
ECOLOGIA

ANA CLARA FRAGA BECKER

**IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA E ANÁLISE
CONEXIONISTA DE BACTÉRIAS
HETEROTRÓFICAS E FATORES ABIÓTICOS DE
AMBIENTES LÓTICOS SOB INFLUÊNCIA DE
EFLUENTES DO REFINO DE PETRÓLEO**

ANA CLARA FRAGA BECKER

IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA E ANÁLISE CONEXIONISTA DE
BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS E FATORES ABIÓTICOS DE
AMBIENTES LÓTICOS SOB INFLUÊNCIA DE EFLUENTES DO REFINO
DE PETRÓLEO

Orientador: Prof^a Dr^a Dejanira de Franceschi de Angelis

Co-orientador: Dr Acacio Aparecido Navarrete

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau
de Ecóloga

Rio Claro, 2015

576

Becker, Ana Clara Fraga

B395i

Identificação taxonômica e análise conexionista de bactérias heterotróficas e fatores abióticos de ambientes lóticos sob influência de efluentes do refino de petróleo / Ana Clara Fraga Becker. - Rio Claro, 2015

37 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Ecologia) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Dejanira de Franceschi de Angelis

Coorientador: Acacio Aparecido Navarrete

1. Micro-organismos. 2. Ecologia microbiana. 3. Aeromonadaceae. 4. Carnobacteriaceae. 5. Gene 16S rRNA. 6. Interações ecológicas. 7. Tratamento biológico. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

**Às minhas avós Cida e Nena e ao meu tio Marcão,
que muito comemorariam comigo
mais esta conquista.**

Agradecimentos

Aqui me encontro, no fim de mais uma etapa de minha vida. Uma deliciosa etapa que somente pôde ser completa com êxito, graças ao incentivo e apoio vindos dos diversos segmentos que me constituem, segmentos esses que me completam e fazem parte da minha existência. Há muito que agradecer.

Agradeço à minha Ubatuba, cidade querida que despertou o meu interesse pelo cuidado com a natureza. Foi graças à sua imensidão azul e verde que decidi o rumo que minha vida tomaria.

Agradeço à minha mãe e professora, Lúcia, que sempre me apoiou nas minhas escolhas e me incentivou ao estudo, sabendo quando era a hora dos mimos e dos puxões de orelha (agradeço por cada um desses puxões, eles foram essenciais). Ao meu pai, Conrado que já esteve muito envolvido com as questões ambientais de nossa cidade e que dedicou muitos de seus sábados ao programa de rádio dos anos 90 “Meio Ambiente em foco”, o qual já tratava dos diversos assuntos que hoje me intrigam. À minha querida irmã Ana Luiza que, apesar dos nossos constantes desentendimentos, sempre sabe a hora de ser carinhosa e de dividir um abraço apertado. Amo vocês.

Agradeço à minha família de forma geral, mas com apreço especial a algumas pessoas: à minha avó Cida e à minha tia Fátima, que me ajudaram muito durante todo meu período na universidade. Ao tio André e à tia Sandra, que sempre me auxiliaram e sempre estiveram interessados na minha vida acadêmica e por me fazerem enxergar as oportunidades mesmo nos momentos mais difíceis. Ao tio Tavinho e à tia Amélia que me ajudaram durante o meu ano de cursinho, obrigada por acreditarem no meu potencial. À tia Lu e ao tio Paulo que me acolheram tão carinhosamente em sua casa, sou eternamente grata.

Agradeço ao Stephan, dono do meu amor, que atura meus chilikues e surtos (a maioria acontecida durante a escrita deste trabalho) com muita paciência, heroicamente me ajudando e me acalmando.

Àquelas que sempre que eu voltava para Ubatuba me faziam esquecer meus problemas, Elza, Meni, Ottoni e Iara. Obrigada pelos anos de valiosíssima amizade, amo vocês.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Dejanira de Franceschi de Angelis, por me confiar as informações para a elaboração deste trabalho e por estar sempre disponível para me ajudar.

Ao meu atencioso co-orientador, Dr Acacio Aparecido Navarrete que sempre teve tempo para parar e me auxiliar e por ter o dom de me fazer ver a “luz no fim do túnel”.

Agradeço à Dr^a Dilza Nalin pela constante ajuda em absolutamente todas as etapas desta jornada que foi o meu trabalho de conclusão de curso e à Sibeli que me ajudou em toda parte laboratorial, sempre muito paciente com a minha falta de prática nesta área.

Agradeço à Fátima pelo suporte na etapa de cultivo e isolamento das bactérias heterotróficas identificadas neste estudo.

Agradeço à Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP), pelo apoio financeiro.

Agradeço ao Programa Petrobrás de Formação de Recursos Humanos (PFRH) para setor de petróleo, gás, energia e biocombustíveis pelos apoios acadêmicos e financeiros fundamentais para a realização desta pesquisa.

Ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo, por me permitir fazer uso de suas dependências.

À Refinaria de Paulínia (REPLAN-Petrobrás), que permitiu a realização deste trabalho.

Morar longe de casa e cursar uma universidade como a UNESP é uma conquista e não poderia deixar de agradecer àquelas pessoas que fizeram essa etapa da minha vida mais fácil e prazerosa: obrigada à República Pergolado por ter me acolhido de braços abertos no meu primeiro mês de UNESP. Obrigada à República Galápagos, nas suas

mais diversas formações: Ju, Gabi, Bela, Manú, Natasha e Giovanna, agradeço pelos anos de convivência, amizade e rolês.

À turma Eco 2010, aquelas pessoas amadas com quem tive o prazer do convívio diário e que se tornaram minha família longe de casa: Bala, Xica, Myagui, Xernobyl, Jéssica, Kaory, Cotia, Quiri, Origami, Gabilon, Gorfo, Nathy, Pedrota, Nômade, Nhoque, Moca e Bolaxinha. Zhu e Mandi, felicidade por nossa amizade e convivência terem se intensificado no meu último semestre em Rio Claro. Ao trio com quem dividi minhas risadas, anseios e noites viradas estudando e reclamando, Kanela, Florinha e Pits, fiz da casa de vocês o meu segundo lar em Rio Claro.

Agradeço à vida, que me deu a oportunidade de ter vivenciado as mais valiosas experiências que hoje constituem o que sou.

*“Quando as aves falam com as pedras e as rãs
com as águas - é de poesia que estão falando.”*

Manoel de Barros

RESUMO

Este estudo utilizou uma abordagem multi-analítica baseada em métodos microbiológicos tradicionais de cultivo e isolamento de bactérias heterotróficas em laboratório associada à identificação molecular dos isolados e análises físico-químicas de amostras ambientais. Os dados foram integrados a partir de um modelo matemático apoiado em conhecimento da neurociência computacional, composto por três módulos: (i) “parâmetros microbiológicos”, contemplando dados taxonômicos obtidos através de sequenciamento parcial do gene 16 rRNA de 80 culturas de bactérias heterotróficas isoladas por plaqueamento em meio PCA. Para o isolamento das culturas bacterianas foram utilizadas amostras de água dos rios Atibaia e Jaguari, coletadas no local de captação de água para uso no tratamento do efluente; à montante do lançamento do efluente tratado da Refinaria de Paulínia (REPLAN/Petrobras), localizada no município de Paulínia-SP; da saída do tratamento biológico, com lagoa de estabilização e do efluente bruto da refinaria; (ii) “parâmetros químicos”, medidas da taxa de oxigênio dissolvido (OD), demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), cloretos, acidez em CaCO_3 , alcalinidade, amônia, nitrito, nitrato, íons dissolvidos, sulfetos, óleos e graxas; e (iii) “parâmetros físicos”, contemplando determinação de pH, condutividade, temperatura, transparência, sólidos sedimentáveis, sólidos suspensos e solúveis, matéria volátil, matéria fixa residual (RFM), cor aparente e turbidez. Os resultados revelaram relações teóricas interessantes envolvendo duas famílias de bactérias (*Carnobacteriaceae* e *Aeromonadaceae*). *Carnobacteriaceae* mostrou relações teóricas positivas com DQO, DBO, nitrato, cloreto, temperatura, condutividade e cor aparente, e negativas com o oxigênio dissolvido. Relações teóricas positivas foram exibidas também entre *Aeromonadaceae* e a taxa oxigênio dissolvido e nitrato, enquanto relações negativas foram reveladas entre essa família de bactéria e a DQO, DBO, cloretos, amônia, matéria volátil, alcalinidade, cor aparente, acidez e condutividade. Estudos anteriores mostraram relação entre a família *Carnobacteriaceae* e efluentes industriais e de ambientes com altas cargas de material orgânico; enquanto algumas linhagens da família *Aeromonadaceae* foram exclusivamente presentes em águas não poluídas e de boa qualidade nestes estudo prévios. Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo abrem possibilidade para a investigação de *Carnobacteriaceae* e *Aeromonadaceae* como potenciais bioindicadores para avaliação da eficiência dos métodos adotados para o tratamento biológico e descarte de resíduos do refino do petróleo.

Palavras-chave: Bactérias heterotróficas. Tratamento biológico. Resíduos do refino do petróleo. Interações ecológicas

ABSTRACT

This study used a multi-analytical approach based on traditional microbiological methods for cultivation and isolation of heterotrophic bacteria in the laboratory associated with the molecular identification of the isolates and physicochemical analysis of environmental samples. The model chosen for data integration was supported by knowledge from computational neuroscience, and composed by three modules: (i) "microbiological parameters", contemplating taxonomic data obtained from the partial sequencing of the 16S rRNA gene from 80 colonies of heterotrophic bacteria isolated by plating method in PCA media. For bacterial colonies isolation were used water samples from Atibaia and Jaguarí rivers collected at the site of water captation for use in effluent treatment, upstream from the entrance of treated effluent from the Paulínia refinery (REPLAN/Petrobras) located in the Paulínia-SP municipality, from the output of the biological treatment plant with stabilization pond and from the raw refinery wastewater; (ii) "chemical parameters", ending measures of dissolved oxygen (DO), chemical oxygen demand (COD), biochemical oxygen demand (BOD), chloride, acidity CaCO_3 , alkalinity, ammonia, nitrite, nitrate, dissolved ions, sulfides, oils and greases; and (iii) "physical parameters", comprising the pH determination, conductivity, temperature, transparency, settleable solids, suspended and soluble solids, volatile material, remaining fixing material (RFM), apparent color and turbidity. The results revealed interesting theoretical relationships involving two families of bacteria (*Carnobacteriaceae* and *Aeromonadaceae*). *Carnobacteriaceae* revealed positive theoretical relationships with COD, BOD, nitrate, chloride, temperature, conductivity and apparent color and negative theoretical relationships with the OD. Positive theoretical relationships were shown between *Aeromonadaceae* and OD and nitrate, while this bacterial family showed negative theoretical relationships with COD, BOD, chlorides, ammonia, volatile matter, alkalinity, apparent color, acidity and conductivity. Previous studies have shown the *Carnobacteriaceae* family related to industrial wastewater and to environments with high load of organic matter, while another research points that some strains of the *Aeromonadaceae* family can be only found in good quality, unpolluted waters. The results obtained in this study open the possibilities of investigating *Carnobacteriaceae* and *Aeromonadaceae* as potential bioindicators for assessing the efficiency of the methods adopted for biological treatment and disposal of waste from oil refinery.

Key words: Heterotrophic bacteria. Biological treatment. Waste from oil refinery. Ecological interactions

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Locais de amostragem e coleta das amostras de efluente e água	16
3.2. Análise de parâmetros físicos e químicos do efluente e da água	18
3.3. Análises microbiológicas das amostras de efluente e água	18
3.3.1. Inoculação das amostras de efluente e água, e crescimento e isolamento de culturas bacterianas	19
3.3.2. Extração de DNA das culturas bacterianas	19
3.3.3. Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA e identificação taxonômica das culturas bacterianas	20
3.4. Análises estatísticas	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Parâmetros físicos e químicos do efluente e da água	21
4.2. Identificação taxonômica dos isolados bacterianos	22
4.3. Estatística e análise conexionista	24
4.4. Discussão	26
5. CONCLUSÃO	29
6. REFERÊNCIAS	30
7. APÊNDICES.....	32

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, pode-se dizer que o petróleo é a mais importante substância consumida em todo o mundo. Não apenas representado a matéria-prima para a produção de plásticos e outros derivados que originam milhares de bens de consumo, mas também sendo fundamental como combustível para geração de energia, para a indústria e para o transporte. Do ponto de vista da química, o petróleo nada mais é do que uma complexa mistura de hidrocarbonetos, acompanhados de menores quantidade de oxigênio, nitrogênio, compostos contendo enxofre e traços de compostos metálicos (SPEIGHT, 2010).

Contudo, o petróleo em si possui pouco ou nenhum valor comercial, sendo essencial a etapa do refino do material bruto para que sejam geradas as formas comerciais da substância. A grosso modo, o refino do petróleo consiste na separação deste em frações e o subsequente tratamento destas com o intuito de se conseguir os subprodutos que possuem alto valor comercial, como os combustíveis: gasolina, óleo diesel, gás butano (de cozinha), querosene, lubrificantes: óleos e graxas; matéria-prima de anti-sépticos, fertilizantes, detergentes, ceras, asfalto e os mais diversos tipos de plásticos (MARIANO, 2001; SPEIGHT, 2010).

A etapa do refino do petróleo consome grande quantidade de água e de energia, produz resíduos sólidos de difícil tratamento e altas quantidades de efluente líquido, e libera gases nocivos à atmosfera. Uma refinaria com capacidade de processamento de 100.000 barris por dia, por exemplo, produz cerca de 37 milhões de litros de efluente líquido/dia, o que corresponde a cerca de 2 litros de despejo gerados para cada 1 litro de petróleo processado (MARIANO, 2001). Durante esta etapa de refino petróleo são gerados quatro tipos de efluente: águas contaminadas coletadas a céu aberto, águas de refrigeração, águas de processo e efluente sanitário, sendo que a maioria das operações requer grande quantidade de água de refrigeração e processo (MARIANO, 2001).

Uma importante característica do efluente do refino de petróleo é a alta concentração de poluentes orgânicos e inorgânicos que, mesmo em concentrações inferiores às letais, podem ser danosos à biota terrestre e aquática (SANTAELLA *et al.*, 2009), além de causar um desequilíbrio no ecossistema, atribuindo ao efluente altas taxas de demanda química de oxigênio (DQO). Segundo Nogueira (2013), os componentes do efluente do refino do petróleo podem variar, porém, os principais contaminantes, encontrados comumente são:

- Hidrocarbonetos livres e emulsionados;
- Fenóis, incluindo metil e dietil fenóis;
- Mercaptanas;
- Sulfetos;
- Amônio.

De acordo com Nogueira (2013), existem três etapas para o tratamento de efluentes industriais:

- Tratamento primário, que tem como finalidade a remoção dos sólidos suspensos, sólidos grosseiros e parte da matéria orgânica;
- Tratamento secundário, tendo como objetivo a remoção da matéria orgânica solúvel, através de processos biológicos (lodo ativado, filtro biológico, lagoas de estabilização entre outros);
- Tratamento terciário, que remove as substâncias que resistiram aos procedimentos anteriores, como a matéria orgânica solúvel recalcitrante, e os compostos inorgânicos específicos (fosfato, nitrato e metais pesados).

O tratamento biológico, amplamente empregado, apresenta-se como uma opção de baixo custo e de notável versatilidade, uma vez que é responsável pela oxidação de inúmeros poluentes orgânicos. Neste tipo de tratamento, os micro-organismos empregados, especialmente as bactérias, decompõem a matéria orgânica em compostos inorgânicos inócuos, mediante os processos metabólicos aeróbios ou anaeróbios. Os processos aeróbios contam com bactérias ou fungos que utilizam oxigênio molecular, produzindo CO_2 e água. Por outro lado, os processos anaeróbios requerem bactérias que formam CO_2 e CH_4 , cujo aceptor de elétrons pode ser tanto uma espécie de NO_3^- ou SO_4^{2-} , sendo que o oxigênio molecular se faz ausente neste caso (TEIXEIRA & JARDIM, 2004).

Dentre os métodos existentes para a realização do tratamento biológico, as lagoas de estabilização consistem numa opção de baixo custo. Essas são definidas como corpos d'água artificialmente criados para o armazenamento do efluente com alta carga de poluentes orgânicos, para que bactérias, que em condições aeróbias produzem CO_2 e água e ácidos orgânicos em condições anaeróbias, transformem a matéria orgânica putrescível em compostos orgânicos mais estáveis e em compostos minerais. Segundo Collares (2004), as lagoas de estabilização podem ser classificadas em lagoas aeradas aeróbias, lagoas aeradas facultativas, lagoas anaeróbias, lagoas facultativas e lagoas de maturação.

A medição de parâmetros físicos e químicos de corpos d'água é instrumento de uso rotineiro em laboratórios de análise de qualidade de água e, juntamente com a contagem bacteriana, pode fornecer um bom diagnóstico sobre um dado corpo hídrico (VON SPERLING, 2005). Entre os parâmetros físicos usualmente analisados, destacam-se: a turbidez, causada pela presença de sólidos em suspensão, os quais podem servir de abrigo para organismos patogênicos e estar associados a substâncias tóxicas; a temperatura, que geralmente é alterada devido ao despejo de poluentes industriais, exerce grande influência sobre outras variáveis como, por exemplo, sua elevação diminui a solubilidade de gases, como o oxigênio; a condutividade, que é modificada pela temperatura e pela concentração de íons, é considerada uma medida indireta de concentração de poluentes, aumentando conforme aumenta a quantidade de

sólidos dissolvidos.

No grupo dos parâmetros químicos encontram-se, por exemplo: o pH, que depende da presença e tipo de gases e sólidos dissolvidos, e que cujas alterações podem estar ligadas ao despejo de resíduos industriais. Com relação ao tratamento de águas residuárias, valores de pH afastados da neutralidade podem afetar a taxa de crescimento de micro-organismos e valores elevados aumentam a precipitação de metais pesados; o nitrogênio presente naturalmente nos ambientes aquáticos como consequência da decomposição de matéria orgânica (o mesmo ocorre com o fósforo) quando aparece em excesso pode estar ligado à descarga de efluentes domésticos e industriais, fertilizantes, entre outros. Dependendo da sua forma, o nitrogênio pode ser tóxico para diversos organismos, podendo assim indicar o nível de poluição em que um determinado corpo d'água se encontra; o fósforo tem como principais origens antrópicas a matéria fecal advinda de esgotos e os detergentes em pó e, por ser um elemento indispensável ao crescimento de algas, o seu excesso pode levar um corpo hídrico à eutrofização; o oxigênio penetra a água por meio de sua superfície e também é produzido por organismos fotossintetizantes. O aumento da temperatura da água diminui a capacidade do oxigênio ser dissolvido, prejudicando diversos organismos presentes no meio e desfavorecendo o consumo de matéria orgânica por micro-organismos, o que pode levar o corpo d'água à eutrofização; matéria orgânica, medida com auxílio da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e DQO, cuja taxa pode aumentar graças ao despejo de resíduos industriais e domésticos e que, assim como o oxigênio dissolvido (OD), é de primordial importância na determinação do grau de poluição hídrica, sendo a causadora de um dos mais relevantes problemas: o consumo de oxigênio por micro-organismos na decomposição de material orgânico (VON SPERLING, 2005; CETESB, 2009).

São conhecidas como bactérias heterotróficas aquelas bactérias que, diferentemente das que produzem seu próprio alimento a partir de moléculas inorgânicas e energia (autotróficas), dependem da absorção de carbono orgânico como fonte de nutrientes e crescimento. A contagem de bactérias heterotróficas envolve diversos organismos isolados que utilizam carbono orgânico como fonte de nutrientes,

fornecendo informações sobre a qualidade bacteriológica da água de forma bem ampla (DOMINGUES et al., 2007; AMARAL, 2007). A contagem de bactérias heterotróficas é amplamente utilizada como indicador da qualidade da água, sendo que os micro-organismos são detectados por propagação em meios não-seletivos (DOMINGUES et al., 2007). Por sua vez, o isolamento de culturas bacterianas e a posterior identificação das mesmas subsidiam um melhor entendimento acerca da composição da comunidade bacteriana, capaz de permitir um diagnóstico mais apurado da qualidade da água.

Nesse contexto, o uso de métodos moleculares baseados em sequenciamento de DNA para a identificação de membros das comunidades bacterianas e a possibilidade de realização de análises estatísticas de dados de distintas naturezas (parâmetros biológicos, químicos e físicos) de forma conjunta, pode permitir uma avaliação mais adequada da eficiência do tratamento biológico associado ao efluente do refino do petróleo. Para tanto, os modelos conexionistas - dispositivos matemáticos e computacionais com habilidades de agrupar, organizar e integrar dados - têm se apresentado como uma valiosa ferramenta no auxílio à interpretação integrada de informações (NAVARRETE et al., 2015), possibilitando, assim, análise e interpretação conjunta de dados de distintas naturezas.

Neste trabalho foram utilizados modelos conexionistas baseados em dados microbiológicos obtidos a partir da identificação molecular de bactérias heterotróficas cultivadas e isoladas em meio de cultura em laboratório e dados químicos e físicos associados à diversas características de ecossistemas aquáticos. Buscou-se, assim, ampliar o entendimento da dinâmica de comunidades bacterianas em diferentes etapas do tratamento do efluente do refino do petróleo e verificar o potencial de utilização de grupos de bactérias como potenciais bio-indicadores para o monitoramento de qualidade da água após o tratamento biológico do refino do petróleo.

2 OBJETIVOS

Nesse sentido, esta proposta visa:

- Empregar sequenciamento do gene 16S rRNA pelo método de Sanger a fim de identificar um total de 80 culturas de bactérias heterotróficas isoladas a partir de amostras de água do Rio Atibaia e Rio Jaguari coletadas no local de captação de água para uso no tratamento do efluente, à montante da entrada do efluente tratado da Refinaria de Paulínia (REPLAN-Petrobras), na saída da estação de tratamento biológico com lagoa de estabilização e no efluente bruto da refinaria.
- Correlacionar a ocorrência de grupos bacterianos com características dos ecossistemas aquáticos nos diferentes pontos de amostragem, tais como parâmetros físicos (pH, condutividade, temperatura, transparência, sólidos sedimentáveis, sólidos solúveis e em suspensão, material volátil, matéria fixa residual, cor aparente e turbidez) e químicos (oxigênio dissolvido, demanda química de oxigênio, demanda bioquímica de oxigênio, cloretos, acidez em CaCO_3 , alcalinidade, amônia, nitrito, nitrato, íons dissolvidos, sulfetos, óleos e graxas), utilizando modelos conexionistas de integração de dados, a fim de buscar por grupos de bactérias com potencial para atuar como bioindicadores para avaliação da eficiência dos métodos adotados para o tratamento biológico e descarte de resíduos do refino do petróleo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

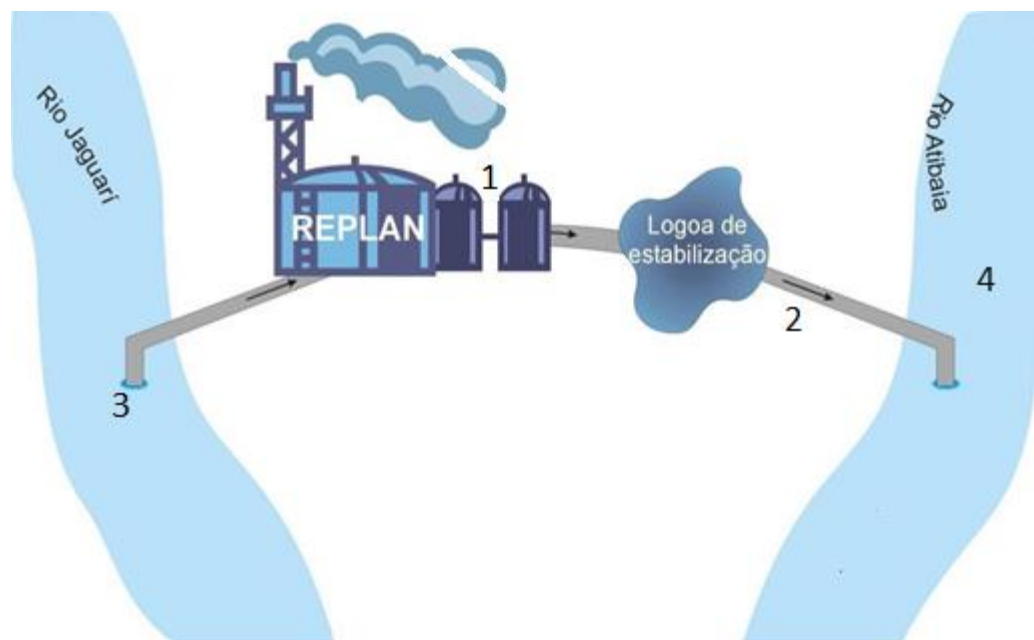
O delineamento amostral considerado neste trabalho e coleta das amostras do efluente final da Refinaria de Paulínia (REPLAN/Petrobras) e água dos rios Atibaia e Jaguari, localizados no entorno da REPLAN, foram os mesmos utilizados pelo projeto de pesquisa desenvolvido no âmbito do convênio UNESP-REPLAN 1 100 005174.09.4, intitulado “Avaliação da toxicidade (atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica) do efluente final da refinaria e das águas do rio Atibaia na região de influência do lançamento”. A seguir são descritos os locais de coleta das amostras consideradas neste estudo e o procedimento de amostragem. A análise dos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos são descritas nos itens **3.1.2. e 3.3** deste trabalho.

3.1 Locais de amostragem e coleta das amostras de efluente e água

Foram coletadas amostras do efluente na entrada do tratamento biológico (efluente bruto), Ponto 1 e na saída da lagoa de estabilização, Ponto 2 da REPLAN/Petrobras. Amostras de água foram coletadas no local de captação de água para uso na refinaria localizado no Rio Jaguari (S 22°41'48"/ W 47°08'59") e à montante do despejo do efluente no Rio Atibaia (S 22°41'28"/W 47°07'22"), pontos 3 e 4 respectivamente.

O Rio Atibaia nasce em Atibaia-SP e é composto pelos rios Atibainha e Cachoeira. Juntamente com o Rio Jaguari, o Atibaia sofre represamento para abastecer o Sistema Cantareira, principal fonte hídrica da região metropolitana de São Paulo. O Rio Atibaia pertence à Classe 2, segundo a Resolução CONAMA 357/05, e percorre a região de Campinas e Paulínia. Com foz localizada abaixo da Represa de Americana, o Rio Atibaia conflui com o Rio Jaguari e formam o Rio Piracicaba.

Figura 1. Esquema representando os pontos de coleta considerados neste estudo. Ponto 1: entrada do tratamento biológico (efluente bruto), ponto 2: saída da lagoa de estabilização, ponto 3: local captação de água para uso no tratamento do efluente, localizado no Rio Jaguari e ponto 4: à montante do despejo do efluente no rio Atibaia. Adaptado do relatório do projeto de pesquisa desenvolvido no âmbito do convênio UNESP-REPLAN 1 100 005174.09.4.



A amostragem e preservação do material foram feitas de acordo com o “Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água”, CETESB, primeira edição, 1988 e o “Guia Nacional de Coletas e Preservação de Amostras de Água e Sedimento, Comunidades Aquáticas e Efluentes Líquidos”, CETESB, 2011.

3.2 Análise de parâmetros físicos e químicos do efluente e da água

Parâmetros físicos e químicos foram analisados nos quatro pontos de coleta. Os seguintes parâmetros físicos foram mensurados: pH, condutividade, temperatura, transparência, sólidos sedimentáveis, sólidos solúveis em suspensão, matéria volátil, matéria fixa residual, cor aparente e turbidez.

As análises químicas contemplaram a quantificação de oxigênio dissolvido (OD), demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), cloretos, acidez em CaCO_3 , alcalinidade, amônia, nitrito, nitrato, sulfetos, cianetos, óleos e graxas, fenóis.

As normas seguidas para as medições dos parâmetros físicos e químicos avaliados neste estudo seguiram as especificações de “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”, vigésima edição. Com exceção das medições de temperatura, que foram feitas em campo, todas as análises foram realizadas no Laboratório de Ensino e Pesquisa de Toxicidade de Águas, do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Rio Claro.

3.3 Análises microbiológicas das amostras de efluente e água

Visando a identificação taxonômica de membros das comunidades bacterianas presentes nos quatro pontos de coleta, procedeu-se inoculação das amostras de efluente e água em meio de cultura e crescimento de culturas bacterianas na superfície de meio de cultura em condições de laboratório, seguida de isolamento das culturas bacterianas, extração de DNA, sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e identificação taxonômica das mesmas.

3.3.1 Inoculação das amostras de efluente e água, e crescimento e isolamento de culturas bacterianas

Para cada amostra coletada, foi realizada uma diluição de 1/10 e, para o plaqueamento das culturas, foram utilizados 0,1 mL das soluções. O meio utilizado para crescimento das culturas bacterianas foi o PCA (Plate Count Agar), depois as cepas foram mantidas em ágar nutriente e, posteriormente, preservadas em glicerol 10% a -80 °C.

Para crescimento dos isolados bacterianos utilizou-se o meio de cultura comercial Caldo Nutriente (M002 HIMEDIA™ Laboratories, Mumbai, India). Para tanto, 39,0 g do meio de cultura foram dissolvidos em 3 L de água destilada. Verteu-se o volume de 30 mL do meio líquido em tubos tipo falcon com capacidade para 50 mL e procedeu-se esterilização em autoclave por 15 minutos a 120 °C, 1 atm.

Cada um dos 80 isolados bacterianos foi inoculado no meio de cultura Caldo Nutriente M002 HIMEDIA™ com o auxílio de pequenos bastonetes de madeira previamente esterilizados. O procedimento foi executado em cabine de segurança biológica sob condições assépticas. Os tubos falcon contendo o inóculo foram mantidos em estufa a 36 °C por sete dias. Um volume de 0,5 mL do caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (M002 HIMEDIA™ Laboratories, Mumbai, Índia) foi adicionado aos meios de cultura cujos inóculos não haviam manifestado crescimento até o quinto dia após a sua inoculação. Ao final de sete dias o crescimento foi interrompido e procedeu-se a extração de DNA das culturas bacterianas.

3.3.2 Extração de DNA das culturas bacterianas

Para extração do DNA genômico das culturas bacterianas os tubos falcon foram centrifugados a uma velocidade de 10.000 rpm por 1,5 min a fim de concentrar as células. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e um volume de 1,8 mL de células

bacterianas foi adicionado a microtubos contendo granada finamente moída, denominados *MicroBead Tubes* do *Kit UltraClean Microbial DNA Isolation™* (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA). As células foram lisadas por agitação horizontal a 10.000 x g por 30 seg (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA). Após a lise celular, o DNA foi extraído de acordo com as instruções do fabricante.

A verificação da qualidade do DNA extraído foi feita em gel de agarose 1%. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro, adotando-se a relação de 1,0 densidade ótica a 260 nm (OD 260) como sendo igual a 50 ng de DNA/ μ L (SAMBROOK et al., 1989).

3.3.3 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA e identificação taxonômica das culturas bacterianas

As amostras do DNA extraído das culturas bacterianas foram enviadas à Macrogen Inc. (Coréia do Sul) para amplificação com os primers 27F AGAGTTTGATCMTGGCTCAG e 1492R TACGGYTACCTTGTTACGACTT (Lane, 1991) e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA bacteriano (o qual tem sido elemento-chave na identificação de base filogenética quando comparado a um banco de dados bem acurado de sequências do gene 16S rRNA) (Kim, et al., 2012). A amplificação foi feita em solução contendo: 2,5 μ L de tampão para PCR 10 X, 0,8 mM de cada dNTP (2,0 μ L), 5,0 mM de MgCl₂ (2,5 μ L), 8,0 pmoles de cada primer, 1,25 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen) (0,25 μ L), 1 μ L do pool de DNA de cada cultura, e água ultra-pura (Milli-Q) esterilizada para um volume final de 25 μ L. As condições de reação foram 95° C por 5 min, 30 ciclos de 95° C por 30 seg, 50° C por 30 seg e 72° C por 90 seg; e 72° C por 7 min. O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foi realizado em sequenciador capilar automático modelo ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram editadas usando os programas Phred/Phrap/Consed em sistema operacional Linux e comparadas com sequências do *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI),

utilizando o programa nucleotide blast do Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al, 1990). A análise comparativa das sequências foi realizada com o *Ribosomal Database Project II* (RDP II) (WANG et al., 2007) versão 9.52 (<http://rdp.cme.msu.edu>).

3.4 Análises estatísticas

Análise de correlação (*Spearman*) foi conduzida utilizando o pacote *multtest* do programa R (versão 2.6.0, *The R Foundation for Statistical Computing*). Diferentes níveis de significância estatística ($P < 0,07$) foram considerados para testar a construção das redes artificiais de inter-relações entre a presença e ausência de espécies bacterianas e parâmetros químicos e físicos dos corpos d'água obtidos no âmbito do convênio UNESP-REPLAN/Petrobras. Para a configuração da rede, a topologia (número de camadas, unidades em cada camada, etc), parâmetros do algoritmo de treinamento e funções de ativação foram determinadas. Após treinamento das redes, as mesmas foram integradas aos diferentes módulos da aplicação e analisadas usando o programa *Gephi*, o qual dispõe de interface gráfica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros físicos e químicos do efluente e da água

Os resultados da avaliação de parâmetros físicos e químicos das amostras de efluente e água revelaram menor taxa de OD no ponto 1 (efluente bruto) em comparação com os demais pontos de coleta (Tabela 1). Por sua vez, a taxa de oxigênio dissolvido foi maior no ponto 2 (saída do tratamento biológico, quando o efluente é disponibilizado no rio Atibaia) quando comparada à encontrada nos pontos

de coleta 3 e 4, Rio Jaguari e Rio Atibaia, à montante do lançamento do efluente, respectivamente. Quanto a DBO e DQO foram notavelmente mais elevadas no ponto 1 do que nos demais pontos de coleta (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros físicos e químicos do efluente bruto e tratado da REPLAN/Petrobras e dos Rios Jaguari e Atibaia medidos nos diferentes pontos de coleta.

Parâmetros	Pontos de coleta			
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4
pH	7,81* ± 0,39**	8,2 ± 0,26	7,55 ± 0,22	7,76 ± 0,17
Condutividade (uS/cm)	2303,78 ± 525,86	2188,35 ± 555,94	87,18 ± 21,23	245,96 ± 70,16
Temperatura (°C)	30 ± 2,76	26 ± 3,13	22 ± 3,07	22 ± 3,07
Transparência (cm)	- -	- -	- -	53 ± 25,2
Sólidos sedimentáveis (ml/L)	1,07 ± 1,88	<0,41 ± -	0,12 ± 0,04	0,61 ± 0,71
Sólidos solúveis em suspensão (g/L)	17021 ± 0,36	14209 ± 0,46	0,1663 ± 0,09	0,2806 ± 0,1
Matéria volátil (g/L)	0,4611 ± 0,24	0,3707 ± 0,28	0,1073 ± 0,08	0,1079 ± 0,05
Matéria fixa residual (g/L)	1,26 ± 0,38	1,05 ± 0,53	0,06 ± 0,07	0,17 ± 0,1
Cor aparente (Ptco)	1251 ± 605,95	196 ± 145,74	160 ± 198,45	214 ± 272,66
Turbidez (NTU)	82,12 ± 25,85	18,22 ± 17,65	22,74 ± 19,48	29,86 ± 25,63
Oxigênio dissolvido (mg/L)	2,42 ± 1,9	7,08 ± 1,67	7,6 ± 1,7	7,27 ± 1,71
Demanda química de oxigênio (mg/L)	1102,04 ± 665,39	137,47 ± 52,42	13,77 ± 9,93	21,44 ± 14,36
Demanda bioquímica de oxigênio (mg/O ₂ /L)	675,2 ± 328,77	27,69 ± 14,33	7,97 ± 3,71	15,97 ± 12,34
Cloretos (mg/L)	603,02 ± 164,58	542,92 ± 152,33	6,61 ± 2,7	16,99 ± 5,98
Acidez em CaCO ₃ (mg/L)	7,54 ± 5,57	0 ± 0	3,77 ± 0,44	3,88 ± 0
Alcalinidade em CO ₃ (mg/L)	12,3 ± 23,06	24,4 ± 10,4	0 ± 0	0 ± 0
Alcalinidade em HCO ₃ (mg/L)	275,69 ± 47,47	188,29 ± 30,64	27,68 ± 4,09	38,09 ± 7,36
Amônia (mg NH ₃ /L)	38,33 ± 14,64	1,9 ± 2,75	1,09 ± 0,45	2,15 ± 1,47
Nitrito (mg/NO ₂ /L)	0,0371 ± 0,01	0,2363 ± 0,14	0,1387 ± 0,08	0,2242 ± 0,05
Nitrato (mg NO ₃ ⁻ /L)	115294 ± 3,9	50916 ± 2,95	16045 ± 0,73	23848 ± 1,78
Sulfetos (µg/L ⁻¹ S ²⁻)	175,5 ± 90,31	9,09 ± 6,13	8,61 ± 11,38	6,89 ± 6,52
Cianetos (mg/L)	3895 ± 1,2	0,002 ± 0	0,003 ± 0	0,002 ± 0
Óleos e graxas (mg/L)	- -	1,1 ± 0,63	- -	1,34 ± 1,26
Fenóis	- -	0,84 ± 0,68	- -	1720 ± 1,27

*média calculada com base em 18 diferentes replicatas de coleta.

**desvio padrão calculado com base em 18 diferentes replicadas de coleta.

4.2 Identificação taxonômica dos isolados bacterianos

A partir da identificação taxonômica baseada em sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos, foram encontradas 12 diferentes famílias de bactérias distribuídas entre os quatro pontos de amostragem. Membros pertencentes às famílias *Enterobacteriaceae*, *Paenibacillaceae*, *Pseudomonadaceae* e *Bacillaceae* foram ubíquos nas amostras estudadas, de forma que estiveram presentes em todos os pontos (exceto membros da família *Bacillaceae* que não foram identificados em amostras coletadas no ponto 2), e apresentaram dominância em relação às demais famílias bacterianas identificadas, tendo os maiores índices de abundância relativa em cada ponto, como mostrado na **Tabela 2**. O resultado da identificação taxonômica das sequências parciais do gene 16S rRNA de cada isolado bacteriano encontra-se disponível nos APÊNDICES 1 e 2 ao final deste trabalho.

A ocorrência reportada para as famílias *Enterobacteriaceae*, *Paenibacillaceae*, *Pseudomonadaceae* e *Bacillaceae* deve-se, provavelmente, ao método de cultivo e isolamento das culturas bacterianas em laboratório, o qual utilizou meio de cultura e condições de incubação que podem ter favorecido o crescimento e isolamento de membros pertencentes a estas famílias em detrimento de membros recalcitrantes da comunidade bacteriana em condições de laboratório.

Tabela 2. Abundância relativa das famílias de bactérias identificadas dos diferentes pontos de coleta do efluente e água.

Local	Família	Abundância relativa
Efluente bruto (P1)	<i>Enterobacteriaceae</i>	63,64
	<i>Paenibacillaceae</i>	18,18
	<i>Pseudomonadaceae</i>	9,09
	<i>Carnobacteriaceae</i>	9,09
Saída da lagoa de estabilização (P2)	<i>Enterobacteriaceae</i>	39,13
	<i>Bacillaceae</i>	21,73
	<i>Ferrimonadaceae</i>	4,35
	<i>Paenibacillaceae</i>	4,35
	<i>Aeromonadaceae</i>	4,35
	<i>Halomonadaceae</i>	4,35
	<i>Pseudomonadaceae</i>	8,69
	<i>Chitinophagaceae</i>	4,35
	<i>Flavobacteriaceae</i>	4,35
Rio Jaguari (P3)	<i>Enterobacteriaceae</i>	66,68
	<i>Bacillaceae</i>	9,52
	<i>Pseudomonadaceae</i>	9,52
	<i>Aeromonadaceae</i>	9,52
	<i>Paenibacillaceae</i>	4,76
montante do lançamento do efluente (P4)	<i>Enterobacteriaceae</i>	43,75
	<i>Synergistaceae</i>	6,25
	<i>Paenibacillaceae</i>	18,75
	<i>Bacillaceae</i>	25
	<i>Pseudomonadaceae</i>	6,25

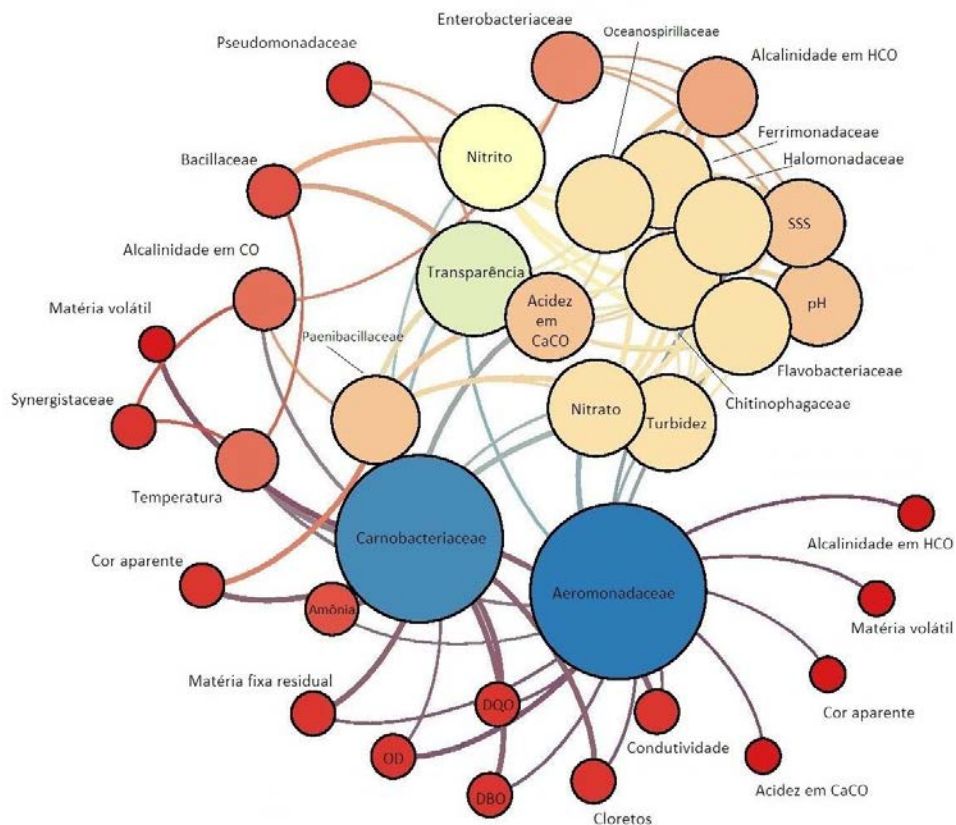
2

4.3 Estatística e análise conexista

A partir da análise de correlação de *Spearman*, a qual revelou o nível de correlação entre famílias de bactérias e os parâmetros físicos e químicos avaliados neste estudo, foi gerada uma rede artificial de inter-relações entre famílias de bactérias e parâmetros físico-químicos do efluente e da água (Figura 2). A rede destaca as relações estabelecidas pelas famílias *Aeromonadaceae* e *Carnobacteriaceae*, as quais estão representadas pelos círculos maiores e que, portanto, estabelecem maior número de relações teóricas com os parâmetros avaliados e/ou com outras famílias de bactérias.

Verificou-se também que ambas as famílias *Aeromonadaceae* e *Carnobacteriaceae* estabelecem relações com três importantes parâmetros de qualidade de água: OD, DBO e DQO. Sendo que *Aeromonadaceae* relaciona-se positivamente (tipo de relação representada por traços de conexão espessos) com OD e negativamente (tipo de relação representada por traços de conexão finos) com DBO e com DQO. Um padrão oposto foi revelado para *Carnobacteriaceae*, que estabelece relação negativa com O.D. e relações positivas tanto com DBO quanto com DQO.

Figura 2. Rede artificial de inter-relações entre famílias de bactérias e parâmetros físicos e químicos do efluente e da água avaliados. O tamanho das circunferências indica a quantidade de correlações estabelecidas por cada parâmetro físico e químico avaliado ou família de bactéria, i.e. quanto maior a circunferência, maior o número de relações teóricas. A espessura dos traços indica se a relação é positiva ou negativa, de forma que traços mais espessos indicam relações positivas e traços mais tênues, relações negativas.



4.4 Discussão

Foi observada a dominância das famílias *Bacillaceae*, *Enterbacteriaceae*, *Paenibacillaceae* e *Pseudomonadaceae* nas amostras analisadas, o que pode ser devido às condições de cultivo e isolamento das culturas bacterianas em laboratório, tais como temperatura de incubação (36°C), visto que a este fator é um dos principais atributos que governa a abundância e a distribuição dos micro-organismos. Com exceção de *Bacillaceae*, as outras três famílias de bactérias mencionadas anteriormente possuem membros mesofílicos (BATT & TORTORELLO, 2014; BAYLIS et al., 2011; ZEIGLER, 2013), ou seja, que se desenvolvem melhor sob temperatura mediana e possuem temperatura ótima de crescimento entre 20 e 45°C. Em estudo sobre bactérias de águas termais na Índia, Sen & Maiti (2014) encontraram predominância de indivíduos advindos de diferentes grupos, entre eles *Enterobacteriaceae*, *Paenibacillaceae*, *Bacillaceae* e *Pseudomonadaceae*, i.e. as mesmas famílias que predominaram nas amostras analisadas no presente estudo. *Enterobacteriaceae*, *Paenibacillaceae* e *Bacillaceae* são famílias de bactérias anaeróbias facultativas, i.e. podem obter energia na ausência de oxigênio. Esta característica torna os membros dessas famílias mais facilmente cultivados em condições de laboratório. *Pseudomonadaceae*, apesar de apresentar-se como aeróbia estrita, não possui exigências nutritivas específicas, o que a torna ubíqua naturalmente e passível de desenvolvimento em meio de cultura feito em laboratório.

A rede de interação de famílias de bactérias com parâmetros físicos e químicos determinados a partir dos diferentes pontos de amostragem considerados neste estudo evidencia relações teóricas estabelecidas pelas famílias *Carnobacteriaceae* e *Aeromonadaceae* com tais parâmetros.

Carnobacteriaceae são bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas e se apresentam em forma de bastonetes, geralmente associadas a ambientes com matéria orgânica em decomposição (BUCHANAN & GIBBONS, 1974). No presente estudo,

membros da família *Carnobacteriaceae* foram identificados apenas no efluente bruto (Ponto 1). Kim *et al.* (2013) mostraram membros da família *Carnobacteriaceae* associados ao influente de curtume (termo equivalente a “efluente bruto”) gerado no processamento do couro. Tanto o influente do refino de petróleo quanto de curtume apresentam alta carga de compostos orgânicos, além de diversos agentes tóxicos,.

A relação teórica entre membros da família *Carnobacteriaceae* e a presença de matéria orgânica foi evidenciada pela rede de interação de famílias de bactérias com parâmetros físicos e químicos dos pontos de amostragem, a qual foi revelada por meio de relação negativa entre membros desta família e os níveis de OD, e relação positiva com a DBO e DQO. Tais relações teóricas sugerem que membros da família *Carnobacteriaceae* podem estar associados a ambientes com baixas taxas de oxigênio dissolvido e elevadas demandas bioquímica e química de oxigênio, nos quais geralmente se encontra elevada quantidade de material orgânico em decomposição.

Por sua vez, a família *Aeromonadaceae* é composta por bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas e em formato de bastonete que podem ser encontradas em diversos tipos de ecossistemas aquáticos: de água doce, água marinha e salobra e em águas limpas e poluídas, sendo que alguns membros da família *Aeromonadaceae* ocorrem exclusivamente em águas de boa qualidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). Além disso, a maioria das bactérias pertencentes a essa família são sensíveis à presença de cloro e a baixíssimas concentrações de cobre (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002), substâncias estas que estão presentes no efluente do refino de petróleo.

No presente estudo, a família *Aeromonadaceae* foi encontrada em apenas dois dos quatro pontos de coleta: na saída da lagoa de estabilização (Ponto 2) e no rio Jaguari (Ponto 3), os quais apresentam taxa oxigênio em média mais alta do que a encontrada no efluente bruto (Ponto 1).

A rede de interação de famílias de bactérias com parâmetros físicos e químicos dos pontos de amostragem evidencia relações teóricas entre *Aeromonadaceae* e oxigênio dissolvido (interação positiva) e demanda bioquímica e química de oxigênio (interação negativa), o que indica que membros da família *Aeromonadaceae* podem

estar presentes em sistemas ricos em oxigênio e com quantidades moderadas de matéria orgânica.

Ambientes aquáticos com elevadas concentrações de matéria orgânica acabam por consumir o oxigênio dissolvido via oxidação química e, particularmente, bioquímica, mediante a respiração dos micro-organismos decompositores.

Se a quantidade de material orgânico encontrada em um corpo d'água excede a sua capacidade de autodepuração (capacidade de promover a estabilização de determinada carga poluidora nele lançada), as taxas de oxigênio dissolvido diminuem drasticamente, podendo zerar, e comprometer a vida dos organismos habitantes deste corpo d'água. Sendo assim, as taxas de oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio e demanda química de oxigênio representam excelentes parâmetros para se avaliar o nível de poluição orgânica de ambientes lóticos (VALENTE et al., 1997).

5 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que a família *Carnobacteriaceae* pode ser considerada potencial indicadora de poluição em ambientes com alta carga de matéria orgânica e baixas taxas de oxigênio. Por outro lado, tais resultados sugerem que a família *Aeromonadaceae* pode ser considerada potencial indicadora de ambientes não poluídos, fazendo-se presente em condição de elevada disponibilidade de oxigênio e onde o material orgânico está presente de forma equilibrada, não afetando a capacidade de autodepuração do corpo d'água. Desta forma, pode-se concluir que bactérias pertencentes à família *Carnobacteriaceae* apresentam-se como possíveis indicadores de poluição decorrente da presença de efluente do refino de petróleo e que bactérias da família *Aeromonadaceae*, em oposição, mostram-se possíveis bioindicadores de ambientes não poluídos ou recuperados, como é o caso da saída da lagoa de estabilização (Ponto 2) neste estudo. Somados a isso, os resultados das análises físico-químicas revelam diferenças nos valores de oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio e demanda química de oxigênio obtidos nos pontos 1 e 2 deste estudo, sugerindo que a Refinaria de Paulínia (REPLAN) tem tratado o efluente gerado em suas dependências de forma eficaz.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.L. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 215, p. 403-410, 1990.
- BATT, C. A.; TORTORELLO, M. L. **Encyclopedia of food microbiology**. 2. ed. London, U.K.: Elsevier, 2014. Disponível em < <https://books.google.com.br/books?id=1b1CAqAAQBAJ&pg>>. Acessado em 20 mar. 2015
- BAYLIS, C. B.; UYTENDAELE, H. J.; DAVIES, A. **The enterobacteriaceae and their significance to the food industry**. Brussels, Belgium: ILSI Europe a.i.s.b.l, 2011.
- BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8. ed. Baltimore, USA: Williams and Wilkins, 1974.
- CETESB. Qualidade das Águas Interiores no Estado de São Paulo, apêndice A. 2009. Disponível em: < http://www.ambiente.sp.gov.br/aguas_interiores/files/2013/11/variaveis.pdf>. Acesso em: 20 de mar de 2015.
- CETESB. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras**: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011.
- COLLARES, S. **Avaliação do uso de recursos hídricos em refinarias de petróleo: um estudo de caso na Petrobras**. 2004. 150 p., Dissertação (Mestrado em Sistema de Gestão) – Universidade Federal Fluminense. Rio de Janeiro, 2004.
- DOMINGUES, V. O.; TAVARES, G. D.; STULKER, F.; MICHELOT, T. M.; REETZ, L. G. B.; BERTONCHELI, C. M.; HORNER, R. Contagem de bactérias heterotróficas na água para consumo humano: comparação entre duas metodologias. **Saúde**, Santa Maria, v. 33, n 1, p. 15-19, 2007.
- KIM, O.; CHO, Y.; LEE, K.; YOON, S.; KIM, M.; NA, H.; PARK, S.; JEON, Y.; LEE, J.; YI, H.; WON, S.; CHUN, J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Local, v. 62, n. 5, p. 716-721, 2012.
- LANE, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acids Techniques in Bacterial Systematics* ed. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. pp. 115–175. Chichester: Wiley.
- MARIANO, J. B. **Impactos ambientais do refino de petróleo**. 2001. 279 p. Tese (pós-graduação de Engenharia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.
- NAVARRETE, A.A.; TSAI, S.M.; MENDES, L.W.; FAUST, K.; DE HOLLANDER, M.; CASSMAN N, RAES J.; VAN VEEN J.A.; KURAMAE E.E. Soil microbiome responses to

the short-term effects of Amazonian deforestation. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 10, p. 2433-2448, 2015.

NOGUEIRA, A. A. **Biofiltração e oxidação avançada para tratamento terciário e reúso de efluentes de refinaria de petróleo**. 2013. 149 p., Dissertação (Mestrado em Programa de pós-graduação em Engenharia Química) – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

TEIXEIRA, C. P. A. B.; JARDIM, W. F. **Processos oxidativos avançados: Conceitos teóricos**. Laboratório de Química Ambiental, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2004. 83 p. **Caderno temático**, v. 3.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. Cold Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 999 p.

SANTAELLA, S. T.; SILVA, F. C. G. J.; GADELHA, D. A. C.; COSTA, K. O.; AGUIAR, R.; ARTHAUD, I. D. B.; LEITÃO, R. C. Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger*. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Fortaleza, v. 14, n. 1, p.139-148, jan/mar 2009.

SEN, R.; MAITI, N. K. Genomic and functional diversity of bacteria isolated from hot springs in Odisha, India. **Geomicrobiology Journal**, Orissa, India. v. 31, p. 541-550. 2014.

SPEIGHT, J. G. **The chemistry and technology of petroleum**. 5 ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2010

VALENTE, J. P. S.; PADILHA, SILVA, A. M. M. Oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) como parâmetros de poluição no ribeirão Lavapés/Botucatu – SP. **Eclética Química**, São Paulo, Brasil. v. 22, 1997.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3. ed. Belo Horizonte, SEGRAC, 2005.

WANG, Q.; GARRITY G. M.; TIEDJE, J. M.; COLE, J. R. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**. Michigan, v. 73, p. 5261-5267, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality**. 2. ed. Geneva, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2002.

ZEIGLER, D. R. **The family Paenibacillaceae, Bacillus genetic stock center catalog of strains part 5**. Columbus: Bacillus Genetic Stock Center, USA, 2013.

APÊNDICE 1

Tabela 1. Resultado de comparações das sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas em amostras de efluente e água analisadas neste estudo, com sequências depositadas no banco de dados do RDP II pelo programa Classifier.

Organismo	Filo		Classe		Ordem		Família	
I1	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I2	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I3	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I4	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I5	Proteobacteria	99%	Gammaproteobacteria	99%	Enterobacteriales	97%	Enterobacteriaceae	97%
I6	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I8	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I9	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I10	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I11	Firmicutes	100%	Bacilli	100%	Bacillales	94%	Bacillaceae	62%
I12	Synergistetes	6%	Synergistia	6%	Synergistales	6%	Synergistaceae	6%
I13	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I14	Proteobacteria	90%	Gammaproteobacteria	85%	Enterobacteriales	54%	Enterobacteriaceae	54%
I16	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Alteromonadales	36%	Ferrimonadaceae	34%
I17	Firmicutes	100%	Bacilli	100%	Bacillales	100%	Paenibacillaceae	100%
I18	Firmicutes	100%	Bacilli	100%	Bacillales	93%	Bacillaceae	35%
I19	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I20	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I21	Firmicutes	100%	Bacilli	100%	Bacillales	94%	Bacillaceae	58%
I23	Firmicutes	100%	Bacilli	100%	Bacillales	100%	Paenibacillaceae	100%
I24	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I25	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I26	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I27	Firmicutes	100%	Bacilli	100%	Bacillales	97%	Bacillaceae	62%
I28	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I29	Firmicutes	100%	Bacilli	100%	Bacillales	98%	Bacillaceae	57%
I30	Firmicutes	100%	Bacilli	100%	Bacillales	98%	Bacillaceae	85%
I34	Firmicutes	100%	Bacilli	100%	Bacillales	100%	Paenibacillaceae	100%
I35	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%

Tabela 1. Resultado de comparações das sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas em amostras de efluente e água analisadas neste estudo, com sequências depositadas no banco de dados do RDP II pelo programa Classifier. (continuação)

Organismo	Filo		Classe		Ordem		Família	
I36	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I37	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I38	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I39	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Aeromonadales	100%	Aeromonadaceae	100%
I40	Firmicutes	100%	Bacilli	100%	Bacillales	100%	Paenibacillaceae	63%
I41	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Pseudomonadales	100%	Pseudomonadaceae	100%
I42	Firmicutes	100%	Bacilli	99%	Bacillales	99%	Bacillaceae	39%
I43	Proteobacteria	41%	Gammaproteobacteria	21%	Oceanospirillales	6%	Halomonadaceae	1%
I44	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Pseudomonadales	100%	Pseudomonadaceae	100%
I46	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I48	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I49	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Aeromonadales	100%	Aeromonadaceae	100%
I50	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I51	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I52	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I53	Firmicutes	100%	Bacilli	100%	Bacillales	100%	Paenibacillaceae	100%
I54	Firmicutes	100%	Bacilli	100%	Bacillales	97%	Bacillaceae	57%
I55	Firmicutes	100%	Bacilli	100%	Bacillales	97%	Bacillaceae	63%
I56	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	67%	Enterobacteriaceae	67%
I57	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Pseudomonadales	100%	Pseudomonadaceae	100%
I58	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I59	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Pseudomonadales	100%	Pseudomonadaceae	100%
I60	Firmicutes	40%	Bacilli	35%	Lactobacillales	33%	Carnobacteriaceae	28%
I61	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Aeromonadales	100%	Aeromonadaceae	100%
I62	Firmicutes	100%	Bacilli	100%	Bacillales	100%	Paenibacillaceae	87%
I63	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I65	Bacteroidetes	18%	Sphingobacteria	7%	Sphingobacteriales	7%	Chitinophagaceae	4%
I66	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I67	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I68	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%

Tabela 1. Resultado de comparações das sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas em amostras de efluente e água analisadas neste estudo, com sequências depositadas no banco de dados do RDP II pelo programa Classifier. (continuação)

Organismo	Filo		Classe		Ordem		Família	
I69	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Pseudomonadales	100%	Pseudomonadaceae	100%
I70	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I71	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I72	Firmicutes	100%	Bacilli	100%	Bacillales	100%	Paenibacillaceae	100%
I73	Firmicutes	100%	Bacilli	100%	Bacillales	100%	Bacillaceae	46%
I74	Firmicutes	100%	Bacilli	100%	Bacillales	100%	Bacillaceae	100%
I75	Bacteroidetes	29%	Flavobacteria	20%	Flavobacteriales	20%	Flavobacteriaceae	16%
I76	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I77	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Pseudomonadales	100%	Pseudomonadaceae	100%
I78	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%
I79	Proteobacteria	80%	Gammaproteobacteria	73%	Oceanospirillales	47%	Oceanospirillaceae	43%
I80	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Enterobacteriales	100%	Enterobacteriaceae	100%

☐

APÊNDICE 2

Tabela 1. Resultado de comparações das sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas a partir das amostras de efluente e água analisadas neste estudo, com sequências depositadas no GeneBank utilizando o programa Blast.

Isolado	ID(%)	Nº Acesso	PB	e Value	Organismo
I1	97	JX524616.1	1231	0	Citrobacter freundii strain RB6
I2	93	JF701185.1	1086	0	Raoultella sp. TJ_TMA
I3	97	DQ444287.1	1250	0	Klebsiella pneumoniae strain 3
I4	97	FJ893837.1	1206	0	Uncultured bacterium clone nbt36b09
I5	85	EU471245.1	950	0	Uncultured bacterium clone RP_3aaa03f02
I6	94	KC431797.1	1377	0	Enterobacter aerogenes strain RB19
I8	95	KC431796.1	1339	0	Enterobacter hormaechei strain RB18
I9	97	JN615789.1	1221	0	Uncultured bacterium clone TM1831OfO8
I10	96	JQ308608.1	1277	0	Serratia marcescens strain U1PS 1-1
I11	96	JQ773351.1	1234	0	Bacillus cereus strain ZK2
I12	-	-	-	-	-
I13	83	HM557575.1	957	0	Uncultured bacterium clone BICP947
I14	81	HQ813438.1	920	0	Uncultured organism clone ELU0170-T416-S-NIPCRAMgANa_000493 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
I16	92	KC904095.1	1058	0	Aeromonas hydrophila strain P10
I17	94	KC999112.1	1191	0	Brevibacillus sp. KUMAs2
I18	94	EU162024.1	1093	0	Bacillus cereus isolate PGBw4
I19	94	DQ399748.1	994	0	Serratia sp. B-1135
I20	94	JX473144.1	894	0	Uncultured gamma proteobacterium clone URO61.B09
I21	96	HE660034.1	1261	0	Bacillus cereus partial 16S rRNA gene, isolate BCsn
I22	-	-	-	-	-
I23	96	AB731746.1	1333	0	[Streptomyces] sp. TSA-KSA gene for 16S rRNA, partial sequence
I24	91	CP006252.1	991	0	Serratia liquefaciens ATCC 27592, complete genome
I25	95	KC708558.1	1335	0	Enterobacter sp. Y3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
I26	94	KC431797.1	1357	0	Enterobacter aerogenes strain RB19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I27	95	HQ831419.1	1357	0	Bacillus cereus strain Nt1-18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I28	90	KF737363.1	1011	0	Serratia sp. QW8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I29	96	KC422648.1	1227	0	Bacillus sp. PS16(2013) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I30	98	HM063030.1	1261	0	Bacillus sp. CRRI-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I34	97	KC311720.1	1262	0	Brevibacillus agri strain S4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I35	95	KC189608.1	1217	0	Klebsiella sp. AR58 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Tabela 1. Resultado de comparações das seqüências parciais do gene 16S rRNA obtidas a partir das amostras de efluente e água analisadas neste estudo, com seqüências depositadas no GeneBank utilizando o programa Blast. (continuação)

Isolado	ID(%)	Nº Acesso	PB	e Value	Organismo
I36	90	KF031146.1	1109	0	Enterobacter asburiae strain DCY9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I37	97	KJ806473.1	1242	0	Shigella sonnei strain S-B13E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I38	94	JF697434.1	1054	0	Uncultured bacterium clone reservoir-53 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I39	97	KF413422.1	1304	0	Aeromonas veronii strain FS 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I40	96	HQ236085.1	1226	0	Paenibacillus elgii strain TBT3-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I41	97	KF786991.1	1123	0	Uncultured Pseudomonadaceae bacterium clone S2-8-094 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I42	92	GU366197.1	1011	0	Brevibacillus sp. RA5U1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I43	-	-	-	-	-
I44	96	KC431806.1	1235	0	Pseudomonas plecoglossicida strain RB28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I45	83	JN999887.1	1054	0	Lysinibacillus xylanilyticus strain GDLY1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I46	94	JX473144.1	902	0	Uncultured gamma proteobacterium clone URO61.B09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I48	88	JX141319.1	949	0	Serratia sp. VET-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I49	96	KJ806425.1	1345	0	Aeromonas hydrophila strain A-X8A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I50	96	KC873101.1	1239	0	Uncultured bacterium clone S42_017 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I51	98	KC853301.1	1137	0	Enterobacter asburiae strain XF5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I52	98	EF694073.1	1208	0	Pseudomonas fluorescens strain yl 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I53	99	KC311720.1	1138	0	Brevibacillus agri strain S4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I54	97	EU333128.1	1233	0	Bacillus sp. Pc60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I55	95	KF256128.1	1410	0	Bacillus cereus strain ASDS9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I56	96	JX155398.1	1148	0	Aeromonas hydrophila strain L602 16S ribosomal RNA, partial sequence
I57	96	KC920926.1	1281	0	Pseudomonas sp. DT4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I58	96	HQ259958.1	1197	0	Klebsiella pneumoniae strain 21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I59	98	JX082197.1	1210	0	Pseudomonas protegens strain CY01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I60	86	DQ818058.1	140	2,00E-32	Uncultured bacterium clone aaa52e05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I61	96	KJ210843.1	1354	0	Aeromonas sp. T9 16S ribosomal RNA, partial sequence
I62	97	HQ236085.1	970	0	Paenibacillus elgii strain TBT3-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I63	92	KC167881.1	1088	0	Serratia grimesii strain CNY-04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I64	77	AB571066.1	173	4,00E-13	Serratia marcescens gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: DI101
I65	-	-	-	-	-
I66	96	JQ189212.1		0	Uncultured bacterium clone BD14752 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I67	97	JF709917.1		0	Uncultured bacterium clone B108 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I68	97	HQ455820.1		0	Enterobacter asburiae strain M16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Tabela 1. Resultado de comparações das seqüências parciais do gene 16S rRNA obtidas a partir das amostras de efluente e água analisadas neste estudo, com seqüências depositadas no GeneBank utilizando o programa Blast. (continuação)

Isolado	ID(%)	Nº Acesso	PB	e Value	Organismo
I69	96	KF668329.1		0	Pseudomonas sp. J4AJ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I70	98	JN615789.1		0	Uncultured bacterium clone TM1831OfO8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I71	98	Y17664.1		0	Klebsiella sp. 16S rRNA gene, strain BEC441, partial
I72	96	KC311720.1		0	Brevibacillus agri strain S4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I73	97	HQ457013.1		0	Bacillus pumilus strain HSD3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I74	95	KF476039.1		0	Bacillus cereus strain SCD3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I75	-	-	-	-	-
I76	99	JQ765423.1	1158	0	Enterobacter sp. MLB27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I77	92	JF232507.1	1065	0	Uncultured bacterium clone ncd2676g09c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I78	98	GQ417300.1	1195	0	Uncultured Citrobacter sp. clone F2feb.74 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
I79	84	HG942144.1	871	0	Pseudomonas sp. TA_DQ1 partial 16S rRNA gene, strain TA_DQ1
I80	93	KC167881.1	1089	0	Serratia grimesii strain CNY-04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

□