contaminação foi corrido um gel de agarose com GelRed® 1%. Os amplificadores positivos foram enviados a laboratório particular para identificação por sequenciamento (SAMBROOK e RUSSELL (2001) (Figura 6).

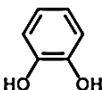
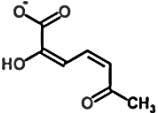
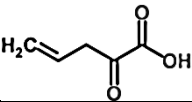
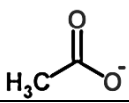
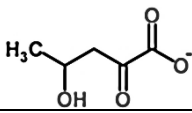
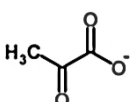
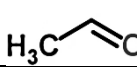
2.3.13. Análise cromatográfica do fenol, catecol e ácido cis,cis-mucônico

Segundo o reportado pelo UM-BBD (2015), todos os compostos da degradação do fenol até ácidos tricarboxílicos já estão identificados (Tabela 4 e Tabela 5). Porém, só foi possível a construção das curvas analíticas para o fenol, o catecol e o ácido cis,cis-mucônico devido a que não existem disponíveis no mercado padrões analíticos grau HPLC para os demais compostos. Nestas condições, a análise cromatográfica limitou-se a esses três compostos.

Preparo da amostra. Foram feitas culturas das cepas bacterianas em 100 mL de MLN em concentração X/10 e fenol a 120 mg L^{-1} . O inóculo foi uma alíquota de 1,0 mL de cultivo bacteriano em $\text{DO}_{600}=0,3$. A incubação foi a 30°C , com agitação de 150 rpm, em ausência de luz. A concentração celular foi acompanhada com leituras em placa de microtitulação até atingir $\text{DO}_{600}=0,1$ (aprox. 9×10^8 UFC). 50 mL do cultivo foram centrifugados a 10.000 rcf por 4 minutos a 4°C . Os pellets celulares foram lavados duas vezes com 5 mL de solução 0,85% de NaCl, pH $7,0 \pm 0,1$ e ressuspensos em tubos de ensaio estéreis de 10 mL. Foram submetidos três vezes a ultrassom 40% de amplitude por 25 segundos com intervalos de 15 segundos, submersas em gelo para evitar o sobreaquecimento da amostra (PETERNEL *et al.*, 2008). Os lisados foram centrifugados e ao sobrenadante lhe foi feita extração líquido-líquido 2 vezes em quantidades iguais com acetato de etila. Os dois sobrenadantes da extração foram misturados e os resíduos aquosos extraídos com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). O material limpo foi filtrado com membrana de $0,22 \mu$ e levado a análise no cromatógrafo.

Tabela 4 - Compostos a partir da *meta*-clivagem do catecol

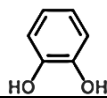
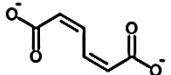
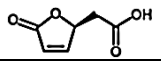
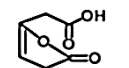
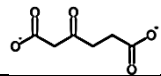
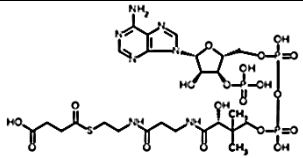
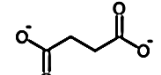
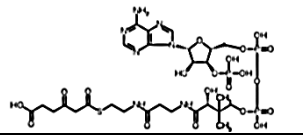
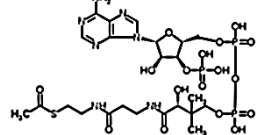
(UM-BBD, 2015)

Composto	Fórmula	T°Eb.	pKa	Massa molar	Estrutura
Catecol	C ₆ H ₆ O ₂	245.5	pKa1: 9,25 pKa2: 13.0	110.1	
<i>cis,cis</i> -2-hydroxy-6-oxohept-2,4-dienoato	C ₇ H ₇ O ₄	368.2	4.4	155.12	
<i>cis</i> -2-hidroxipenta-2,4-dienoato	C ₅ H ₅ O ₃	180		113.09	
Acetato	C ₂ H ₃ O ₂	117.1	4.76	59.04	
4-hidroxi-2-oxo-valerato	C ₅ H ₇ O ₄	256.6		131.1	
Piruvato	C ₃ H ₃ O ₃	165	2.5	87.05	
Acetaldeído	C ₂ H ₄ O	20.8		44.05	

T°Eb.= Temperatura de ebulição; pKa = inverso do logaritmo da constante de acidez. (NCBI, 2015)

Tabela 5 - Compostos a partir da *orto*-clivagem do catecol

(UM-BBD, 2015)

Composto	Fórmula	T°Eb	pKa	Massa Molar	Estrutura
Catecol	C ₆ H ₆ O ₂	245.5	pKa1: 9.25 pKa2: 13.0	110.1	
<i>cis,cis</i> -muconato	C ₆ H ₄ O ₄	345	pKa1: 5.5 pKa2: 7.4	140.09	
Muconolactona	C ₆ H ₆ O ₄	-		142.1	
3-oxoadipato-enol-lactona	C ₆ H ₆ O ₄	-		142.1	
3-oxoadipato	C ₆ H ₆ O ₅	412.2	3.47	158.1	
Succinil-CoA	C ₂₅ H ₄₀ N ₇ O ₁₉ P ₃ S	-		867.6	
Succinato	C ₄ H ₄ O ₄	235.1	pKa1: 4.21 pKa2: 5.64	116.07	
3-Oxoadipil-CoA	C ₂₇ H ₄₂ N ₇ O ₂₀ P ₃ S	-		909.64	
Acetil-CoA	C ₂₃ H ₃₈ N ₇ O ₁₇ P ₃ S	-		809.57	

T°Eb.= Temperatura de ebulição; pKa = inverso do logaritmo da constante de acidez. (NCBI, 2015)

A programação do Cromatógrafo Agilent Infinity LC VL foi feita segundo Zhang *et al.* (2011) (Tabela 6).

Tabela 6 - Programação da Cromatografia Líquida para detecção de fenol, catecol e ácido *cis,cis*-mucônico

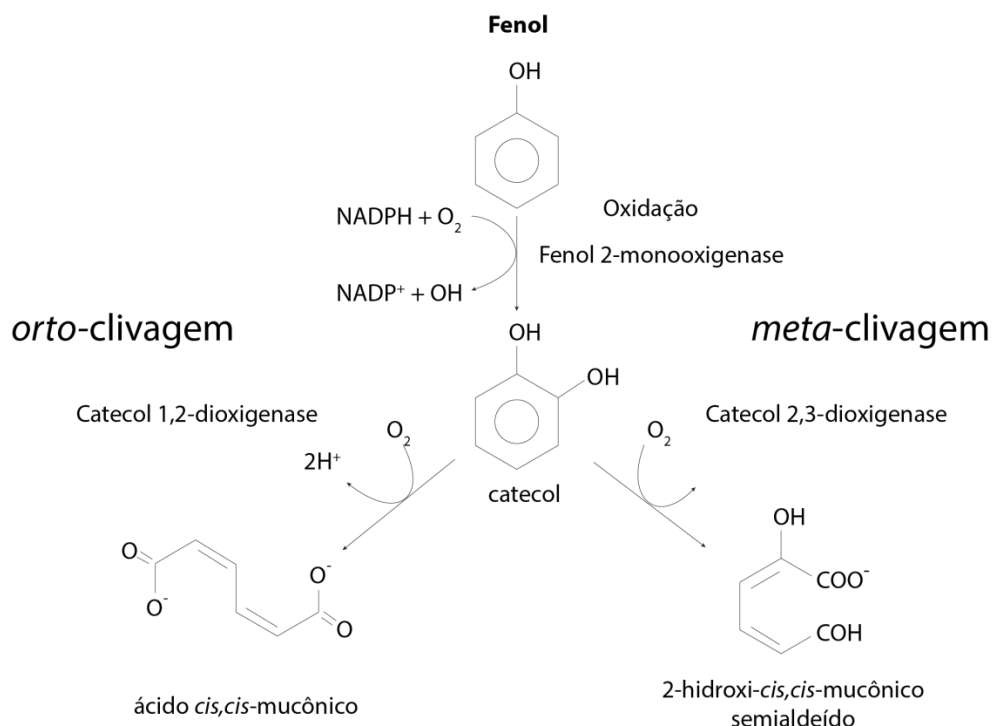
Item	Descrição
Tempo de corrida	20 minutos
Temperatura da coluna	35°C
Fluxo	1.0 mL por minuto
Volume da amostra	30 µL
Detector UV	40°C
Comprimento de onda	270
Fase móvel	A: Água MiliQ, pH 2.2 acidificada com ácido fosfórico 3M B: Acetonitrila
Coluna	C18 de fase reversa. 250 x 4.6 mm
Tamanho de partícula	5 µm

As soluções estoque de ácido *cis,cis*-mucônico em metanol e de fenol e catecol em água a 1.000 mg L⁻¹ foram conservados a 4°C. Injetou-se uma alíquota de 20 µL, da amostra padrão, em uma gradiente de concentração com 60% do componente A da fase móvel e 40% do componente B até 4,00 minutos do tempo de análise. A partir desse tempo, concentração da fase móvel passou a ser 45% de A e 55% de B permanecendo até 12,49 minutos. De 12,50 minutos até o final da análise, aos 20 minutos, a concentração passou a 80% de A e 20% de B.

2.3.14. Avaliação da atividade das enzimas catecol 1,2-dioxigenase e catecol 2,3-dioxigenase

Entre as rotas metabólicas usadas pelas bactérias aeróbias para a degradação do fenol, as de *orto*-clivagem e de *meta*-clivagem do catecol são as mais estudadas (CASPI *et al.*, 2014; UM-BBD, 2015). A enzima catecol 1,2-dioxigenase é responsável pela catálise da *orto*-clivagem na qual, a abertura do anel benzênico ocorre na ligação carbono-carbono entre os dois grupos hidroxila do catecol. A catecol 2,3-dioxigenase catalisa a *meta*-clivagem em que a abertura do anel ocorre na ligação carbono-carbono mais próxima (MADIGAN *et al.*, 2012; CASPI *et al.*, 2014) (Figura 7).

Figura 7 - Modelo conceitual da oxidação do fenol e da subsequente *orto*-clivagem e *meta*-clivagem do catecol



No processo de avaliação da atividade enzimática foi determinada a concentração total de proteína nos lisados bacterianos.

Proteína total. Foi utilizado o método de Bradford (1976) que é baseado na determinação espectrofotométrica, em 595 nm, do composto formado pelo Azul Brilhante de Coomassie G250 ligado à proteína.

Reagentes. Azul brilhante de coomassie G250 0,01% peso/volume; etanol 4,7% peso/volume e 8,5% peso/volume de ácido fosfórico e água até volume de 1.000 mL. Tampão fosfato 0,05 M pH 7,5. Seis soluções padrão de proteína 10, 20, 40, 80, 160 e 320 μg feitas com soro albumina bovina para construir a curva analítica. Extrato bruto proteico foi obtido a partir do sobrenadante do lisado bacteriano.

Procedimento. Curva analítica. Volumes de 0,1 mL das soluções de proteína foram pipetadas em tubos de ensaio de 10 mL, em triplicata. 0,1 mL de tampão fosfato 0,05 M pH 7,5 foi colocado e após 1,0 mL do Azul brilhante foi adicionado. O conteúdo foi agitado para facilitar a reação. A absorbância foi medida, após 2 minutos e antes de 1 hora de feita a mistura, em cubetas plásticas de 1,0 cm de caminho ótico, comprimento de onda 595 nm com

espectrofotômetro Molecular Devices SpectraMax. O branco foi 0,1 mL de tampão fosfato e 1,0 mL de azul brilhante.

O extrato bruto enzimático foi pipetado em triplicata em volume de 0,1 mL em tubos de ensaio de 10 mL. Foi colocado 0,1 mL de tampão fosfato 0,05 mM pH 7,5 e acrescentado 1,0 mL de Azul Brilhante; o conteúdo foi agitado para facilitar a reação. O peso da proteína na amostra foi obtido substituindo a absorbância da amostra na equação da curva analítica.

2.3.14.1. Atividade da catecol 1,2-dioxigenase, EC 1.13.11.1.

A atividade desta enzima foi determinada pelo método de Nakazawa e Nakazawa (1970) que se baseia no aumento da absorção em comprimento de onda 260 nm pela formação de ácido *cis,cis*-mucônico.

Reagentes. 10 mL de catecol 0,01 M, 10 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5; sobrenadante de lisado bacteriano; solução de fenol 5.000 mg L⁻¹; Meio Líquido Mineral (MLM) pH 7,0 ±0,1 com extrato de levedura 0,75 g L⁻¹; solução NaCl 0,85%; tampão TRIS-HCl a 0,05 M, pH 9,0. Solução H₂O₂ a 0,01%.

Obtenção do extrato bruto enzimático. O inóculo bacteriano foi obtido de cultivos das cepas com MLM fenol 200 mg L⁻¹ com DO₆₀₀ = 0,3. Quatro mL da cultura foram centrifugados, o sobrenadante descartado e o pellet ressuscitado com 2,0 mL de solução salina 0,85%, de novo centrifugado e ressuscitado com 2,0 mL de solução salina 0,85%. Após a segunda centrifugação o pellet resultante foi ressuscitado com 0,5 mL de solução salina. Em 10 Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, foram colocadas 100 mL de MLM com extrato de levedura, 4,0 mL de solução de fenol 5.000 mg L⁻¹ para uma concentração final de 200 mg L⁻¹ e inoculados com os 0,5 mL do inóculo em solução salina.

A incubação foi a 30°C, escuridão total e 150 rpm. Após 20 horas de cultivo, a cultura foi centrifugada a 4°C, 6.100 rcf por 5 minutos em centrífuga HITACHI CR22GIII Series. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com solução salina 0,85%, novamente centrifugado e o pellet ressuscitado com solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5. Uma alíquota de 2,0 mL da suspensão foi colocada em 20 mL de tampão 0,05 M TRIS-HCl, pH 9,0 e sonificados 4 vezes por 30 segundos com intervalos de 15 segundos. Os tubos sempre foram mantidos em banho de gelo. O lisado bacteriano foi centrifugado a 16.100 rcf, 4°C por 10

minutos e os pellets descartados. O sobrenadante foi conservado em gelo durante o tempo de leitura.

Determinação da atividade. De acordo com Nakazawa e Nakazawa (1970) a presença simultânea da enzima 2,3-dioxigenase interfere com a determinação da 1,2-dioxigenase. Por isto foi necessária sua inativação com uma solução a 0,01% de H₂O₂. Em dez tubos de ensaio de 10 mL de volume foram colocados 500 µL de extrato bruto enzimático e 100 µL de solução 0,01% de H₂O₂ com, no mínimo, 5 minutos de antecedência ao ensaio para inativar a enzima 2,3-dioxigenase. Após inativação, em cubeta de quartzo de 1,0 mL de volume e 1,0 cm de caminho ótico, foram colocados 0,1 mL de solução 0,01 M de catecol, 0,8 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5 e 0,1 mL de extrato bruto enzimático. A leitura foi em espectrofotômetro programado para leitura da absorbância em 260 nm por 3 minutos.

Definição de unidade e atividade específica. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade que catalisa a formação de 1,0 µmol de ácido *cis,cis*-mucônico por minuto a 24°C. O coeficiente de extinção molar de catecol para ácido *cis,cis*-mucônico utilizado foi 16.000 M⁻¹ cm⁻¹ a 260 nm sob essas condições (NAKAZAWA e NAKAZAWA, 1970).

A diluição da enzima foi 10 vezes. O cálculo da atividade enzimática (AE) foi feito usando a diferença entre a absorbância final menos a absorbância inicial dividida pelo coeficiente de extinção molar, dividido pelo tempo da reação vezes a diluição:

$$AE = (\text{Absorbância}/16.000/\text{tempo} - \text{min}) \times 10$$

2.3.14.2. Atividade da catecol 2,3-dioxigenase, EC 1.13.11.2

A enzima foi determinada pelo método de Nozaki (1970) que está baseado no aumento da absorção em comprimento de onda 375 nm pela formação de 2-hidroximucônico semialdeído.

Reagentes. 400 mL de solução tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7.5; 10 mL de solução de catecol 0.01 M. Diluir 11 mg de catecol em 10 mL de água. 10 mL de tampão fosfato 0,05 M, pH 7,5 contendo 10% de acetona.

Obtenção do extrato bruto. O procedimento foi igual ao utilizado para a catecol 1,2-dioxigenase.

Ensaio. Em cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico, foram colocado 0,1 mL da solução de catecol 0,01 M; 0,1 mL de extrato celular (sobrenadante do lisado bacteriano) e 0,8 mL de solução fosfato 0,05 M, pH 7,5. A leitura da reação é iniciada logo após colocar o extrato celular em 24°C em espectrofotômetro com absorvância em 375 nm por 3 minutos.

Definição de unidade e atividade específica. Uma unidade de enzima é a quantidade que oxida 1,0 micro mol de catecol para 2-hidroxi-mucônico semialdeído por minuto a 24°C. A diferença no coeficiente de extinção molar do catecol e o ácido 2-hidroxi-mucônico semialdeído é igual a 44.000 M⁻¹ cm⁻¹ a 375 nm sob as condições descritas (NOZAKI, 1970).

A diluição da enzima foi 10 vezes. O cálculo da atividade enzimática (AE) foi feito usando a diferença entre a absorvância final menos a absorvância inicial dividida pelo coeficiente de extinção molar, dividido pelo tempo da reação vezes a diluição:

$$AE = (\text{Absorvância}/44.000/\text{tempo} - \text{min}) \times 10$$

2.3.15. Crescimento das cepas usando fenantreno, fluoranteno e pireno

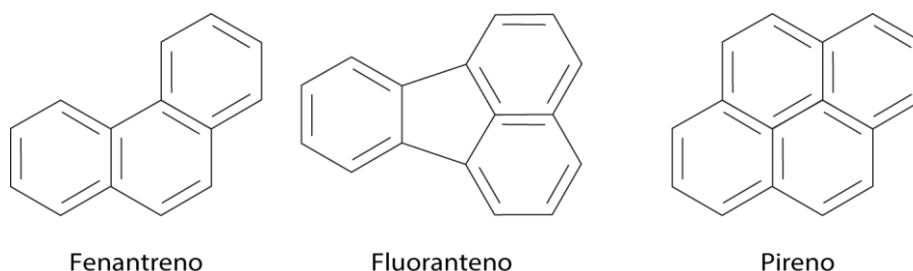
Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são formados por dois ou mais anéis benzênicos. Pelas características hidrofóbicas têm baixa tendência à degradação microbiana, o que contribui para sua persistência no meio ambiente (SIMARRO *et al.*, 2013).

Entre os HPA, o fenantreno é a molécula de menor tamanho a possuir a chamada de “região baía” que é uma concavidade formada pelo ângulo da união do anel central com os anéis laterais (Figura 8). Segundo vários autores, esta região está relacionada com a atividade carcinogênica pelo alto nível de reatividade bioquímica que essa organização da molécula (ROLAND E *et al.*, 1985; MALLICK e DUTTA, 2008), sendo por isso usado como composto modelo para o estudo do metabolismo de HPA's carcinogênicos (FIDA *et al.*, 2013).

O pireno possui quatro anéis benzênicos (Figura 8) e foi estudado como composto modelo em processos de biodegradação dada à semelhança de sua estrutura com vários HPA's carcinogênicos (KANALY e HARAYAMA, 2000). De acordo com estudos de degradação por microrganismos, o processo de quebra das moléculas de hidrocarbonetos com 4 ou mais anéis é mais difícil (JOHNSON *et al.*, 2002).

O fluoranteno é formado por três anéis benzênicos (Figura 8). Seu nome deriva da fluorescência que apresenta à luz ultravioleta e é reconhecido pela sua alta capacidade carcinogênica (USEPA, 2005)

Figura 8 - Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

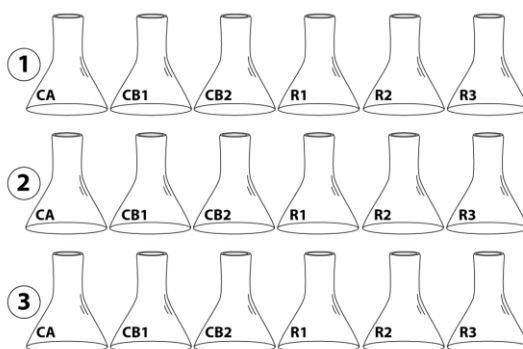


Procurou-se estabelecer a capacidade das cepas bacterianas de crescer usando esses três hidrocarbonetos poliaromáticos como fonte de carbono e energia. O método utilizado foi da atividade das desidrogenases. Essas enzimas estão envolvidas na respiração das células bacterianas e permitem determinar a atividade metabólica (JOHNSEN *et al.*, 2002; WOLINSKA e STEPNIEWSKA, 2012). Para cada uma das cepas, foram organizadas culturas em triplicata, em Erlenmeyer de 50 mL de volume total, com 20 mL de MLM e solução de cada um dos hidrocarbonetos a 50 mg L⁻¹ concentração final. Adicionalmente foram feitos controles abiótico – MLM mais hidrocarboneto sem inóculo bacteriano – e biótico – MLM com inóculo sem hidrocarboneto (Figura 9). Como indicador de atividade metabólica foi preparada uma solução a 1% de 2,3,5-trifenil tetrazolio que é um corante de oxi-redução, incolor na forma oxidada e, na presença de H⁺, reduz-se formando o composto trifênil formazan insolúvel em água, assumindo uma coloração avermelhada que indica atividade respiratória (FRIEDEL *et al.*, 1994) (Figura 9).

Após 12 dias de incubação alíquotas de 200 µL de cada unidade experimental foram colocados, em triplicata, em placa de microtitulação com 20 µL de solução a 1% de 2,3,5-trifenil tetrazolio. As placas foram tampadas e colocadas em câmara de fluxo por 3 horas e observadas para presença da cor vermelha.

Figura 9 - Planejamento experimental da degradação dos hidrocarbonetos aromático policíclicos e reação do cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazolio

①: Fenantreno, ②: Fluoranteno, ③: Pireno.



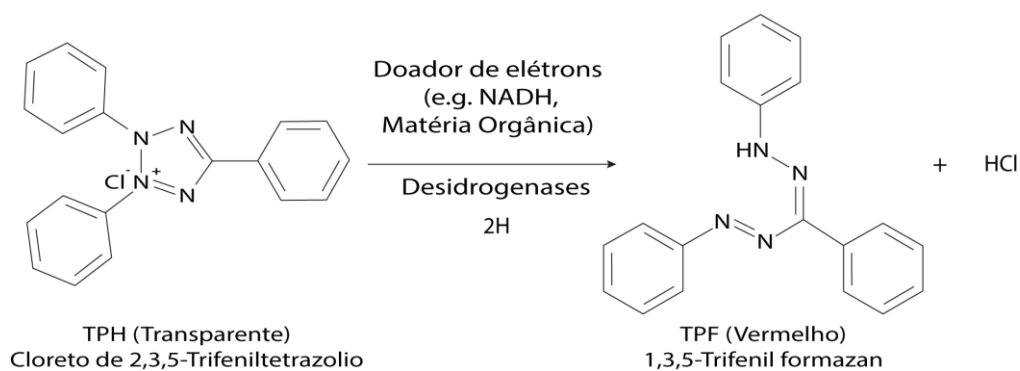
Convenções

CA: Controle abiótico, MLM, PAHs em Metanol

CB1: Controle biótico, sem PAHs, com Metanol

CB2: Controle biótico sem PAHs, nem Metanol

R1, R2, R3: Réplicas de MLM, Inóculo bacteriano, PAHs.



2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1. Análises químicas e granulométricas das amostras de solo

As análises químicas dos solos amostrados mostraram todos com pH próximo à neutralidade (6,2 a 6,9), porém, variaram com relação aos teores de matéria orgânica (10 a 44 mg/dm), fósforo e cálcio (Tabela 7) ferro, enxofre (Tabela 8) e mostraram ser solos do tipo arenoso (Tabela 9).

Tabela 7 - Concentração dos macronutrientes P, K, Ca, Mg, H+Al e Matéria Orgânica das amostras de solo de cada uma das zonas

Posto / Zona	pH em CaCl_2	MO g/dm^3	P mg/dm^3	K	Ca	Mg	H+A l mmolc/dm^3	SB	T	V %
1	6,9	38	112	2,9	184	25	7	235,4	199,4	98
2	6,2	13	127	3,6	155	29	8	187,6	195,6	96
3	6,7	44	137	2,2	238	21	12	261,2	273,2	96
4	6,3	10	47	1,3	89	20	6	110,3	116,3	95
5	6,4	27	64	1,3	258	22	10	281,3	291,3	97

Onde: $\text{g/dm}^3 = \% \times 10$ - $\text{mmolc/dm}^3 = \text{meq/100 cm}^3 \times 10$ - $\text{mg/dm}^3 = \mu\text{g/cm}^3$, M.O.: Matéria orgânica; P: Fósforo; K: Potássio, Ca: Cálcio; Mg: Magnésio; V: Percentagem de saturação por bases; T: Capacidade de troca de cátions efetiva; SB: Soma de bases trocáveis.

Tabela 8 - Concentração dos micronutrientes enxofre (S-SO₄) e alumínio (Al) nas amostras de solo de cada uma das zonas

Posto / Zona	B	Cu	Fe	Mn	Zn	S-SO ₄	Al mmolc/dm^3
1	0,23	1,9	15	3,1	15,8	5	0
2	0,29	2,3	9	2,8	10,5	2	0
3	0,43	5,2	113	7,7	175,0	8	0
4	0,18	1,1	29	4,3	11,9	3	0
5	0,26	2,5	113	4,3	23,1	27	0

Onde: B: Boro; Cu: Cobre; Fe: Ferro; Mn: Manganês, Zn: Zinco; S-SO₄: Enxofre; Al: Alumínio; $\text{mmolc/dm}^3 = \text{meq/100 cm}^3 \times 10$ - $\text{mg/dm}^3 = \text{mg L}^{-1}$

Tabela 9 - Análise granulométrica das amostras do solo – Com fracionamento de areia

Posto / Zona	Argila	Limo	Areia					Total	Classe Textural
			AMF	AF	AM	AG	AMG		
			g/Kg						
1	29	85	124	410	119	84	73	810	Arenosa
2	32	79	121	420	136	119	93	889	Arenosa
3	63	113	139	472	120	67	26	824	Arenosa
4	33	32	122	598	132	42	41	935	Arenosa
5	54	70	181	537	108	40	10	876	Arenosa

AMF: areia muito fina 0,05 a 0,1 mm; AF: areia fina 0,1 a 0,25 mm; AM: areia média 0,25 a 0,5 mm; AG: areia grossa 0,5 a 1,0 mm; AMG: areia muito grossa de 1,0 a 2,0 mm. g/Kg = % (porcentagem) x 10

2.4.2. Número mais provável de microrganismos heterótrofos totais (NMP-HT) e de degradadores de hidrocarbonetos (NMP-DH) e análises de correlação com concentrações de macronutrientes, micronutrientes e granulometria.

O número mais provável (NMP) de micro-organismos entre as amostras de solos dos cinco postos de combustíveis variou entre $1,94 \times 10^6$ a $2,48 \times 10^{10}$ bactérias g⁻¹. O NMP-DH foi menor em todos os casos ao NMP-HT (Tabela 10). A análise estatística desses dados, com aqueles das propriedades químicas e granulométricas dos solos, não mostraram correlação significativa com o NMP de micro-organismos capazes de crescer em querosene (Tabela 11); mesmo considerando fatores como teores de matéria orgânica e fosfato dos solos, que tem sido descritos como estimuladores da microbiota dos solos e da degradação microbiana de xenobióticos.

Tabela 10 - Número mais provável de Heterotróficos totais (NMP-HT) e de degradadores de hidrocarbonetos (NMP-DH) por posto amostrado

Posto	NMP-HT g ₁	NMP-DH g _{1*}
1	$2,48 \times 10^{10}$	$1,17 \times 10^{10}$
2	$1,74 \times 10^7$	$2,41 \times 10^6$
3	$3,01 \times 10^7$	$2,35 \times 10^6$
4	$2,15 \times 10^8$	$3,23 \times 10^7$
5	$1,94 \times 10^6$	$1,03 \times 10^6$

*O querosene foi o composto usado para determinar a presença de degradadores de hidrocarbonetos.

Tabela 11 - Coeficientes de correlação de macronutrientes, micronutrientes e análise granulométrica com a população de bactérias heterótrofas totais (HT) e degradadoras de hidrocarbonetos (DH)

Variável	Coeficientes de correlação	
	HT	DH
Macronutrientes		
Materia orgânica (M.O. - g/dm ³)	0.4303	0.4326
Fósforo (P - mg/dm ³)	0.2005	0.2038
Potássio (K - mmolc/dm ³)	-0.5037	-0.4606
Cálcio (Ca - mmolc/dm ³)	-0.0127	-0.0087
Magnésio (Mg - mmolc/dm ³)	0.2414	0.2441
Alumínio (H+Al - mmolc/dm ³)	-0.3766	-0.3732
Bases trocáveis (SB - mmolc/dm ³)	0.1594	0.1635
Capacidade de troca de cations efetiva (T - mmolc/dm ³)	-0.1322	-0.1281
Micronutrientes		
Boro (B)	-0.2897	-0.2866
Cobre (Cu)	-0.2570	-0.2541
Ferro (Fe)	-0.4355	-0.4337
Manganês (Mn)	-0.3855	-0.3852
Zinco (Zn)	-0.2479	-0.2465
Enxofre (S-SO ₄)	-0.2197	-0.2178
Granulometria		
Argila	-0.4860	-0.4839
Limo	0.1697	0.1736
Areia	-0.6217	-0.6246

Em que: mmol_c/dm³ = meq/100 cm³ x 10 - mg/dm³ = mg L⁻¹. A faixa de variação do coeficiente de correlação é entre 1,0 e -1,0. O valor máximo de 1,0 significa que o comportamento (aumento ou diminuição) da variável é explicado pelo aumento ou diminuição do fator respectivamente. O valor máximo de -1,0 significa efeito inverso, aumentos da variável são explicados pela redução do fator ou vice-versa.

Os dados da Tabela 11 mostraram que: 1). A matéria orgânica apresentou o maior coeficiente de correlação positivo com as populações de bactérias tanto heterotróficas totais como degradadoras de hidrocarbonetos. As variações de concentração da MO foram como carbono orgânico total – COT. 2). O ferro apresentou, entre os micronutrientes, o maior coeficiente de correlação negativo. 3). Dos elementos granulométricos, a areia apresentou o maior coeficiente de correlação negativo significando que quantidades crescentes de areia diminuiram a população de bactérias na amostra.

2.4.3. Cepas bacterianas isoladas

No uso do MLM do Hareland *et al.* (1975) apresentaram-se duas dúvidas pela presença do ácido nitrilotriacético. A primeira foi relacionada com a floculação cor alaranjado formada quando o pH do meio era ajustado para 7,0. A floculação não acontecia na presença do ácido nitrilotriacético. A cor do precipitado fez pensar na possibilidade de o ferro ficar não biodisponível. A segunda dúvida, foi sobre o possível uso pelas bactérias desse ácido como fonte de carbono e energia o que poderia gerar falsos positivos de degradação de fenol.

Avaliaram-se os efeitos da ausência e presença do ácido nitrilotriacético e do sulfato ferroso no crescimento das cepas. Foram feitos 2 ensaios assim: 1. Cultivos em triplicata com as cepas em meio líquido mineral com a composição original sem fenol; 2. Cultivos em meio líquido mineral com fenol sem o sulfato ferroso nem o ácido nitrilotriacético. O crescimento e viabilidade das cepas foi avaliado pelo método do 2,3,5-trifeniltetrazolio (JOHNSON *et al.*, 2002).

Os resultados desses ensaios mostraram que as bactérias continuaram a crescer no meio líquido mineral sem fonte de carbono e sem sulfato ferroso. Tendo em conta esses resultados o ácido nitrilotriacético e sulfato ferroso foram retirados da composição do MLM.

A partir da determinação do número mais provável de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos (NMP-DH), isolaram-se duas unidades formadoras de colônia (UFC) entre as primeiras a surgirem nos meios de cultura, com querosene, inoculados com diluição de 10^{-8} . Após crescimento dessas culturas, em meios de cultura contendo querosene em placas de Petri, foi verificada a pureza das culturas e todas as cepas foram Gram negativas. Essas cepas foram estocadas para continuidade dos experimentos de caracterização e identificação, e de estudos de degradação de hidrocarbonetos (Tabela 12).

Tabela 12 - Nomenclatura das cepas bacterianas isoladas

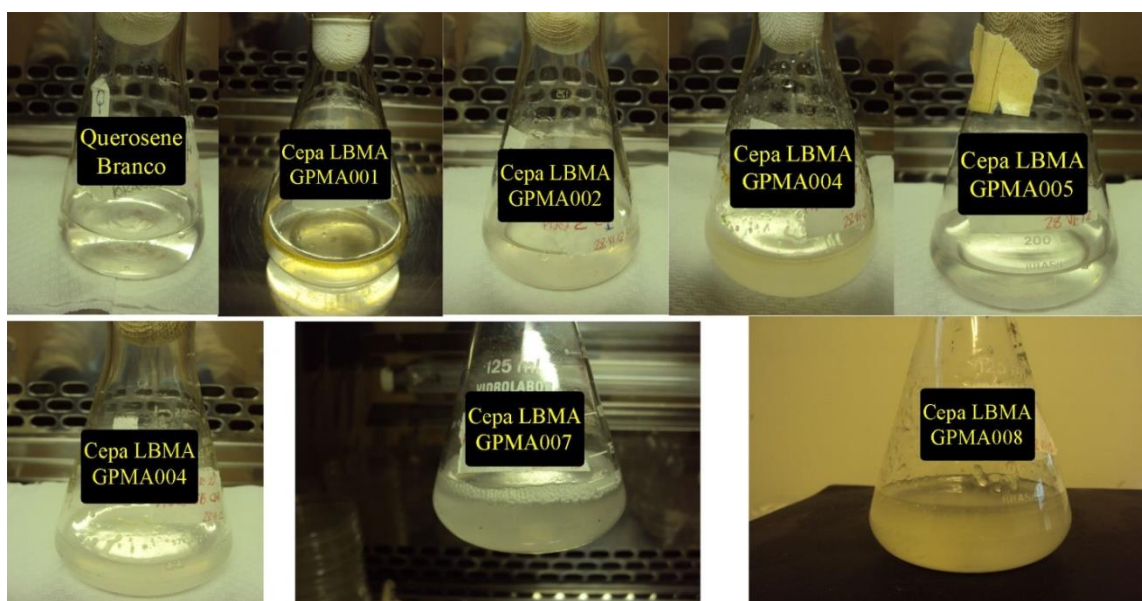
Zona/Posto	Nomeação
1	LBMA-001, LBMA-002
2	LBMA-003, LBMA-004
3	LBMA-005, LBMA-006
4	LBMA-007, LBMA-008
5	LBMA-009, LBMA-010

Onde: LBMA= Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada.

2.4.4. Caracterização bioquímica e morfológica

Os testes bioquímicos demonstraram que as dez cepas selecionadas apresentaram perfis muito semelhantes sendo catalase positivas, indol negativas, não produtoras de H₂S, produtoras de biossurfactantes e com habilidades de assimilação de citrato. Também apresentaram as mesmas características morfológicas, ou seja, Gram negativas, produtoras de cápsula e com movimento, embora a presença de flagelo não tenha sido confirmada (Tabela 13). Essas propriedades correspondem ao gênero *Pseudomonas* (GARRITY, 2005)

Figura 10 - Frascos cônicos contendo 50 mL de MLM com querosene 2%. O frasco querosene branco corresponde com o controle abiótico (ausência de inóculo). Os frascos contendo cepa bacteriana apresentaram mudança na cor. A cepa LBMA GPMA001 formou uma camada amarela na superfície do meio de cultura. A cepa 002, apresentou turvamento, a cepa 004 apresentou coloração amarela e a formação de uma camada de espuma na superfície como as cepas 004, 007 e 008. A cepa 007 turvou o meio mas não apresentou coloração amarela.



Os ensaios para presença de biossurfactantes foram realizados em meio líquido mineral (MLM) com querosene a 2% (). Todas as cepas apresentaram um índice de emulsificação de 12,5%, considerado baixo quando comparado com 25% a 67% atingido pelo *Bacillus subtilis* LAMI005 avaliado por Freitas de Oliveira *et al.* (2013)

Tabela 13 - Características bioquímicas, morfológicas e de coloração das cepas bacterianas isoladas.

Cepa	Catalase	Indol	H ₂ S	Gram	BS	pH	Cápsula	CS	Mob
LBMA-001	+	-	-	-	+	Básico	+	+	+
LBMA-002	+	-	-	-	+	Básico	+	+	+
LBMA-003	+	-	-	-	+	Básico	+	+	+
LBMA-004	+	-	-	-	+	Básico	+	+	+
LBMA-005	+	-	-	-	+	Básico	+	+	+
LBMA-006	+	-	-	-	+	Básico	+	+	+
LBMA-007	+	-	-	-	+	Básico	+	+	+
LBMA-008	+	-	-	-	+	Básico	+	+	+
LBMA-009	+	-	-	-	+	Básico	+	+	+
LBMA-010	+	-	-	-	+	Básico	+	+	+

Onde: o símbolo (+) representa uma resposta positiva e o símbolo (-) a não alteração da variável. O pH de todas as culturas foi de neutro para básico. BS: Biossurfactante; pH: alteração do pH do meio; CS: Citrato Simmons Mob. Mobilidade.

2.4.5. Efeitos da temperatura e o pH nas curvas de crescimento das cepas

Para os ensaios de temperatura e pH assim como os demais que seguiram foi feita a padronização dos inóculos com medições de absorbância na faixa de 450 nm até 700 nm. A padronização permitiu utilizar o comprimento de onda de 600 nm como referência para os testes de crescimento e o preparo dos inóculos.

Os ensaios de absorção mostraram que, 100 µL do padrão 2 de McFarland possuem uma absorbância de 0.072. Amostras de cultura bacteriana com esta absorbância em microplaca, contem 6×10^8 UFC (Tabela 14).

Tabela 14 - Determinação da escala de McFarland por absorbância em placa de microtitulação comparando com absorbância em cubeta

Padrão		A.C. 600	A.P. 600
No	D.C.	nm	nm
0.5	1,5	0,08 – 0,1	0,022
1	3,0	0,257	0,038
2	6,0	0,451	0,072
3	9,0	0,582	0,104
4	12,0		

D.C.: Densidade celular aproximada $\times 10^8$ UFC mL⁻¹, A.C.: Absorbância 600 nm cubeta de 1,0 cm de caminho ótico. A.P.: Absorbância 600 nm placa Amostras de 100 µL

Foram realizados os cultivos das cepas em meios líquidos contendo glicose para se determinar os valores de temperatura e pH ótimos para o crescimento. O pH $7,0 \pm 0,1$ e a temperatura 30 °C foram os que apresentaram melhores taxas de crescimento (Figura 11,

Figura 12, Figura 13, Figura 14 e Figura 15). A Figura 12 representa além do crescimento analisando a variável temperatura em 30°C também o comportamento com pH 7,0±0,1.

Figura 11 - Curvas de crescimento das cepas a 27 °C em MLN, pH 7,0±0,1; agitação 150 rpm

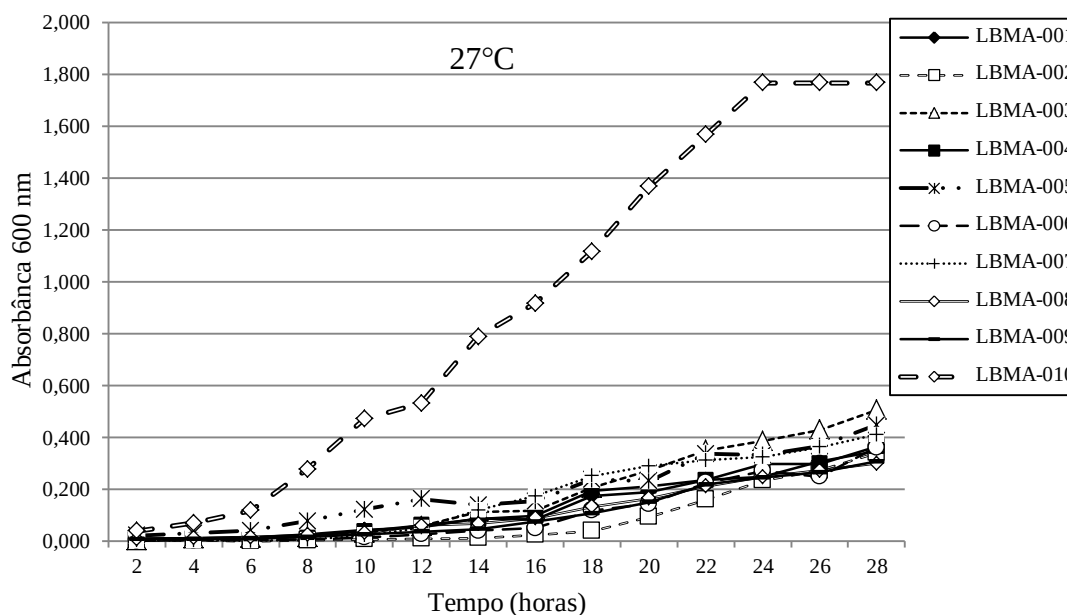


Figura 12 - Curvas de crescimento das cepas a 30 °C em MLN, pH 7,0±0,1; agitação 150 rpm

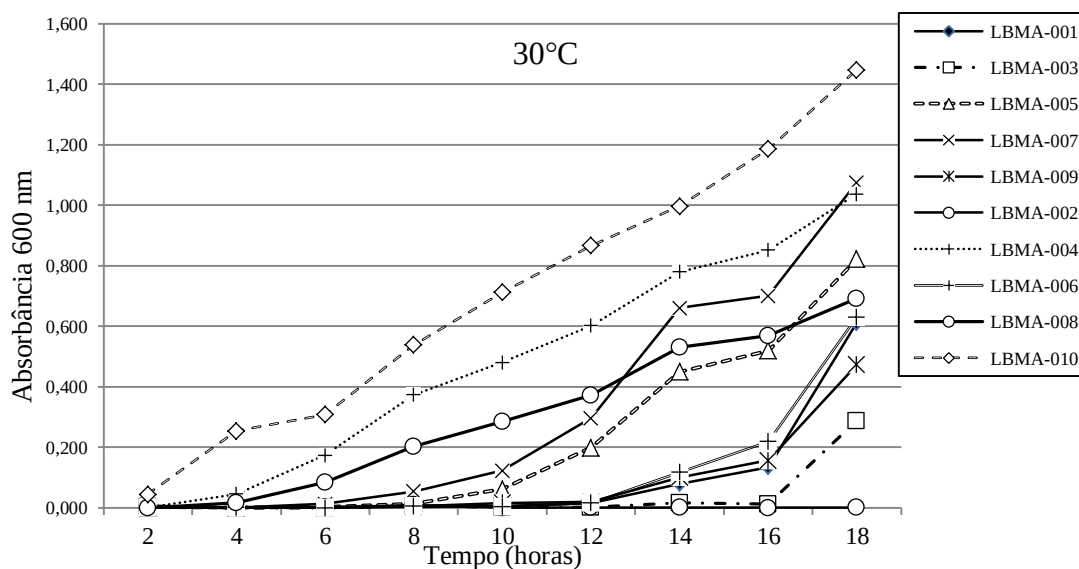


Figura 13 - Curvas de crescimento das cepas a 33 °C em MLN, pH 7,0 $\pm$ 0,1; agitação 150 rpm

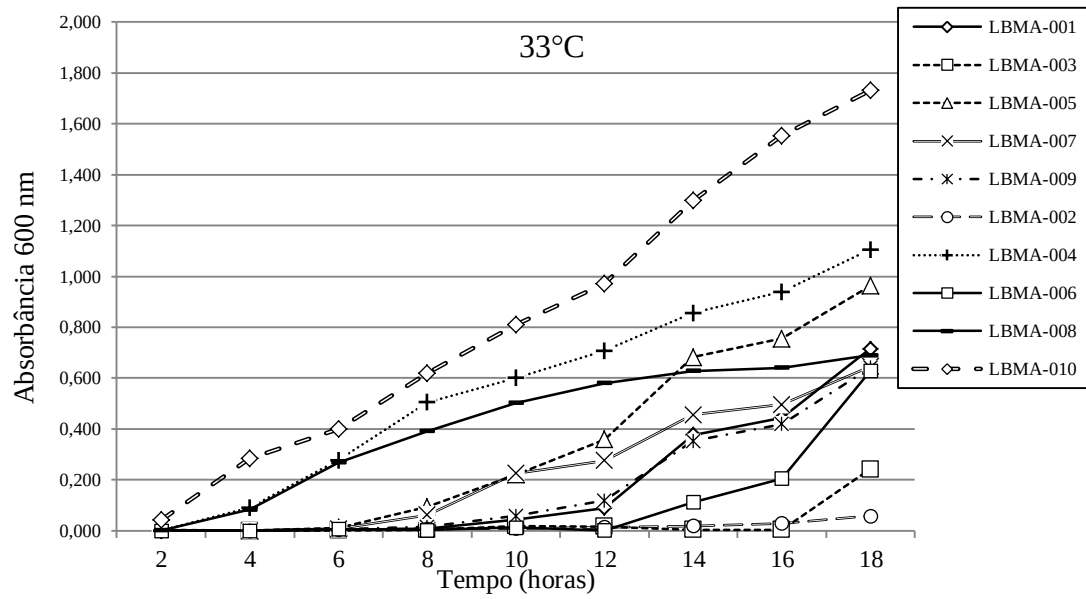
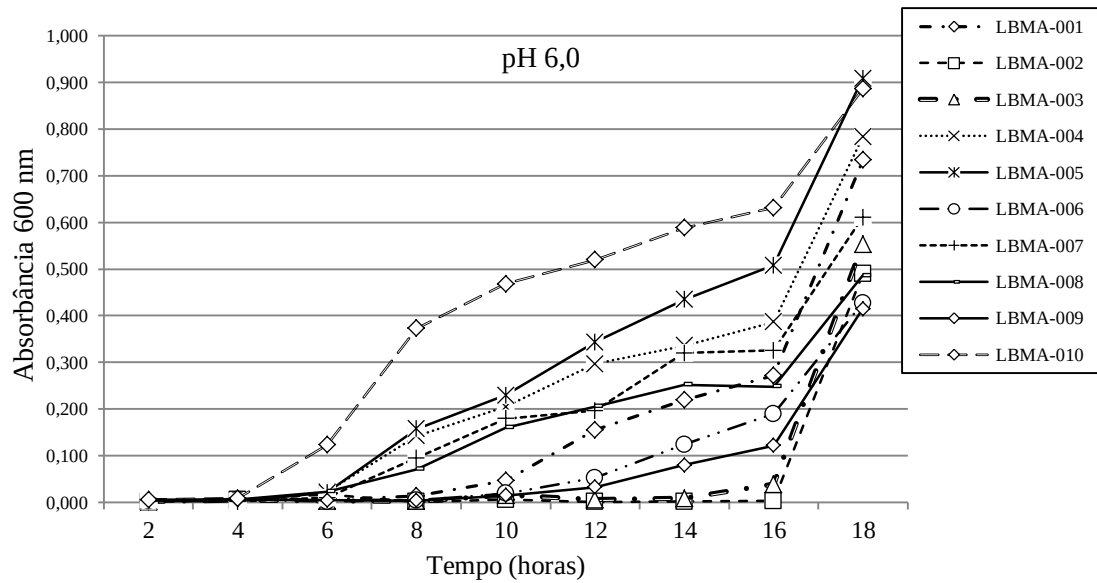
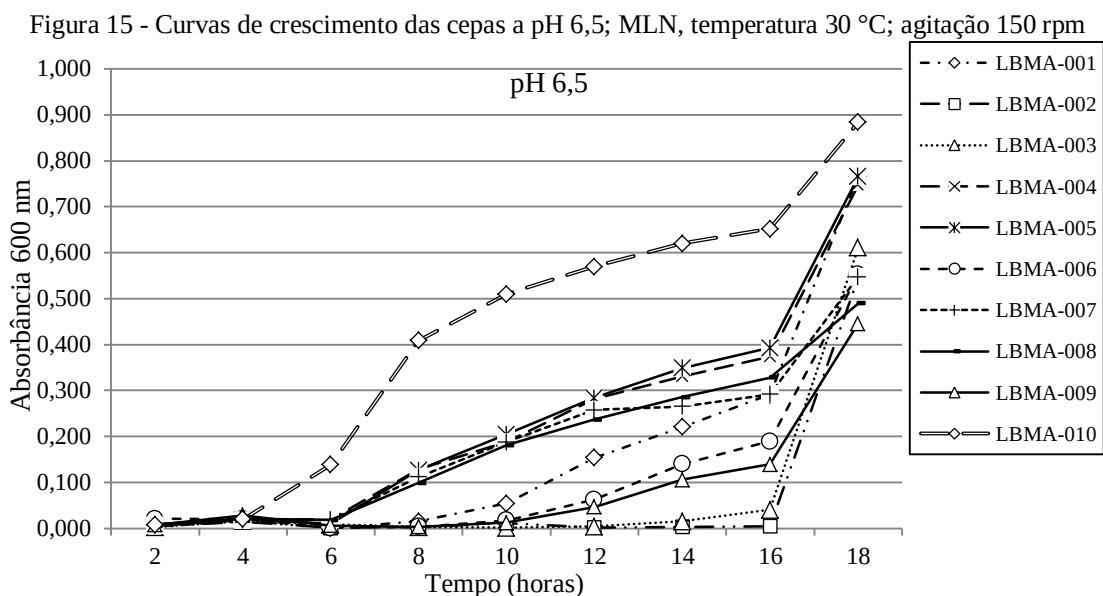


Figura 14 - Curvas de crescimento das cepas a pH 6,0 $\pm$ 0,1; em MLN, temperatura 30°C; agitação 150 rpm





Em todos os ensaios de pH e temperatura a cepa LBMA-010 mostrou o crescimento mais rápido.

2.4.6. Ensaio de tolerância

Heipieper *et al.* (1992) e Sikkema *et al.* (1995) reportaram que os hidrocarbonetos são tóxicos às bactérias pelas alterações que provocam na membrana celular. Entre elas: a perda da elasticidade, alteração do coeficiente de partição lipídeo – água, perda do equilíbrio osmótico ou pela alteração da conformação dos ácidos graxos. Na Tabela 15, listam-se algumas das características de identificação e físico-químicas do fenol segundo o NCBI (2015).

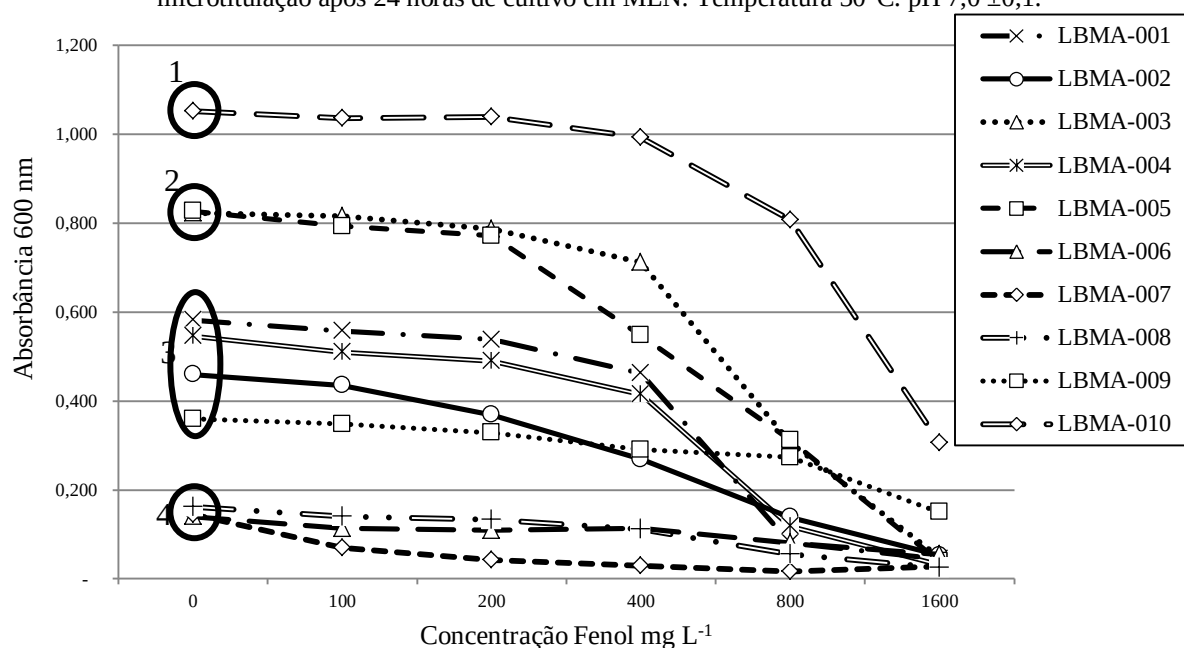
O coeficiente de partição octanol-água (Log Kow)(Tabela 15) mostra uma alta solubilidade do fenol em água o que facilitou o trabalho de preparo das soluções já que não foi necessário utilizar-se de solventes orgânicos como acontece com outros hidrocarbonetos.

Tabela 15 - Identificação e propriedades físico-químicas do fenol

CAS	108-95-2	T° ebulição	181,8 °C
Log Kow	1,46	T° Liquefação	40,9 °C
Densidade	1,06 g/mL	Ponto de fulgor	79,0 °C
Peso molecular	94.11124 g/mol	T° fusão	40,85 °C
Solubilidade Água	1 g/15 mL	pH	6,0 solução aquosa
pKa	9,9 a 25°C	Pressão de vapor	0.35 mm Hg a 25 °C

Os ensaios de tolerância ao fenol mostraram que a cepa LBMA-010 apresentou o crescimento mais rápido e a maior tolerância às concentrações testadas de fenol. Observou-se respostas de tolerância Um grupo formado pelas cepas LBMA-003 e LBMA-005, um segundo grupo LBMA-001, LBMA-004, LBMA-002 e LBMA-009 e um terceiro grupo pelas cepas LBMA-006, LBMA-007 e LBMA-008(Figura 16. Anexo 1).

Figura 16 - Absorbância das culturas bacterianas em diferentes concentrações de fenol em placa de microtitulação após 24 horas de cultivo em MLN. Temperatura 30°C. pH 7,0 $\pm$ 0,1.



O círculo 1 indica a cepa LBMA-010 que apresentou a maior tolerância ao fenol. O círculo 2 mostra que as cepas LBMA-003 e LBMA-005 tiveram um comportamento semelhante. O círculo três mostra a similitude no comportamento das cepas LBMA-001, LBMA-002, LBMA-004 e LBMA-009

A cepa LBMA-010 teve o maior crescimento e a menor sensibilidade ao aumento da concentração de fenol. No entanto, na concentração de 1.600 mg L⁻¹ houve diminuição de

70% no seu crescimento. As cepas LBMA-006, LBMA-007 e LBMA-008 apresentaram os crescimentos mais baixos e entre elas a LBMA-007 foi a mais afetada pelas concentrações crescentes de fenol (Figura 16).

2.4.7. Avaliação da degradação de fenol

Foi observado que o crescimento das bactérias em MSM com fenol a 120 mg L^{-1} como fonte de carbono e energia levou a mudanças na cor dos meios de cultivo de tons amarelo ao marrom (Figura 17). Segundo Viñas *et al.* (2005), a cor amarela do meio, decorrente da degradação do fenol, é o resultado da quebra incompleta dos hidrocarbonetos aromáticos com acúmulo de compostos intermediários gerando-se tons marrons até leitoso.

O crescimento das cepas em meio líquido mineral (MLM) com fenol a 120 mg L^{-1} comprovou a degradação do hidrocarboneto e permitiu observar o amarelamento do meio nas primeiras fases da cultura (Figura 18). Porém, com o passar do tempo novas cores foram surgindo aparecendo diferentes tons de marrom e amarelo os quais, de acordo com Zhang *et al.* (2012); e Papasotiriou *et al.* (2008), surgem pela degradação incompleta dos hidrocarbonetos.

Figura 17 - Placas de petri de 10 cm de diâmetro com 5 mL de MSM e fenol a 120 mg L^{-1} . Tempo de cultivo 24 horas. Temperatura 30°C . pH $7,0 \pm 0,1$. Os meios apresentaram mudança de cor. Tons de amarelo das cepas 002, 003, 005, 006, 007 e 009 até marrom da cepa 008 sugerem o uso de rotas metabólicas diferentes no uso do fenol como fonte de carbono e energia.

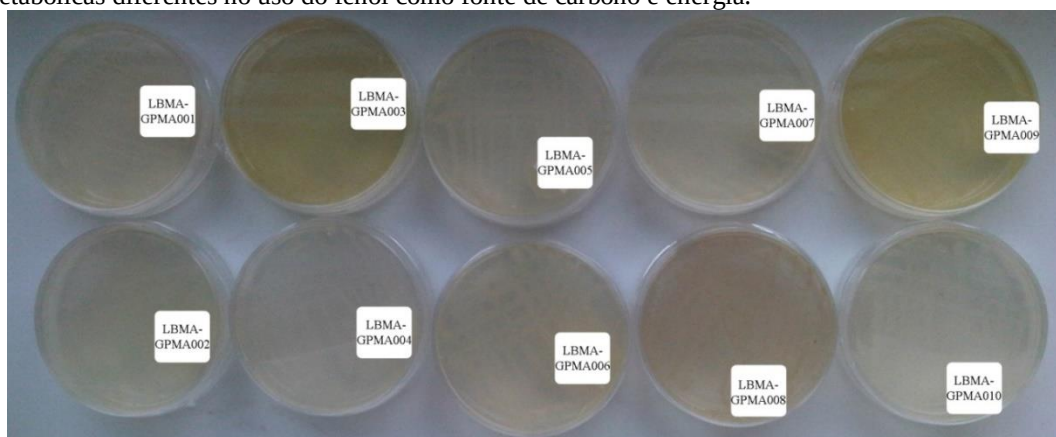
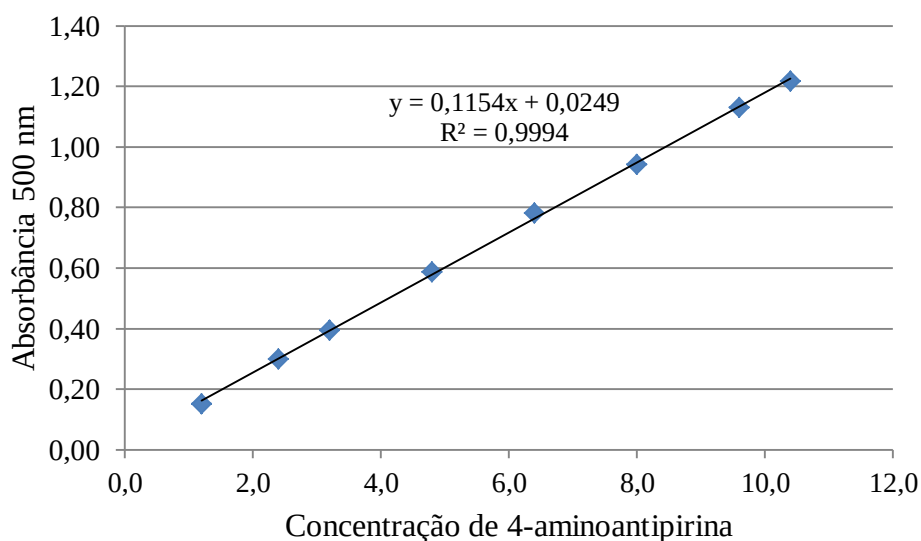


Figura 18 - Frascos de vidro de 50 mL de volume com 20 mL de MLM e fenol a 120 mg L⁻¹. Os números nas etiquetas correspondem com a cepa inoculada no frasco. Tempo de cultura 24 horas. Temperatura 30°C. pH 7,0 ±0,1. O crescimento das cepas mudou a coloração dos meios de cultura, as diferentes colorações sugerem comportamentos metabólicos diferentes.



Curva analítica da 4-aminoantipirina. Utilizando a média das triplicatas dos padrões de concentração de fenol (Anexo) obteve-se a equação da curva e o coeficiente de determinação 0,9994 que (Figura 19).

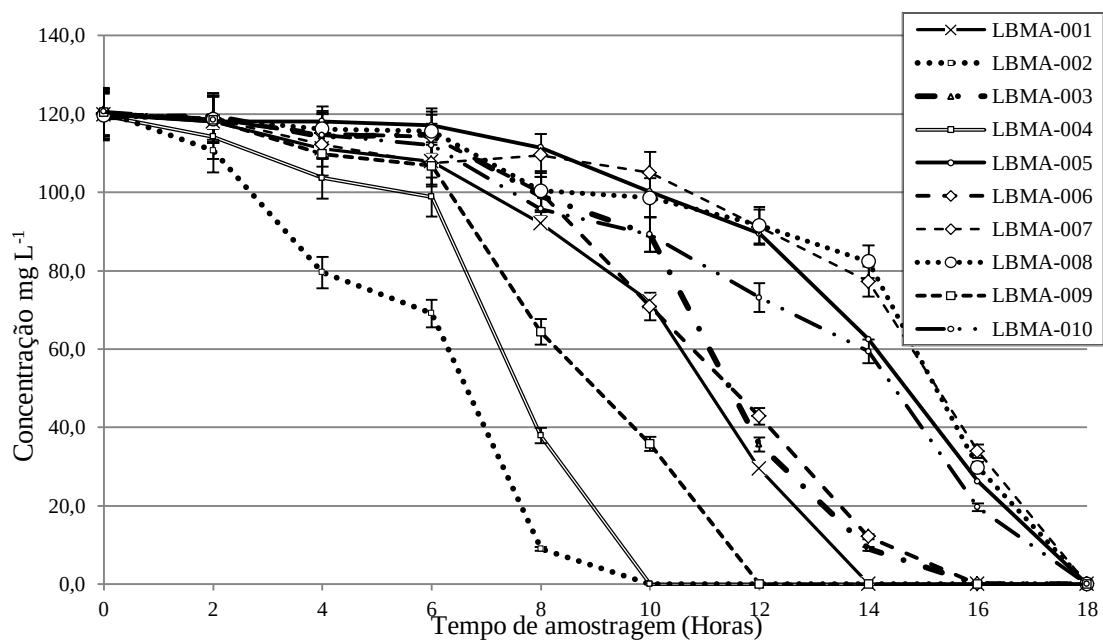
Figura 19 - Curva analítica da 4-aminoantipirina construída com os dados do anexo 3.



A partir da equação da curva foi calculada a concentração de fenol existente nas culturas usando a absorbância de triplicatas de amostras obtidas segundo procedimento descrito no item 2.3.11. As concentrações de fenol assim calculadas (Anexo 2) permitiram observar que todas demonstraram capacidade degradadora do fenol. As cepas LBMA-002 e

LBMA-004 (Figura 20) degradaram mais rapidamente o fenol (10 horas). As cepas LBMA-005, LBMA-008 e LBMA-0010 degradaram 120 mg L^{-1} em 18 horas.

Figura 20 - Curvas de degradação do fenol pelas cepas isoladas



A cepa LBMA 002 junto com a LBMA-004 mostraram a maior velocidade de degradação do fenol.

2.4.8. Identificação das cepas por sequenciamento do gene 16S rRNA

As sequências de nucleotídeos (Anexo 4) foram analisadas na base de dados GenBank® (2013) e mostraram 99% a 100% de similaridade das cepas com o gênero *Pseudomonas* sp. (Tabela 16)

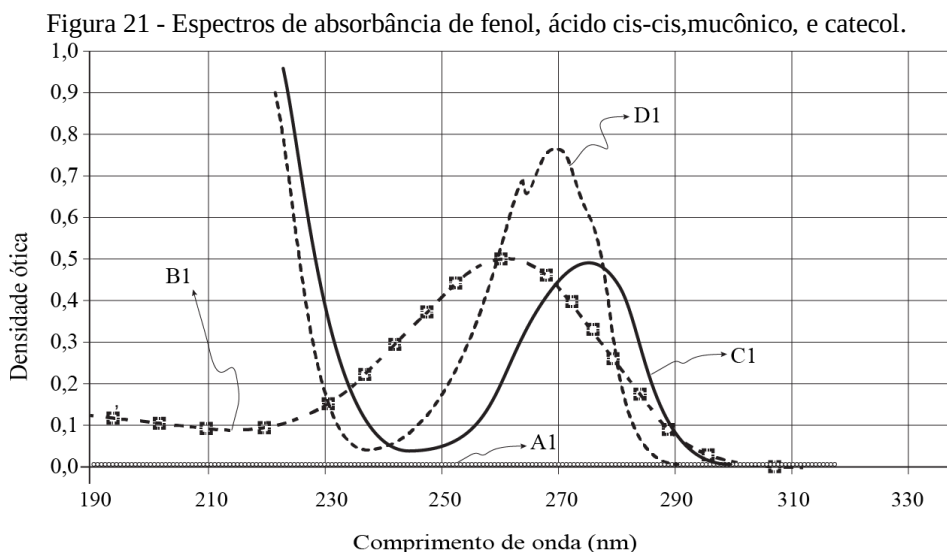
Tabela 16 - Resultado da consulta das sequências de nucleotídeos dos amplicons das cepas isoladas com a ferramenta BLAST da base de dados do NCBI

CEPA	Score	Identificação BLAST	Similaridade %
LBMA-001	2.747	<i>Pseudomonas</i> sp. wust-c gene da unidade 16S rRNA sequência parcial	99
LBMA-002	2.621	<i>Pseudomonas</i> sp. BHy79 gene da unidade 16S rRNA sequência parcial	99
LBMA-003	2.741	<i>Pseudomonas citronellolis</i> strain odb7 gene da unidade 16S rRNA sequência parcial	99
LBMA-004	2.734	<i>Pseudomonas</i> sp. EGD-AKN5 16S gene da unidade 16S rRNA sequência parcial	100
	2.734	<i>Pseudomonas</i> sp. wust-c 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
	2.756	<i>Pseudomonas</i> sp. FP1-1 gene da unidade 16S rRNA sequência parcial	100
LBMA-005	2.750	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> strain NyZ12, genoma completo	100
LBMA-007	2.671	<i>Pseudomonas</i> sp. AK_AAN5 partial 16S rRNA gene	99
LBMA-008	2.751	<i>Pseudomonas</i> sp. FM1-3 gene da unidade 16S rRNA sequência parcial	99
LBMA-009	2.772	<i>Pseudomonas putida</i> strain 31920-1 gene da unidade 16S rRNA sequência parcial	100
LBMA-010	2.771	<i>Pseudomonas</i> sp. S1-16 gene da unidade 16S rRNA sequência parcial	100

A sequência da cepa LBMA-004 mostrou score 2374 e 100% de similaridade com duas cepas bacterianas cadastradas na base de dados do NCBI.

2.4.9. Análise cromatográfica do fenol, catecol e ácido *cis,cis*-mucônico

Em espectrofotômetro SpectraMax Plus 384, placa de microtitulação, foram confirmados os comprimentos de onda dos picos de absorbância para fenol, catecol e ácido *cis-cis* mucônico (Figura 21). Este dado foi utilizado para os programas de cromatografia líquida.



Em que: A1: Controle – Acetonitrila mais água. B1: Ácidos *cis-cis* mucônico. Pico de absorbância 263 nm, C1: Catecol. Pico de absorbância 276 nm, D1: Fenol. Pico de absorbância 270 nm.

A presença de picos de absorbância com tempos de retenção menores aos compostos padrão em todos os cromatogramas evidenciaram a presença de compostos não identificados e picos de absorbância nos mesmos tempos de retenção dos padrões analíticos confirmando a presença do fenol, o catecol e o ácido *cis,cis*-mucônico. Este último de maneira mais intensa nas cepas LBMA-003, LBMA-004, LBMA-005 e LBMA-006. As demais cepas apesar de apresentarem valores de absorbância nos mesmos tempos de retenção do ácido *cis,cis*-mucônico, os valores são muito baixos quando comparados com a cepas mencionadas anteriormente (Tabela 17 e Tabela 18).

Tabela 17 - Valores de área dos picos de absorbância nas análises HPLC das culturas bacterianas LBMA-001 a LBMA-009 em MLM com fenol 120 mg L⁻¹

Retenção*	Componente	LBMA-001				LBMA-002				LBMA-003			
		4 horas	8 horas	12 horas	16 horas	4 horas	8 horas	12 horas	16 horas	4 horas	8 horas	12 horas	16 horas
2.11 - 2.20	N.I.**	31.682,5	28.492,7	0,0	111.879,9	61.576,9	70.585,9	42.415,5	42.726,5	111.173,1	0,0	14.318,0	29.113,2
2.21 - 2.30	N.I.	475.689,3	0,0	382.109,1	516.235,1	0,0	273.785,0	295.805,4	255.408,1	9.704,5	0,0	15.240,2	160.914,9
2.31 - 2.40	N.I.	64.547,3	11.680,5	98.531,0	146.745,1	26.861,6	22.452,4	20.341,3	16.019,3	40.890,0	24.921,0	14.491,6	122.499,5
2.41 - 2.50	N.I.	20.006,6	3.112,7	31.438,7	34.114,3	34.826,9	46.044,7	68.088,3	125.059,4	0,0	4.292,8	4.711,0	4.175,4
2.51 - 2.60	N.I.	0,0	0,0	57.194,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2.71 - 2.90	A. <i>cis,cis</i> - muc	2.073,5	3.713,7	2.337,2	68.284,0	4.223,5	1.792,2	5.737,5	484.775,4	357.194,0	73.929,5	155.518,2	84.732,7
3.41 - 3.50	Catecol	2.213,2	14.146,9	11.001,6	5.419,6	14.507,6	2.655,9	7.464,5	7.293,9	1.881,8	396,2	6.423,8	1.013,1
4.11 - 4.40	Fenol	9.729.538,1	7.526.926,4	5.136.542,9	1.230.642,1	9.860.338,0	7.304.874,4	5.086.880,7	1.883.982,1	9.857.173,6	7.044.493,2	5.811.953,4	1.615.439,7

Retenção*	Componente	LBMA-004				LBMA-005				LBMA-006			
		4 horas	8 horas	12 horas	16 horas	4 horas	8 horas	12 horas	16 horas	4 horas	8 horas	12 horas	16 horas
2.11 - 2.20	N.I.	48.849,8	32.677,1	51.850,7	15.502,5	0,0	20.369,5	70.658,3	0,0	66.555,1	53.588,1	45.080,2	44.171,1
2.21 - 2.30	N.I.	0,0	0,0	0,0	0,0	354.758,4	71.624,3	269.482,5	376.271,5	0,0	6.819,6	0,0	0,0
2.31 - 2.40	N.I.	10.516,8	7.071,7	10.640,5	3.086,8	61.552,4	56.040,4	21.022,1	90.422,8	8.691,3	13.058,2	7.686,3	8.083,8
2.41 - 2.50	N.I.	7.987,6	15.976,7	17.457,3	156.907,7	5.643,0	5.225,3	5.187,2	5.721,4	81.493,7	10.671,4	24.734,8	25.125,5
2.51 - 2.60	N.I.	44.238,5	0,0	36.808,3	0,0	0,0	0,0	0,0	4.272,6	0,0	35.727,9	0,0	0,0
2.71 - 2.90	A. <i>cis,cis</i> muc	435.138,2	421.852,1	524.706,6	183.636,5	120.729,5	224.813,2	156.241,5	111.656,6	353.897,7	388.358,3	477.833,5	549.352,7
3.41 - 3.50	Catecol	9.826,0	16.132,9	9.890,8	0,0	2.110,2	1.916,2	2.356,3	767,7	1.731,1	10.010,1	57.537,9	12.244,0
4.11 - 4.40	Fenol	9.153.883,0	7.614.429,7	5.181.656,4	1.820.357,9	9.618.671,2	7.830.052,5	5.659.259,6	2.415.815,6	9.882.581,6	7.236.311,0	4.993.089,6	2.311.267,4

Retenção*	Componente	LBMA-007				LBMA-008				LBMA-009			
		4 horas	8 horas	12 horas	16 horas	4 horas	8 horas	12 horas	16 horas	4 horas	8 horas	12 horas	16 horas
2.11 - 2.20	N.I.	0,0	20.369,5	70.658,3	0,0	15.462,5	50.829,5	14.561,7	46.868,5	0,0	18.012,9	0,0	16.320,9
2.21 - 2.30	N.I.	354.758,4	71.624,3	269.482,5	376.271,5	0,0	0,0	0,0	0,0	254.086,3	13.939,3	310.427,7	13.288,9
2.31 - 2.40	N.I.	61.552,4	56.040,4	21.022,1	90.422,8	3.198,5	6.145,1	5.873,3	8.633,5	166.526,6	12.934,8	82.136,8	6.624,7
2.41 - 2.50	N.I.	5.643,0	5.225,3	5.187,2	5.721,4	167.508,1	19.457,1	15.448,3	17.562,7	0,0	0,0	0,0	0,0
2.51 - 2.60	N.I.	0,0	0,0	0,0	4.272,6	2.488,5	0,0	119.184,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2.71 - 2.90	A. <i>cis,cis</i> muc	1.729,5	4.813,2	1.241,5	1.656,6	6.638,2	2.212,4	2.016,8	1.905,8	1.194,3	1.549,1	1.214,1	3.961,1
3.41 - 3.50	Catecol	2.110,2	1.916,2	2.356,3	767,7	11.341,1	28.313,4	21.150,3	22.616,6	1.161,1	5.042,4	1.421,8	10.332,9
4.11 - 4.40	Fenol	9.618.671,2	7.830.052,5	5.659.259,6	2.415.815,6	10.003.665,9	7.857.970,2	5.686.787,7	1.977.943,6	9.162.308,2	7.742.368,1	5.394.454,0	2.197.969,2

* Tempo de retenção em minutos ** N.I. Não identificado. A. *cis,cis*-muc: Ácido *cis,cis*-mucônico. As horas correspondem ao tempo de amostragem.

Tabela 18 - Valores de área dos picos de absorbância nas análises cromatográficas da culturas bacteriana LBMA-010 em MLM com fenol 120 mg L⁻¹

Retenção*	Componente	LBMA-010			
		4 horas	8 horas	12 horas	16 horas
2.11 - 2.20	N.I.**	46.426,8	41.871,1	53.666,6	40.307,5
2.21 - 2.30	N.I.	10.148,0	2.735,9	2.956,9	8.155,4
2.31 - 2.40	N.I.	10.194,5	12.951,7	24.379,0	18.205,4
2.41 - 2.50	N.I.	9.148,6	11.683,7	21.066,5	16.091,0
2.51 - 2.60	N.I.	13.902,8	131.416,2	169.072,0	85.416,6
2.71 - 2.90	A. <i>cis,cis</i> -muc	2.644,3	2.770,7	1.617,9	2.891,9
3.41 - 3.50	Catecol	5.465,6	15.468,7	11.348,8	1.972,4
4.11 - 4.40	Fenol	9.325.374,6	7.322.866,3	5.524.876,1	2.275.351,1

* Tempo de retenção em minutos. ** N.I. Não identificado. A. *cis,cis*-muc: Ácido *cis,cis*-mucônico. 4 horas, 8 horas, 12 horas e 16 horas correspondem com o tempo de cultura em que foram pegadas as amostras.

2.4.10. Análise de atividade das enzimas catecol 1,2-dioxigenase e 2,3-dioxigenase

Os ensaios de atividade enzimática utilizando catecol como substrato mostraram que as cepas com atividade da catecol 1,2-dioxigenase não apresentaram atividade detectável da catecol 2,3-dioxigenase a exceção da cepa LBMA-010 que apesar de produzir valores baixos de absorbância apresentou atividade para as duas enzimas. A cepa LBMA-009 não apresentou atividade detectável para nenhuma dessas duas enzimas (Tabela 19).

As leituras no HPLC mostraram picos de absorbância nos tempos de retenção de ácido *cis,cis*-mucônico para as cepas LBMA-001, LBMA-002, LBMA-007, LBMA-008 e LBMA-009 que não tiveram atividade enzimática detectável para 1,2-dioxigenase. Apesar dos picos estarem perto do zero à presença deles pode indicar que as cepas expressaram as enzimas só que com uma atividade não detectável com os protocolos desenvolvidos nesta pesquisa.

Tabela 19 - Valores de proteína total e atividade das enzimas catecol 1,2-dioxigenase e da catecol 2,3-dioxigenase.

Cepa	Proteína $\mu\text{g L}^{-1}$	Catecol 1,2-dioxigenase			Catecol 2,3-dioxigenase		
		260 nm Abs.	DP	AE	375 nm Abs.	DP	AE
LBMA-001	196,94	N.D.	(-)	N.D.	0,475		39,8
LBMA-002	309,16	N.D.	(-)	N.D.	0,937		82,3
LBMA-003	191,11	0,436	0,024	91,0	N.D.	(-)	N.D.
LBMA-004	132,50	0,583	0,029	121,4	N.D.	(-)	N.D.
LBMA-005	165,41	0,394	0,037	82,08	N.D.	(-)	N.D.
LBMA-006	214,02	0,154	0,031	32,08	N.D.	(-)	N.D.
LBMA-007	239,58	N.D.	(-)	N.D.	0,797		86,0
LBMA-008	194,44	N.D.	(-)	N.D.	0,254		26,6
LBMA-009	91,80	N.D.	(-)	N.D.	N.D.	(-)	N.D.
LBMA-010	259,30	0,091	0,027	18,89	0,080		7,78

Em que: DP. Desvio Padrão da triplicata de absorbâncias. Abs.: Absorbância. AE. Atividade enzimática em $\mu\text{M L}^{-1} \text{min}^{-1}$. N.D.: não detectado. (-): não calculada. O coeficiente de extinção molar da 1,2-dioxigenase foi 16.000 e da 2,3-dioxigenase foi 44.000.

Entre as cepas produtoras de 1,2-dioxigenase, destacou-se a LBMA-004 por apresentar a maior atividade enzimática e a LBMA-010 a menor. Entre as cepas produtoras de 2,3-dioxigenase, o lisado da LBMA-007 embora tivesse uma menor quantidade de proteína que a LBMA-002 apresentou uma atividade enzimática maior. A cepa LBMA-010 apresentou a menor atividade. A maior quantidade de proteína no lisado não significou uma maior atividade enzimática. O lisado da cepa LBMA-010 teve a maior concentração de proteína total entre as produtoras de 2,3-dioxigenase porém a menor atividade enzimática.

2.4.11. Características das cepas em presença de fenantreno, fluoranteno e pireno

As culturas das cepas com estes hidrocarbonetos poliaromáticos, em concentração de 50 mg L^{-1} , mostraram a formação de biofilme, floculação e mudanças de cor após 12 dias de cultivo em MLM. Foram positivas para uso do trifetil tetrazolio como aceptor de elétrons gerados pelas desidrogenases (Tabela 20, Tabela 21 e Tabela 22).

Tabela 20 - Características das cepas crescendo em meio líquido mineral com Fenantreno 50 mg L⁻¹

Cepa	Turvamento	Biofilm	Floculação	Cor cultura	TTC
LBMA-001	(-)	+	+	Transparente	+
LBMA-002	+	+	+	Transparente	+
LBMA-003	++	++	+	Amarelo	+
LBMA-004	+	(-)	+	Amarelo	+
LBMA-005	+	(-)	++	Amarelo	+
LBMA-006	+	++	++	Amarelo	+
LBMA-007	+	++	+	Amarelo	+
LBMA-008	+++	+	+	Amarelo-rosa	+
LBMA-009	+	(-)	++	Amarelo	+
LBMA-010	+++	(-)	+	Amarelo	+

(-) : Sem formação; (+): nível baixo; (++) : nível médio; (+++): nível alto.
TTC: Trifenil tetrazolio

Tabela 21 - Características das cepas crescendo em meio líquido mineral com Fluoranteno 50 mg L⁻¹

Cepa	Turvamento	Biofilm	Floculação	Cor cultura	TTC
LBMA-001	(-)	+	++	Transparente	+
LBMA-002	+	+	+	Amarelo	+
LBMA-003	+++	+	+	Rosa	+
LBMA-004	+	(-)	+	Amarelo	+
LBMA-005	+	(-)	++	Amarelo	+
LBMA-006	(-)	++	+	Transparente	+
LBMA-007	+	++	+	Amarelo	+
LBMA-008	++	++	++	Amarelo-rosa	+
LBMA-009	+	(-)	++	Rosa	+
LBMA-010	++	(-)	++	Amarelo-Rosa	+

(-) : Sem formação; (+): nível baixo; (++) : nível médio; (+++): nível alto.
TTC: Trifenil tetrazolio

Tabela 22 - Características das cepas crescendo em meio líquido mineral com Pireno 50 mg L⁻¹

Cepa	Turvamento	Biofilm	Floculação	Cor	TTC
LBMA-001	(-)	(-)	++	Transparente	+
LBMA-002	++	+	++	Rosa	+
LBMA-003	+	++	+	Amarelo	+
LBMA-004	++	(-)	+	Amarelo	+
LBMA-005	(-)	(-)	++	Transparente	+
LBMA-006	(-)	++	(-)	Transparente	+
LBMA-007	(-)	+	+	Transparente	+
LBMA-008	+	+	+	Amarelo-Rosa	+
LBMA-009	+++	(-)	+	Amarelo-Rosa	+
LBMA-010	+++	(-)	+	Amarelo-Rosa	+

(-) : Sem formação; (+): nível baixo; (++) : nível médio; (+++): nível alto.
TTC: Trifenil tetrazolio

Todas as cepas cresceram utilizando fenantreno, fluoranteno e pireno como fonte de carbono e energia. Embora algumas culturas não apresentarem turvamento o teste de TTC mostrou que as cepas estiveram metabolicamente ativas.

2.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises granulométricas mostraram que todas as amostras de solo foram de classe textural arenosa. Segundo McCauley e Jones (2005) uma alta quantidade de areia impede a boa retenção de água e oferece menor área superficial para os processos microbiológicos. Assim, a granulometria arenosa das amostras poderia explicar o fato que as variações dos teores de macro e micronutrientes não responderam de maneira significativa pelas variações do número de micro-organismos cultiváveis das amostras.

O número mais provável de micro-organismos determinado neste trabalho (10^6 a 10^{10}) correspondeu aos valores reportados como normais para amostras de solo segundo Tardy *et al.* (2014).

De acordo com De Araújo e Monteiro (2007), a presença e concentração da matéria orgânica é indicadora da qualidade do solo. Houve uma correlação positiva entre as concentrações da matéria orgânica (MO) e o número de UFC o que vem ao encontro do reportado por Wolinska e Stepniewska (2012) sobre a importância do conteúdo e da qualidade da matéria orgânica, no solo, para as atividades dos micro-organismos.

O pH de todas as culturas mudou de $7,0 \pm 0,1$ para mais de 8,0 após 72 horas de incubação. Este aumento vai de encontro com o reportado na literatura de que ocorre uma diminuição do pH do meio decorrente da formação de compostos ácidos com a degradação dos fenólicos (BUSHNELL e HAAS, 1941).

A identificação por biologia molecular das cepas como sendo do gênero *Pseudomonas*, corrobora diversos dados sobre a ampla distribuição desse gênero no mundo e particularmente em áreas contaminadas e a capacidade das espécies em degradar hidrocarbonetos (BUSHNELL e HAAS, 1941; LACAL *et al.*, 2013; ZULEMA *et al.*, 2013; DAS *et al.*, 2015)

Diferentes trabalhos mostram que as cepas bacterianas aeróbias utilizam duas rotas metabólicas para quebrar o anel benzênico, a da orto-clivagem (LOH e CHUA, 2002; CAO *et al.*, 2008) e a da meta-clivagem (HOLLENDER *et al.*, 1997). O primeiro passo, que é a desestabilização do anel, é catalisado por enzimas da classe das dioxigenases (GUZIK *et al.*, 2013; SUENAGA *et al.*, 2014; LADINO-ORJUELA *et al.*, 2016), sendo a 1,2-dioxigenase usada no processo de orto-clivagem e a 2,3-dioxigenase para o de meta-clivagem. No entanto, nas análises de atividade enzimática, a cepa LBMA-009 que apresentou o maior índice de

correlação nos testes de crescimento e tolerância a concentrações crescentes de fenol, não apresentou atividade para nenhuma dessas duas enzimas. Ensaio adicionais serão necessários para determinar qual o tipo de enzima usada pela cepa para abrir o anel benzênico e continuar a rota metabólica até ácidos tricarboxílicos.

Por outro lado, embora a cepa LBMA-010 seja a única com atividade para as enzimas catecol 1,2-dioxigenase e a catecol 2,3-dioxigenase, o que poderia explicar o maior crescimento e a maior tolerância a concentrações crescentes de fenol, a atividade das mesmas foi menor nas condições desta pesquisa.

2.6. CONCLUSÕES

A hipótese proposta foi confirmada. Os solos dos postos de combustível tiveram bactérias capazes de usar hidrocarbonetos aromáticos como fonte de carbono e energia.

Nas condições de meio de cultura usado, temperatura, pH e critério de seleção desta pesquisa, o gênero *Pseudomonas* sp. foi predominante.

As cepas isoladas foram capazes de crescer usando querosene e fenol como fonte de carbono. Toleraram concentrações de até 400 mg L⁻¹ sem efeito significativo sobre o crescimento.

Todas as cepas isoladas são capazes de degradar o fenol.

Apesar de todas as cepas terem sido identificadas como do gênero *Pseudomonas* sp., as análises cromatográficas e enzimáticas permitiram determinar que não utilizam a mesma rota metabólica. A *orto*-clivagem é usada pelas cepas LBMA-003, LBMA-004, LBMA-005, LBMA-006 e a rota da *meta*-clivagem pelas cepas LBMA-001, LBMA-002, LBMA-007, LBMA-008. A cepa LBMA-010 expressou as duas rotas metabólicas em quanto que a cepa LBMA-009 não apresentou atividade para nenhuma das duas enzimas.

Todas as cepas foram capazes de crescer usando fenantreno, fluoranteno e pireno como fontes de carbono e energia.

2.7. PERSPECTIVAS

Esta pesquisa gerou informações que permitem pensar em alguns temas de pesquisa:

Determinação da enzima ou enzimas usadas pela cepa LBMA-009 para a desestabilização do anel benzênico. De acordo com Fetzner (2012) enzimas da família cupin de ação diferente às dioxigenases têm sido reportadas como catalisadoras dos passos iniciais da quebra do anel aromático.

Avaliar as condições nas quais a cepa LBMA-010 é capaz de expressar as duas enzimas de quebra do anel benzênico. É possível que a concentração de fenol de 120 mg L^{-1} seja indutora das duas rotas metabólicas. Segundo Cao *et al.* (2008) a *Pseudomona putida* P8 apresentou degradação de benzoato usando de maneira simultânea a rota da *orto*-clivagem e da *meta*-clivagem.

Estudos adicionais com a cepa LBMA-004 que apresentou uma intensa atividade enzimática da 1,2-dioxigenase. Purificação da enzima, imobilização e avaliação da atividade.

Caracterizar as enzimas 1,2-dioxigenase e 2,3-dioxigenase produzidas utilizando inibidores seletivos.

Avaliar a coloração rosa das cepas cultivadas com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Determinar as características físico-químicas dos pigmentos produzidos, purificá-los, caracterizar a atividade biológica dos mesmos. Uso para testes diretos de atividades biológicas, como inibidores de atividades enzimáticas.

REFERÊNCIAS

AGARRY, S. E.; DUROJAIYE, A. O.; SOLOMON, B. O. Microbial degradation of phenols: a review. **International Journal of Environment and Pollution**, v. 32, n. 1, p. 12-28, 01/01/2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1504/IJEP.2008.016895> >.

AGARRY, S. E.; OWABOR, C. N.; YUSUF, R. O. Studies on Biodegradation of Kerosene in Soil under Different Bioremediation Strategies. **Bioremediation Journal**, v. 14, n. 3, p. 135-141, 2010/07/23 2010. ISSN 1088-9868. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/10889868.2010.495364> >.

ANGELIM, A. L. et al. An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosan beads. **J Environ Manage**, v. 127, p. 10-7, Sep 30 2013. ISSN 1095-8630 (Electronic) 0301-4797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23659866> >.

APHA; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. p. v., 1999. ISSN 8755-3546.

BACOSA, H.; SUTO, K.; INOUE, C. Preferential degradation of aromatic hydrocarbons in kerosene by a microbial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 702-710, 2010.

BAK, F.; WIDDEL, F. Anaerobic degradation of phenol and phenol derivatives by *Desulfobacterium phenolicum* sp. nov. **Archives of Microbiology**, v. 146, n. 2, p. 177-180, 1986/11/01 1986. ISSN 0302-8933. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF00402347> >.

BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D36-D42, January 1 2013. Disponível em: < <http://nar.oxfordjournals.org/content/41/D1/D36.abstract> >.

BENSON, H. J. **Microbiological Applications. Laboratory Manual in General Microbiology**. Eighth edition. Boston, MA: The McGraw-Hill, 2002. 478 ISBN 0072318899. ISBN/EAN: 9780072318890.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**,

v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 5/7/ 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273> >.

BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The utilization of Certain Hydrocarbons by Microorganisms. **Journal of Bacteriology**, v. 41, n. 5, p. 653-673, 1941.

CAO, B.; GENG, A.; LOH, K.-C. Induction of ortho- and meta-cleavage pathways in *Pseudomonas* in biodegradation of high benzoate concentration: MS identification of catabolic enzymes. **Genomics and Proteomics**, v. 81, p. 99-107, 2008.

CARMONA, M. et al. Anaerobic Catabolism of Aromatic Compounds: a Genetic and Genomic View. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 1, p. 71-133, March 1, 2009 2009. Disponível em: < <http://mmbr.asm.org/content/73/1/71.abstract> >.

CASPI, R. et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D459-D471, January 1, 2014 2014. Disponível em: < <http://nar.oxfordjournals.org/content/42/D1/D459.abstract> >.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, February 1, 1987 1987. Disponível em: < <http://aem.asm.org/content/53/2/224.abstract> >.

DAS, D. et al. Complete genome sequence analysis of *Pseudomonas aeruginosa* N002 reveals its genetic adaptation for crude oil degradation. **Genomics**, v. 105, n. 3, p. 182-190, 3// 2015. ISSN 0888-7543. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754314002791> >.

DE ALMEIDA, J.; SALES, F. A.; SALES, I. C. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética química**, v. 35, p. 17-43, 2010.

DE ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 3, p. 66-75, July/Sept 2007. ISSN 1981-3163 Disponível em: < <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6684/4403> >.

EMERSON, E. THE CONDENSATION OF AMINOANTIPYRINE. II. A NEW COLOR TEST FOR PHENOLIC COMPOUNDS. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 08, n. 5, p. 417-428, 1943/09/01 1943. ISSN 0022-3263. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jo01193a004> >. Acesso em: 2013/10/29.

ETTINGER, M. B.; RUCHHOFT, C. C.; LISHKA, R. J. Sensitive 4-aminoantipyrine method for phenolic compounds. **Analytical chemistry**, v. 23, n. 12, p. 1783-1788, 1951.

FAUST, S. D. Factors influencing the condensation of 4-Aminoantipyrine with derivatives of hydroxybenzene - II. Influence of hydronium ion concentration on absorptivity. **Water Research**, v. 1, p. 509-522, 1967.

FETZNER, S. Ring-Cleaving Dioxygenases with a Cupin Fold. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 8, p. 2505-2514, April 15, 2012 2012. Disponível em: < <http://aem.asm.org/content/78/8/2505.abstract> >.

FIDA, T. T. et al. Physiology and transcriptome of the polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Sphingomonas* sp. LH128 after long-term starvation. **Microbiology**, v. 159, n. Pt 9, p. 1807-1817, September 1, 2013 2013. Disponível em: < http://mic.sgmjournals.org/content/159/Pt_9/1807.abstract >.

FREITAS DE OLIVEIRA, D. W. et al. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, n. 0, p. 34-43, 1/1/ 2013. ISSN 0927-7765. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776512003426> >.

FRIEDEL, J. K.; MÖLTER, K.; FISCHER, W. R. Comparison and improvement of methods for determining soil dehydrogenase activity by using triphenyltetrazolium chloride and iodonitrotetrazolium chloride. **Biology and Fertility of Soils**, v. 18, n. 4, p. 291-296, 1994/12/01 1994. ISSN 0178-2762. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF00570631> >.

GARRITY, G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Bergey's Manual Trust, 2005. ISBN 978-0-387-95040-2.

GOUDA, M. K. et al. Bioremediation of kerosene I: A case study in liquid media. **Chemosphere**, v. 69, n. 11, p. 1807-1814, 11// 2007. ISSN 0045-6535. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653507007382> >.

GUZIK, U.; HUPERT-KOCUREK, K.; WOJCIESZYŃSKA, D. **Intradiol Dioxygenases — The Key Enzymes in Xenobiotics Degradation**. 2013. Disponível em: < <http://www.intechopen.com/books/export/citation/EndNote/biodegradation-of-hazardous-and-special-products/intradiol-dioxygenases-the-key-enzymes-in-xenobiotics-degradation> >.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 6/5/ 1983. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283683802848> >.

HARELAND, W. A. et al. Metabolic function and properties of 4-hydroxyphenylacetic acid 1-hydroxylase from *Pseudomonas acidovorans*. **Journal of Bacteriology**, v. 121, n. 1, p. 272-285, January 1, 1975 1975. Disponível em: < <http://jb.asm.org/content/121/1/272.abstract> >.

HEIPIEPER, H. J.; DIEFENBACH, R.; KEWELOH, H. Conversion of cis unsaturated fatty acids to trans, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 1847-1852, June 1, 1992 1992. Disponível em: < <http://aem.asm.org/content/58/6/1847.abstract> >.

HOLLANDER, D. H.; NELL, E. E. Improved Preservation of *Treponema pallidum* and Other Bacteria by Freezing with Glycerol. **Applied Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 164-170, 1954. ISSN 0003-6919. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1056982/> >.

HOLLENDER, J.; HOPP, J.; DOTT, W. Degradation of 4-Chlorophenol via the meta Cleavage Pathway by *Comamonas testosteroni* JH5. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4567-72, November 1, 1997 1997. Disponível em: < <http://aem.asm.org/content/63/11/4567.abstract> >.

JEON, C. O.; MADSEN, E. L. In situ microbial metabolism of aromatic-hydrocarbon environmental pollutants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 474-481, 6// 2013. ISSN 0958-1669. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166912001280> >.

JOHNSEN, A. R.; BENDIXEN, K.; KARLSON, U. Detection of Microbial Growth on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Microtiter Plates by Using the Respiration Indicator WST-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 2683-2689, June 1, 2002 2002. Disponível em: < <http://aem.asm.org/content/68/6/2683.abstract> >.

JOHNSEN, A. R.; WICK, L. Y.; HARMS, H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 1, p. 71-84, 1// 2005. ISSN 0269-7491. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749104001587> >.

KANALY, R. A.; HARAYAMA, S. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 8, p. 2059-2067, April 15, 2000 2000. Disponível em: < <http://jb.asm.org/content/182/8/2059.short> >.

KLEE, A. J. A computer program for the determination of most probable number and its confidence limits. **Journal of Microbiological Methods**, v. 18, n. 2, p. 91-98, 9// 1993. ISSN 0167-7012. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016770129390025D> >.

LACAL, J. et al. Tactic responses to pollutants and their potential to increase biodegradation efficiency. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 4, p. 923-933, 2013. ISSN 1365-2672. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12076> >.

LADINO-ORJUELA, G. et al. Metabolic Pathways for Degradation of Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. In: DE VOOGT, W. P. (Ed.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 237**: Springer International Publishing, v.237, 2016. cap. 5, p.105-121. (Reviews of Environmental Contamination and Toxicology). ISBN 978-3-319-23572-1.

LOH, K.-C.; CHUA, S.-S. Ortho pathway of benzoate degradation in *Pseudomonas putida*: induction of meta pathway at high substrate concentrations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 5, p. 620-626, 5/2/ 2002. ISSN 0141-0229. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022902000169> >.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock. Biology of Microorganisms**. 13. San Francisco: Pearson Education, Inc. publishing as Benjamin Cummings, 2012. 1155 ISBN 13:978-0-321-64963-8.

MALLICK, S.; DUTTA, T. K. Kinetics of phenanthrene degradation by *Staphylococcus* sp. strain PN/Y involving 2-hydroxy-1-naphthoic acid in a novel metabolic pathway. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 1004-1008, 9// 2008. ISSN 1359-5113. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511308001505> >.

MARGESIN, R. et al. Characterization of Hydrocarbon-Degrading Microbial Populations in Contaminated and Pristine Alpine Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3085-3092, June 1, 2003. Disponível em: < <http://aem.asm.org/content/69/6/3085.abstract> >.

MCCAULEY, A.; JONES, C. **Basic Soil Properties**. SERVICE, M. E. Bozeman, MT: Montana State University: 1-12 p. 2005.

MC FARLAND, J. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. **Journal of the American Medical Association**, v. 49, n. 14, p. 1176-1178, 1907. ISSN 0098-7484.

NAKAZAWA, T.; NAKAZAWA, A. Pyrotechase (*Pseudomonas*). **Methods in Enzymology**, v. 17, n. Part A, p. 518-522, 1970.

NCBI. **National Center fo Biotechnology Information**. PubChem Compound Database: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> 2015.

NEILAN, B. A. et al. rRNA Sequences and Evolutionary Relationships among Toxic and Nontoxic Cyanobacteria of the Genus *Microcystis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 3, p. 693-697, July 1, 1997 1997. Disponível em: < <http://ijs.sgmjournals.org/content/47/3/693.abstract> >.

NOZAKI, M. Metapyrotechase (*Pseudomonas*). **Methods in Enzymology**, v. Volume 17, n. Part A, p. 522-525, 1970.

PAPASOTIRIOU, D. G. et al. Comparison of the Membrane Subproteomes during Growth of a New *Pseudomonas* Strain on Lysogeny Broth Medium, Glucose, and Phenol. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 10, p. 4278-4288, 2008/10/03 2008. ISSN 1535-3893. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/pr800192n> >. Acesso em: 2013/09/04.

PETERNEL, Š. et al. Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins. **Microbial Cell Factories**, v. 7, p. 34-34, 12/01 09/23/received 12/01/accepted 2008. ISSN 1475-2859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2630956/> >.

ROLAND E, L. et al. The Bay Region Theory of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Carcinogenesis. In: (Ed.). **Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis**: American Chemical Society, v.283, 1985. cap. 4, p.63-84. (ACS Symposium Series). ISBN 0-8412-0924-3.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3rd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 1453 ISBN 0-87969-576-5.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 201-22, June 1, 1995 1995. Disponível em: < <http://mmbr.asm.org/content/59/2/201.abstract> >.

SIMARRO, R. et al. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a wood-degrading consortium at low temperatures. **FEMS Microbiology**

Ecology, v. 83, n. 2, p. 438-449, 2013. ISSN 1574-6941. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6941.12006> >.

SUENAGA, H. et al. Diversity of extradiol dioxygenases in aromatic-degrading microbial community explored using both culture-dependent and culture-independent approaches. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 90, n. 2, p. 367-379, 2014. Disponível em: < <http://femsec.oxfordjournals.org/content/90/2/367.abstract> >.

TARDY, V. et al. Stability of soil microbial structure and activity depends on microbial diversity. **Environmental Microbiology Reports**, v. 6, n. 2, p. 173-183, 2014. ISSN 1758-2229. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/1758-2229.12126> >.

UM-BBD. **Biocatalysis / Biodegradation Database**. On line: University of Minnesota 2015.

USEPA. **Guidelines for Carcinogen Risk Assessment** UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Washington, DC 2005.

_____. **Most Probable Number Calculator**. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY: USEPA: 41 p. 2012.

VIÑAS, M. **Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica**. 2005. 352 (Doctorado). Departamento de Microbiología, Universitat de Barcelona, Barcelona.

VIÑAS, M. et al. Culture-dependent and -independent approaches establish the complexity of a PAH-degrading microbial consortium. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 11, p. 897-909, 2005/11/01 2005. ISSN 0008-4166. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1139/w05-090> >. Acesso em: 2014/02/28.

WOLINSKA, A.; STEPNIEWSKA, Z. Dehydrogenase Activity in the Soil Environment. In: CANUTO, R. A. (Ed.). **Dehydrogenases**. Rijeka: InTech, 2012. cap. Chapter 8, p.183-210. ISBN 978-953-307-0199-3.

ZHANG, P.-P.; SHI, Z.-G.; FENG, Y.-Q. Determination of phenols in environmental water samples by two-step liquid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2581-2586, 10/15/ 2011. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914011007211> >.

ZHANG, S. et al. Identification of the para-nitrophenol catabolic pathway, and characterization of three enzymes involved in the hydroquinone pathway, in *Pseudomonas* sp.

1-7. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 27, 2012. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/12/27> >.

ZHU, L.; LU, L.; ZHANG, D. Mitigation and remediation technologies for organic contaminated soils. **Front. Environ. Sci Engin. China**, v. 4, n. 4, p. 373-386, 2010.

ZULEMA, U. et al. Metabolic potential of the organic-solvent tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1E deduced from its annotated genome. **Microbial Biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 598-611, 2013. ISSN 1751-7915. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12061> >.

ANEXOS

Anexo 1 - Valores de absorvância das culturas bacterianas em concentrações crescentes de fenol. Temperatura 30 °C, MLM, pH 7,0

Cepa Bacteriana										
Concentração mg L ⁻¹	LBMA- 001	LBMA- 002	LBMA- 003	LBMA- 004	LBMA- 005	LBMA- 006	LBMA- 007	LBMA- 008	LBMA- 009	LBMA- 010
0	0,582	0,459	0,823	0,546	0,827	0,140	0,144	0,162	0,359	1,051
100	0,557	0,435	0,815	0,510	0,792	0,113	0,070	0,140	0,348	1,035
200	0,538	0,369	0,786	0,489	0,771	0,109	0,043	0,133	0,329	1,038
400	0,462	0,269	0,712	0,415	0,547	0,114	0,030	0,111	0,291	0,992
800	0,081	0,139	0,306	0,118	0,312	0,081	0,016	0,055	0,273	0,807
1600	0,045	0,053	0,048	0,032	0,039	0,055	0,029	0,025	0,150	0,305
r	-0,9222	-0,9573	-0,9765	-0,9512	-0,9810	-0,9501	-0,5978	-0,9648	-0,9897	-0,9793
r ²	0,8505	0,9163	0,9535	0,9047	0,9624	0,9027	0,3573	0,9308	0,9796	0,9590

* Valores de absorvância em 600 nm. Leitura em espectrofotômetro 24 horas após a inoculação.

r: Coeficiente de correlação.

r²: Coeficiente de determinação.

Anexo 2 - Valores de absorbância das culturas bacterianas em MLM e fenol a 120 mgL⁻¹. Amostragem a cada duas horas.

Cepa	Tempo amostragem (horas)									
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
LBMA-001	119,9	118,0	111,2	107,9	92,0	72,1	29,4	0,0	0,0	0,0
LBMA-002	120,6	110,7	79,5	69,1	9,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
LBMA-003	119,2	119,4	114,2	114,8	99,0	89,2	35,7	9,0	0,0	0,0
LBMA-004	119,5	114,2	103,6	98,8	37,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
LBMA-005	120,1	118,1	118,1	117,0	111,4	100,1	89,4	62,5	26,2	0,0
LBMA-006	120,2	118,8	115,0	114,2	99,9	70,8	42,8	12,1	0,0	0,0
LBMA-007	119,8	118,7	112,1	107,4	109,4	105,0	91,1	77,2	33,9	0,0
LBMA-008	119,6	118,7	116,2	115,6	100,4	98,6	91,6	82,3	29,8	0,0
LBMA-009	120,4	118,5	109,8	106,8	64,4	35,8	0,0	0,0	0,0	0,0
LBMA-010	120,5	118,6	114,6	112,0	95,8	89,2	73,1	59,4	19,6	0,0

.Anexo 3 - Valores de absorbância em 500 nm das triplicatas das soluções padrão de fenol para a construção da curva analítica de determinação do fenol pelo método da 4-aminoantipirina

Solução padrão (mg L ⁻¹)	Absorbância das triplicatas			Média da absorbância	Desvio padrão
	R1	R2	R3		
1,2	0,158	0,152	0,147	0,152	0,0055
2,4	0,310	0,297	0,295	0,301	0,0081
3,2	0,373	0,389	0,422	0,395	0,0250
4,8	0,579	0,584	0,602	0,588	0,0121
6,4	0,759	0,761	0,823	0,781	0,0364
8,0	0,950	0,910	0,966	0,942	0,0288
9,6	1,166	1,155	1,071	1,131	0,0520

Em que: R1, R2 e R3: réplicas das soluções padrão de fenol. Equação da curva: $y = 0,1154x + 0,0249$; $R^2 = 0,9994$. R^2 : coeficiente de determinação

Anexo 4 - Nomenclatura das cepas isoladas, número de nucleotídeos da sequência de identificação, nome científico da cepa segundo o NCBI e sequência de nucleotídeos das cepas.

LBMA-001[:1-1501 *Pseudomonas* sp. wust-c gene da unidade 16S rRNA sequência parcial

TAGAGTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGC
GGATGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATC
TGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTCCGAAAGGAGCGCTAATACCGCATACGTCCTACGG
GAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAG
TAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGT
CACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGG
ACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTA
AAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCA
ACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGATGGATGTGAAA
TCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCATAACTGCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGT
GGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGA
AGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGA
TCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTA
AAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA
GCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCCGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGT
GCCTTCGGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGT
TGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTAAGGTGGG
CACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGCATGACGTCAAGTCATC
ATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAG
CCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCG
ACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTTACACACCGCCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGT
CTAACCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACA
AGGTAGCTTTA

LBMA-002[:1-1462 *Pseudomonas* sp. BHy79 gene da unidade 16S rRNA sequência parcial

TGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTTCC
TGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAAC
GTTCCGAAAGGAGCGCTAATATCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGG
ACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCTGGATTAGCGAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACC
TAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACAG
GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGAT
CCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGG
AAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAA
CTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCG
TAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGATGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGA
ACTGCATCCATAACTGCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGC
GGTGAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGAT
ACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGATGTGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACG
CGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGG
GGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC
TGGCCTTGACATGTCCGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATCGGAACAC

AGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGA
GCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATG
GTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAG
TCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCA
GAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGT
GGGTTACTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATT
ATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA

LBMA-003 | 7-1497 *Pseudomonas citronellolis* strain odb7 gene da unidade 16S rRNA sequência parcial

AGGATTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGC
GGATGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATTACGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATC
TGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTCCGAAAGGAGCGCTAATACCGCATACGTCCTACGG
GAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAG
TAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGT
CACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGG
ACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGTAGCTCTCCGGATTGTA
AAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCA
ACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGGTAAGATGGATGTGAAA
TCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCATAACTGCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGT
GGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGA
AAGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGA
TCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTA
AAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAA
GCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCCGGAATTCTGCAGAGATGCGGGAGT
GCCTTCGGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGT
TGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTAAGGTGGG
CACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATC
ATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGGGTTGCCAAG
CCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCG
ACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGT
CTAACCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACA
AGGTAGCC

LBMA-004 | 8-1480 *Pseudomonas* sp. EGD-AKN5 16S gene da unidade 16S rRNA sequência parcial

CTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCT
TGCTCCCGGATTACGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGG
GACAACGTTCCGAAAGGAGCGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGTGGGGGAT
CTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGG
CTCACCTAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGA
ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGC
CTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTG
GGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCG
GCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACT
GGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGGTAAGATGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCT
GGGAAGTGCATCCATAACTGCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCTGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGAC

TGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
 TCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCT
 AACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTG
 ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCT
 TACCTGGCCTTGACATGTCCGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATCGGA
 ACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTA
 ACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTG
 CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCA
 GGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCT
 AATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGG
 AATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA
 CCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGGG
 GACGGTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA

LBMA-005 1492 *Pseudomonas* sp. FP1-1 gene da unidade 16S rRNA sequência parcial

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGC
 GGATGAAGGGAGCTTGCTTCTGGATTACGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCT
 GCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTCCGAAAGGAGCGCTAATACCGCATACTCCTACGGG
 AGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGT
 AGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTC
 AACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA
 CAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAA
 AGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAA
 CAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCG
 TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGGTAAGATGGATGTGAAAT
 CCCCCGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCATAACTGCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTG
 GTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAA
 GGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT
 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGAT
 CTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA
 AACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG
 CAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCCGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTG
 CTTTCGGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTT
 GGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAGCCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGC
 ACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCA
 TGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGC
 CGCGAGGTGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCG
 ACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCC
 CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGT
 CTAACCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACA
 AG

LBMA-006 1489 *Pseudomonas plecoglossicida* strain NyZ12, genoma completo.

TGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGA
 GCTTGCTCCTTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTG
 GGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTCCTACGGGAGAAAGCAGGG
 GACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
 TGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAAGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGT
 GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAA
 AGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAG
 TTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCA

CCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATT
 ACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAA
 CCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTCT
 GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTG
 GACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG
 TAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCA
 GCTAACGCATTAAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAGTCAAATGAA
 TTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAA
 CCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGT
 CTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC
 GTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGA
 CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGG
 CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGA
 GCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGT
 CGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
 CACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTGTCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGG
 AGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA

LBMA-007 1486 *Pseudomonas* sp. AK_AAN5 partial 16S rRNA gene

AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGC
 GGATGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATTACAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATC
 TGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTCCGAAAGGAGCGCTAATACCGCATACGTCCTACGG
 GAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAG
 TAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGT
 CACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGG
 ACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTA
 AAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCA
 ACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGC
 GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGGTAAGATGGATGTGAAA
 TCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCATAACTGCCTGACTAGAGTACGGTAGCCTGT
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGA
 CTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGRTA
 GTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGC
 TAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAGTCAAATGAATT
 GACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACC
 TTACCTGGCCTTGACATGTCCGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATCGG
 AACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGT
 AACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACT
 GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCC
 AGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGC
 TAATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCG
 GAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
 ACCGCCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGG
 GGACGGTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAAACCGTA

LBMA-008 1422 *Pseudomonas* sp. FM1-3 gene da unidade 16S rRNA sequência parcial

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGC
 GGATGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATTACAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATC
 TGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTCCGAAAGGAGCGCTAATACCGCATACGTCCTACGG
 GAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAG
 TAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGT

CACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGG
 ACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTA
 AAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCA
 ACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGC
 GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTGAGGGTGGTGGAAATTTCTT
 GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACTG
 GACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG
 TAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCA
 GCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAA
 TTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAA
 CCTTACCTGGCCTTGACATGTCCGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATC
 GGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
 GTAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTCATGGTGGGCACTCTAAGGAGA
 CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGG
 CCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGA
 GCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGT
 CGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
 ACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGG
 GGGACGGTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGTA

LBMA-009 1501 *Pseudomonas putida* strain 31920-1 gene da unidade 16S rRNA sequência parcial

AGAGTTTGAACCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAG
 CGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATC
 TGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGG
 AGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGT
 TGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTC
 AACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA
 CAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAA
 AGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGA
 CAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCG
 TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAG
 CCCCAGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGT
 GGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGA
 AGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
 TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGA
 TTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA
 AACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAG
 CAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTG
 CCTTCGGGAAGTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTT
 GGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGC
 ACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCA
 TGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGC
 CGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA
 CTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCC
 GGGCCTTGTAACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTC
 TAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAG
 GTAGCCGTA

LBMA-010 1500 *Pseudomonas* sp. S1-16 gene da unidade 16S rRNA sequência parcial

GAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCG
 GATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTG

CCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGA
GAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTT
GGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTC
ACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA
CAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAA
AGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGA
CAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCG
TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAG
CCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGT
GGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGA
AGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
TTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGA
TTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA
AACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAG
CAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTG
CCTTCGGGAACCTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTT
GGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGC
ACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCA
TGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGC
CGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA
CTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCC
GGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTCACCAGAAGTAGCTAGTC
TAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAG
GTAGCCGTA