
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

BIODEGRADAÇÃO DE NAFTALENO, FENANTRENO E DIESEL POR ISOLADOS DO
GÊNERO *Burkholderia* DA AMAZÔNIA

BIANCA FURLAN

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Março - 2011

BIANCA FURLAN
BIÓLOGA

**BIODEGRADAÇÃO DE NAFTALENO, FENANTRENO E DIESEL POR ISOLADOS
DO GÊNERO *Burkholderia* DA AMAZÔNIA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS**

Co-orientadora: **Prof^a. Dr^a. SIU MUI TSAI**

Rio Claro

2011

620.1122 Furlan, Bianca

F985b Biodegradação de naftaleno, fenantreno e diesel por isolados do gênero BURKHOLDERIA da Amazônia / Bianca Furlan. - Rio Claro : [s.n.], 2011
114 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Dejanira de Franceschi de Angelis
Co-Orientador: Siu Mui Tsai

1. Biodegradação. 2. Terra Preta Antropogênica. 3. Hidrocarbonetos poliaromáticos. 4. 16S rRNA. 5. RecA. 6. DCPIP. I. Título.

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

BIANCA FURLAN

**BIODEGRADAÇÃO DE NAFTALENO, FENANTRENO E DIESEL POR ISOLADOS
DO GÊNERO *Burkholderia* DA AMAZÔNIA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Dejanira de Franceschi de Angelis

Prof^a. Dr^a. Siu Mui Tsai

Prof^a. Dr^a. Margarete de Fátima Costa

Prof^a. Dr^a. Eleonora Cano Carmona

Rio Claro, 29 de Março de 2011.

*Aos meus pais,
pelo amor, exemplo,
confiança e incentivo
em todos os momentos...*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Deus pela minha vida maravilhosa, por todas as oportunidades no meu caminho e as escolhas, certas ou erradas, que tomei. Isso me fez crescer...

Aos meus pais tão amados, Pedro e Creusa, pelo amor incondicional em todos os momentos. Pelos exemplos, pois sem eles eu não saberia caminhar. Pelas palavras de carinho que tornou possível ser o que sou hoje e realizar todos os meus sonhos.

Ao meu eterno amor, Bruno, com quem compartilho sonhos... Sem seu amor e sua companhia eu viveria na tristeza e sem o brilho e a alegria que tenho no olhar... Agradeço pelos conselhos, pelos dias felizes, pelas horas que você enxugou minhas lágrimas, pelo exemplo de dedicação, competência e de Grande Homem que você é... Eu amo você!

Ao meu irmão, Gustavo e à Camila, por estarem sempre ao meu lado, me fazendo sorrir por coisas simples, pelo amor e por demonstrar que na vida a base é a felicidade!

Aos meus avós, tios, tias, primos, primas, Cida, Pedro, Eliana e Ricardo Danelon, pela convivência diária.

Aos meus afilhados Pedro e Júlia, pela alegria e carinho que vejo em seus olhares.

À minhas células-companheiras: Ana Carolina, Bruna, Carla, Karen, Maria Ligia, Mylenne, Nara e Natália, que desde a graduação estão ao meu lado, dividindo muitas risadas e momentos agradáveis e inesquecíveis.

Aos meus amigos Doug e Ly, Carol José Maria, Ademir e Lillian, Kelly e Matheus, Luciano França e Rafaela Miotto, pela amizade sem fim.

À Prof^a Dejanira e Prof^a Tsai pelos ensinamentos, estímulos e carinho. São exemplos a ser seguido!

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA/USP) e do Departamento de Bioquímica e Microbiologia (UNESP-Rio Claro).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo suporte financeiro.

Agradeço todas as pessoas, citadas aqui ou não, que tornaram este trabalho possível e deixaram minha vida muito mais alegre. Obrigada!!! ;D

Não é o mais forte da espécie que sobrevive,
nem o mais inteligente que sobrevive.
É aquele que é o mais adaptável à mudança.”

Charles Darwin

Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor (...) E conhecesse todos os mistérios e toda a ciência (...) e não tivesse amor, nada seria.

1 Coríntios 13, 1-2

SUMÁRIO

Resumo	13
Abstract	15
1 – Introdução e Objetivos	17
1.1 - Introdução	17
1.2 - Objetivos	18
2 – Revisão da Literatura	19
2.1 - O gênero <i>Burkholderia</i>	19
2.2 - A Terra Preta Antropogênica (TPA)	22
2.3 - Biodegradação de Hidrocarbonetos	23
2.3.1 - Naftaleno	25
2.3.2 - Fenantreno	27
2.3.3 - Diesel	28
2.3.3.1 - Biodiesel	28
2.4 - Técnicas Moleculares – genes 16S rRNA e <i>recA</i>	29
3 – Material e Métodos	31
3.1 - Linhagens Bacterianas	31
3.2 - Meios de Cultura	32
3.3 - Extração do DNA dos Isolados	33
3.4 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	35
3.5 - Reação de Sequenciamento	36
3.6 - Análises das sequências	38
3.7 - Teste de Biodegradação de Hidrocarbonetos	38
4 – Resultados e Discussão	41
4.1 - Extração do DNA dos isolados	41
4.2 - Reação em Cadeia da Polimerase	43
4.3 - Análise Molecular dos isolados	46
4.3.1 - Gene 16S rRNA	46
4.3.2 - Gene <i>recA</i>	50
4.2 - Teste de Biodegradação de Hidrocarbonetos	53
5 – Conclusões	106
6 – Referências Bibliográficas	109

RESUMO

O gênero *Burkholderia* compreende um grupo de bactérias muito diversificado, ocupando vários nichos ecológicos e possui espécies que causam doenças, mas outras espécies apresentam habilidades importantes para os ramos da agricultura, biotecnologia e do ambiente, como a biodegradação. Essas bactérias são morfologicamente semelhantes e o gênero está dividido em dezessete *genomovars*, onde espécies semelhantes geneticamente são agrupadas, formando o Complexo *Burkholderia cepacia* (CBC). Por meio de estudos moleculares do gene 16S rRNA e do gene *recA* foi possível fazer a classificação adequada em espécies dos 450 isolados obtidos da Terra Preta Antropogênica (TPA) e adjacentes, em quatro sítios (TPA Caldeirão Cultivado; TPA Caldeirão Capoeira; TPA Hatahara e TPA Mina-I), foram obtidos 177 isolados do gênero *Burkholderia*. Desses isolados, pela análise do gene 16S rRNA foi possível classificar 157 isolados ao nível de espécie e pela análise do gene *recA* somente 105 isolados foram classificados neste mesmo nível. Esses isolados foram utilizados no teste de biodegradação dos hidrocarbonetos. Os hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) são compostos orgânicos resultantes da combustão incompleta da matéria orgânica e dos derivados de petróleo, são pouco solúveis em água e muito tóxicos para as células, por isso, não são metabolizados por muitos micro-organismos e acabam contaminando e inviabilizando os ambientes. Nos testes de biodegradação os substratos utilizados foram o naftaleno, o fenantreno e o diesel, juntamente com o indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), que sofre descoloração (de azul para incolor) quando as células utilizam os substratos como fonte de carbono para o crescimento celular, gerando elétrons que vão reduzir o indicador. Pela análise do teste, 19 isolados degradaram o naftaleno, 16 degradaram o fenantreno e 126 degradaram o diesel, gerando um total de 132 isolados do gênero *Burkholderia* que possuem a capacidade de degradar pelo menos um dos três substratos. Em destaque estão os isolados BCM 48 – ADJ Caldeirão-Cultivado (*B. pyrrocinia*), BCM 49 – ADJ Caldeirão-Cultivado (*B. unamae*), BCM 59 – ADJ Caldeirão-Cultivado (*B. glumae*), BCM 67 – ADJ Caldeirão-Capoeira (*B. cepacia*), BCM 244 – TPA Mina-I (*B. glumae*), BCM 254 – TPA Mina-I (*B. sartisoli*) e BCM 291 – TPA Mina-I (*B. gladioli*) que degradaram os três substratos (naftaleno, fenantreno e diesel) ao mesmo tempo. Destes 132 isolados, 61 isolados foram obtidos de sítios de Terra Preta

Antropogênica, visto que a TPA é um horizonte pouco perturbado por atividade agrícola, porém rico em matéria orgânica oriunda das atividades humanas do passado, como os dejetos e restos humanos, de animais e plantas, restos de cerâmica usados como utensílio e carvão pirogênico entre outros. As espécies de *Burkholderia* mais eficientes na biodegradação dos compostos foram: *B. cenocepacia*, *B. cepacia*, *B. lata*, *B. glumae*, *B. tropica*, *B. caribensis*, *B. arboris*, *B. pyrrocinia*, *B. seminalis*, *B. ambifaria*, *B. gladioli*, *B. ginsengisoli*, *Burkholderia* sp., *B. unamae*, *B. mimosarum*, *B. phenazinium*, *B. sartisoli*, *B. anthina*, *B. bryophila*, *B. heleia*, *B. multivorans*, *B. nodosa* e *B. phymatum*.

Palavras chaves: Biodegradação; Terra Preta Antropogênica; Hidrocarbonetos Poliaromáticos; 16S rRNA; *recA*; DCPIP.

ABSTRACT

The genus *Burkholderia* comprises a very diverse group of bacteria occupying various ecological niches and has species that cause disease, but other species have important skills to the branches of agriculture, biotechnology and the environment, as biodegradation. These bacteria are morphologically similar genus and is divided into seventeen *genomovars*, where genetically similar species are grouped together, forming the *Burkholderia cepacia* complex (BCC). Through molecular studies of 16S rRNA and *recA* gene was possible to make the appropriate classification of species in 450 isolates of Terra Preta Antropogênica (TPA) and adjacent at four sites (TPA Caldeirão Cultivado; TPA Caldeirão Capoeira; TPA Hatahara e TPA Mina-I) were obtained 177 isolates of the genus *Burkholderia*. These isolates by 16S rRNA gene analysis was possible to classify 157 isolates to species level and the *recA* gene analysis only 105 isolates were classified in the same level. These isolates were used to test the biodegradation of hydrocarbons. Polyaromatic hydrocarbons (PAHs) are organic compounds resulting from incomplete combustion of organic matter and petroleum derivatives, are not very soluble in water and very toxic to cells, therefore, are not metabolized by many microorganisms to contaminate and render environments. In biodegradation tests the substrates used were naphthalene, phenanthrene and the diesel, along with the redox indicator 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP), who suffers discoloration (blue to colorless) when cells use the substrates as a source of carbon for cell growth, generating electrons that will reduce the indicator. By analysis of the test, 19 isolates degraded naphthalene, phenanthrene degraded the 16 and 126 degraded diesel, generating a total of 132 isolates of the genus *Burkholderia* that have the ability to degrade at least one of the three substrates. Highlights are the isolated BCM 48 – ADJ Caldeirão-Cultivado (*B. pyrrocinia*), BCM 49 – ADJ Caldeirão-Cultivado (*B. unamae*), BCM 59 – ADJ Caldeirão-Cultivado (*B. glumae*), BCM 67 – ADJ Caldeirão-Capoeira (*B. cepacia*), BCM 244 – TPA Mina-I (*B. glumae*), BCM 254 – TPA Mina-I (*B. sartisoli*) e BCM 291 – TPA Mina-I (*B. gladioli*) which degraded all three substrates (naphthalene, phenanthrene and diesel) at the same time. Of these 132 isolates, 61 isolates were obtained from Terra Preta Antropogênica, since TPA is a horizon somewhat disturbed by agricultural activity, but rich in organic matter from human activities in the past, such as waste and human remains, animal and plants, the

remains of pottery used as a tool and coal pyrogenic among others. *Burkholderia* species more efficient in the biodegradation of the compounds were: *B. cenocepacia*, *B. cepacia*, *B. tin*, *B. glumae*, *B. tropica*, *B. caribensis*, *B. arborea*, *B. pyrrocinia*, *B. seminalis*, *B. ambifaria*, *B. gladioli*, *B. ginsengisoli*, *Burkholderia sp.*, *B. unamae*, *B. mimosarum*, *B. phenazinium*, *B. sartisoli*, *B. anthina*, *B. bryophila*, *B. heleia*, *B. multivorans*, *B. nodosa* and *B. phymatum*.

Key words: Biodegradation; Anthropogenic Dark Earth; Polyaromatic Hydrocarbons; 16S rRNA; *recA*; DCPIP.

1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 – Introdução

O gênero *Burkholderia* vem sendo muito estudado por ser um potencial biotecnológico ambiental e industrial, porém existem espécies que podem causar doença em seres humanos, animais ou vegetais. A espécie *Burkholderia cepacia* é um exemplo que pode ser encontrada tanto em amostras ambientais como em infecções de pacientes com fibrose cística. Muitas espécies têm aplicação direta na agricultura, como *B. vietnamiensis* e *B. silvatlantica* que nodulam leguminosas, fixando o nitrogênio atmosférico e favorecendo o crescimento vegetal. Essas bactérias estão sendo exploradas também no ramo da biodegradação, visto que algumas espécies são capazes de metabolizar certos compostos que estão poluindo os ambientes, transformando-os em formas menos tóxicas, ou simplesmente em CO₂ (gás carbônico) e água. A biodegradação, que é a remoção de poluentes por meio de seres vivos, geralmente bactérias, fungos, algas ou plantas, é uma forma mais econômica do que as convencionais e não danificam o equilíbrio natural do ambiente.

Os isolados de *Burkholderia* utilizados neste estudo são provenientes da Terra Preta Antropogênica (TPA), solo de estudo do grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Molecular e Celular - CENA/ USP, que visa compreender a diversidade microbiana que torna o solo de TPA tão fértil e sustentável

constantemente mesmo com grande rotação de culturas. A TPA possui coloração mais escura, a umidade se mantém mesmo no período de seca, visto que a argila, o carvão e os artefatos de cerâmica auxiliam nessa característica. Estudos estão sendo realizados para verificar a sustentabilidade da TPA e, assim, aplicar esses conhecimentos em outros tipos de solo onde o manejo é inadequado, o que diminuindo a produtividade. A partir de quatro sítios de TPA – Caldeirão-Cultivado, Caldeirão-Capoeira, Mina-I e Hatahara, as bactérias do gênero *Burkholderia* foram isoladas por meios de cultura específicos. Estudos anteriores com esses isolados foram realizados para verificar a diversidade em solos de TPA, por meio da técnica molecular de DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante) em comparação com solos adjacentes.

Visto que a TPA contém muita matéria orgânica em decomposição, carvão, entre outras características e mesmo não sendo um solo muito perturbado por poluentes, este estudo visa obter espécies do gênero *Burkholderia* capaz de degradar hidrocarbonetos, que são os poluentes mais persistentes no ambiente, como o naftaleno, fenantreno e o diesel.

1.2 – Objetivos

Este trabalho tem como objetivos:

- ✓ Identificar e classificar os isolados da coleção de bactérias do gênero *Burkholderia* utilizando *primers* específicos para o gene 16S rRNA e para o gene *recA*, mediante análises moleculares.
- ✓ Avaliar o potencial desses isolados na biodegradação de hidrocarbonetos, utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) e os substratos naftaleno, fenantreno e o diesel em bioensaios para uso futuro na biorremediação de áreas contaminadas com esses poluentes.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – O gênero *Burkholderia*

Em 1950, o pesquisador William Burkholder estudando a podridão mole da cebola descobriu o micro-organismo causador desta doença, classificando-o como linhagem padrão *Pseudomonas cepacia* (PALLERONI & HOLMES, 1981). Em 1992, o gênero *Burkholderia* foi sugerido por Yabuuchi et al. baseado na sequência do gene 16S rRNA, homóloga a sequência do grupo II do gênero *Pseudomonas* (YABUUCHI et al., 1992), sendo que sete espécies desse gênero foram transferidas para o novo gênero *Burkholderia*, que pertence a subdivisão β do filo *Proteobacteria*, e assim, a espécie padrão passou a ser classificada como *Burkholderia cepacia*. Vandamme et al. (1997) estudando diversos isolados de *B. cepacia*, demonstraram que estes eram subdivididos em cinco grupos genéticos distintos, designados *genomovars*. A partir daí foi criado o termo Complexo *Burkholderia cepacia* – CBC, que compartilha espécies fenotipicamente e geneticamente semelhantes e atualmente está dividido em 10 *genomovars* que recebem o nome da espécie padrão: I – *B. cepacia*; II – *B. multivorans*; III – *B. cenocepacia*; IV – *B. stabilis*; V – *B. vietnamiensis*; VI – *B. dolosa*; VII – *B. ambifaria*; VIII – *B. anthina*; IX – *B. pyrrocinia* e X – *B. ubonensis* (VANDAMME et al. 1997; 2000; 2002; 2003; GILLIS et al. 1995; VERMIS et al., 2002; 2004; COENYE et al., 2001). A partir da análise do

gene *recA*, que é muito utilizado para a identificação de isolados do gênero *Burkholderia*, pois abrange a sequência variada do gene, outros 7 *genomovars* foram identificados (PAYNE et al., 2005): Grupo K; CBC 1; CBC 2; CBC 3; CBC 4; CBC 5 e CBC 6.

Por possuírem metabolismo muito versátil, as espécies do CBC apresentam variedade fenotípica dependendo da fonte de carbono utilizada no meio de cultura, adquirindo diversas formas e coloração, com isso, a identificação por meio de métodos fenotípicos torna-se difícil e a análise genética de genes conservados ganha maior importância. A análise do gene 16S rRNA é muito utilizado em sistemática de bactérias, porém, quando analisado parcialmente torna-se limitado para a identificação das espécies do CBC, uma vez que os isolados são muito parecidos geneticamente e a sequência nucleotídica desse gene não é suficiente para diferenciar os isolados. Para que a identificação seja válida é imprescindível a análise do gene *recA*, que possui sequência polimórfica entre os isolados, codificando a proteína (recombinase A) essencial para reparar e recombinar o DNA bacteriano (PAYNE et al., 2005; MAHENTHIRALINGAM et al., 2008).

Algumas espécies do CBC são patogênicas oportunistas em seres humanos, causando infecções pulmonares em pacientes com fibrose cística, como as espécies *Burkholderia gladioli*, *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. dolosa*, *B. multivorans*, *B. ambifaria*, *B. anthina*, *B. pyrrocinia*, *B. stabilis* e *B. vietnamiensis*. A fibrose cística é uma doença genética recessiva que afeta a proteína CFTR (Fibrose Cística Reguladora de Condutância Transmembrana) regulando o transporte dos íons cloro, sódio e água pelas membranas celulares. Assim, o paciente com fibrose cística produz maior quantidade de muco nos pulmões, além de ser mais viscoso, o que prejudica o fluxo dos gases respiratórios e, quando infectado pela bactéria do CBC, esses sintomas se agravam e a transmissão ocorre por meio do contato social (GREEN et al., 2010). Uma característica que torna essas bactérias tão presentes em infecções hospitalares é sua surpreendente habilidade de sobreviver em condições limites, como em soluções com antibióticos, em produtos artificiais farmacêuticos, soluções salinas ou com o mínimo de nutrientes, graças à versatilidade desse grupo de bactérias Gram-negativas. Outra doença que afeta o homem é a Melioidose, causada por espécies como *Burkholderia mallei* e *Burkholderia pseudomallei*, podendo ser uma infecção assintomática ou evoluir para pneumonia, bem como provocar tumores em órgãos. Visto isso, essas espécies

podem ser consideradas como agentes potenciais de bioterrorismo (LEE et al., 2010).

O solo e a rizosfera abrigam diversas espécies do gênero *Burkholderia* que podem estar associadas com plantas, geralmente gramíneas e leguminosas, como por exemplo, *B. vietnamiensis* associada ao arroz; *B. ambifaria* encontrada em raízes de ervilha; *B. cepacia* e *B. cenocepacia* em trigo; *B. sacchari* associada à cana-de-açúcar; *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. dolosa* e *B. pyrrocinia* em milho. Essas bactérias acabam promovendo o crescimento vegetal, interagem com fungos produzindo vitaminas ou protegendo as mudas do ataque de fungos, bactérias e nematóides fitopatogênicos, fixam o nitrogênio atmosférico, como é o caso das espécies *B. vietnamiensis*, *B. unamae* e *B. tropica*, nodulam leguminosas, como *B. mimosarum*, *B. nodosa*, e *B. phymatum*, servem como biopesticidas no controle biológico de doenças de plantas, solubilizam o fosfato, podendo ser utilizadas como biofertilizantes. Estudos recentes mostram que as mesmas espécies que são encontradas no meio ambiente também são encontradas em infecções humanas e que possuem identidade genética, sendo indistinguíveis (COENYE et al., 2001; VANDAMME et al. 2003; RAMETTE et al., 2005; DALMASTRI et al., 2007; ELLIOTT et al., 2007; COMPANT et al., 2008). Por isso, qualquer aplicação na agricultura e/ ou na biotecnologia utilizando espécies de *Burkholderia* é necessário realizar uma avaliação rigorosa dos potenciais riscos aos seres vivos.

O gênero possui uma versatilidade metabólica incrível e isso se deve ao grande genoma que varia de 6 a 9 Mb (megabases) de tamanho, o que gera maior flexibilidade na expressão dos genes, desse modo as bactérias podem crescer em mais de 200 tipos de substratos diferentes. Muitas espécies possuem potencial biotecnológico, e uma aplicação é na biorremediação, processo que, por meio de agentes microbiológicos, trata locais contaminados por poluentes químicos e os decompõem do ambiente. Um exemplo é a espécie *B. vietnamiensis* que é um excelente degradador de tricloroetileno testado em aquíferos contaminados e a espécie *B. xenovorans* que degrada os bifenilos policlorados (BPC) (DUA et al., 2002). Algumas espécies desse gênero secretam enzimas extracelulares, como toxinas, antibióticos e sideróforos (composto orgânico que auxilia na captação de ferro) (VIAL et al., 2007; O'SULLIVAN & MAHENTHIRALINGAM, 2005; O'SULLIVAN et al., 2007). O impasse é que ao mesmo tempo em que uma espécie pode ser utilizada como potencial biotecnológico no ambiente, a mesma pode causar

infecções. Uma solução para esse problema é atenuar a virulência dessas linhagens por meio da engenharia genética.

2.2 – A Terra Preta Antropogênica (TPA)

Os solos amazônicos não possuem grande riqueza em nutrientes e muitos são empregados na agricultura. A camada mais superficial do solo é que apresenta muita matéria orgânica, conhecida como serapilheira, oriunda da própria floresta: como galhos, frutos, folhas, animais mortos, que vão sofrer a ação de bactérias, fungos e algas na reciclagem desses nutrientes, em conjunto com os fatores ambientais que são de extrema importância para esse processo, como a alta umidade e a temperatura. No entanto, há um tipo de solo que é considerado um dos mais férteis do mundo, é a chamada Terra Preta Antropogênica (TPA), que cobre pequena parcela entre 0,1 e 0,3% da área Amazônica (SOMBROEK et al., 2003). A denominação Terra Preta Antropogênica está relacionada à sua coloração bem escura e aos locais onde esse solo é encontrado, que geralmente são sítios arqueológicos, que serviu de moradia para grupos indígenas pré-históricos. Esses grupos modificaram as características do solo original adicionando resíduos domésticos e com as atividades agrícolas, onde a floresta era derrubada e queimada, gerando um acúmulo de carbono orgânico no solo. Na TPA são encontrados materiais arqueológicos como artefatos líticos e muitos fragmentos de cerâmica e carvão, também estão presentes conchas e resíduos de organismos aquáticos, o que gera uma divergência na teoria da origem da TPA. A primeira hipótese, e mais aceita atualmente, é a origem baseada em antigos assentamentos indígenas e a segunda, é a origem causada por eventos geológicos, cinzas e rochas vulcânicas ou sedimentos de lagos extintos (KÄMPF et al., 2007).

A TPA é extremamente fértil e sustentável quando comparada com solos adjacentes, possui altas taxas de cálcio, fósforo, potássio, magnésio, zinco, manganês e carbono orgânico provenientes dos depósitos de restos orgânicos, vegetal e animal, pH entre 5 e 7, altos teores de argila e carvão, o que aumenta a retenção da umidade e faz com que esse solo fique úmido durante os períodos de seca, possibilitando o cultivo de uma maior diversidade de culturas e sendo fonte da alta diversidade microbiana (TSAI et al., 2003; LEHMANN et al., 2002). Com a alta

diversidade, a TPA é fonte de micro-organismos não identificados que podem ter seu potencial biotecnológico explorado, possibilitando economia em vários setores como agricultura, fertilizantes, pesticidas, bem como na recuperação de ambientes contaminados. Estudar a Terra Preta é fundamental para a compreensão de como esse tipo de solo se mantém fértil e com todas as características exclusivas para a sustentabilidade das culturas, podendo ser aplicada em outros solos pobres em nutrientes.

2.3 – Biodegradação de Hidrocarbonetos

A biodegradação é um processo utilizado para tratar locais contaminados mediante agentes vivos, geralmente microbiológicos ou plantas, que decompõem totalmente os poluentes químicos do ambiente ou os transformam em formas menos tóxicas, sendo uma atividade mais econômica do que outras formas de remediação do meio, e não afeta o equilíbrio ecológico. Os micro-organismos são os mais utilizados na biodegradação, como bactérias, fungos e algas, visto que possuem diversidade metabólica, reciclando as moléculas dos ecossistemas, onde o produto gerado por um micro-organismo pode servir de substrato para outros (DUA et al., 2002).

As moléculas orgânicas chamadas recalcitrantes são de difícil degradação e podem ser naturais ou sintéticas, oriundas dos processos industriais, também recebem a denominação de xenobióticas, por serem estranhas ao ambiente natural, como corantes, agrotóxicos e plásticos. Algumas dessas moléculas são muito tóxicas aos seres vivos, podem causar mutações no código genético, eliminando indivíduos ou selecionando os mais adaptados, interferindo diretamente no equilíbrio natural do ambiente. Para todas as moléculas sintéticas disponibilizadas no ambiente, não existem rotas enzimáticas que façam sua degradação. Assim, a busca por organismos não identificados e não cultivados é tão importante para ampliar a aplicação na biotecnologia, bem como entender como esses micro-organismos são capazes de utilizar os compostos por meio da ação de suas enzimas (GAYLARDE et al., 2005).

Os hidrocarbonetos são compostos abundantes no petróleo e seus derivados, sendo utilizados como indicadores de poluição em determinado meio ambiente,

como água, solo e ar. São classificados, pela diferença molecular, em quatro classes: aromáticos, alcanos, alcenos e cicloalcanos. Os hidrocarbonetos aromáticos são os mais tóxicos, de biodegradação mais lenta, pois apresentam os anéis aromáticos. Os hidrocarbonetos poliaromáticos (conhecidos como HPAs) apresentam dois ou mais anéis aromáticos e são persistentes no ambiente, sendo classificados como POP (Poluentes Orgânicos Persistentes). Os HPAs podem ser incorporados à cadeia alimentar, sendo transferidos pelos diversos níveis tróficos, podem causar riscos à saúde humana e precisam ser monitorados no ambiente, pois são carcinogênicos, tóxicos e mutagênicos (BANFORTH & SINGLETON, 2005). Os alcanos são conhecidos como parafinas e possuem cadeia carbônica simples e ramificada, sendo a maior fração do petróleo e de biodegradação fácil. Os alcenos são os hidrocarbonetos de cadeia aberta com ligação dupla entre os carbonos, sendo abundantes nos derivados do petróleo. Os cicloalcanos possuem cadeia fechada e saturada, sendo a segunda maior fração do petróleo, são tóxicos e resistentes à biodegradação (SOUZA, 2009; ALVES, 2007).

As fontes geradoras de HPAs são petrogênica, ou seja, proveniente do petróleo e seus derivados, como por exemplo, o naftaleno, o fenantreno (Figura 1) e o diesel; pirogênica, obtidos a partir da combustão incompleta da matéria orgânica, dentre os quais se destacam o benzeno, tolueno e xilenos; ou biogênica, formados naturalmente em reações geológicas térmicas, como atividade vulcânica ligada aos combustíveis fósseis e minerais ou na queima de florestas (POTIN et al., 2004; SEO et al., 2009; JONHSEN & KARLSON, 2004). Algumas atividades humanas aumentam a disponibilidade dos HPAs no ambiente, como o tabagismo, o descarte de produtos industriais em efluentes e os acidentes com derramamento de petróleo em mares, como aconteceu na Plataforma *British Petroleum*, no Golfo do México em Abril de 2010, onde o prejuízo calculado chegou a US\$ 4 bilhões.

A *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA) classifica os HPAs a seguir, como os principais poluentes ambientais: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[k]fluoranteno, benzo[b]fluoranteno, benzo[a]pireno, benzo[g,h,i]perileno, indeno[1,2,3-dc]pireno e dibenz[a,h]antraceno. Dessa forma, surge o interesse em entender o caminho e as formas de transformação dos HPAs no meio ambiente. O gênero *Burkholderia* é descrito em vários estudos como capaz de degradar os HPAs naftaleno, fluoreno, fenantreno, fluoranteno e pireno. As vias metabólicas de

clivagem dos HPAs mais estudadas são as aeróbicas, realizadas por bactérias e fungos onde ocorre a oxigenação dos anéis aromáticos por meio de complexos enzimáticos conhecidos como oxigenases. Várias oxidações permitem a abertura dos anéis e a formação do piruvato, que é utilizado como fonte de carbono e energia pelas células (JACQUES et al., 2007b; MISHRA et al., 2001).

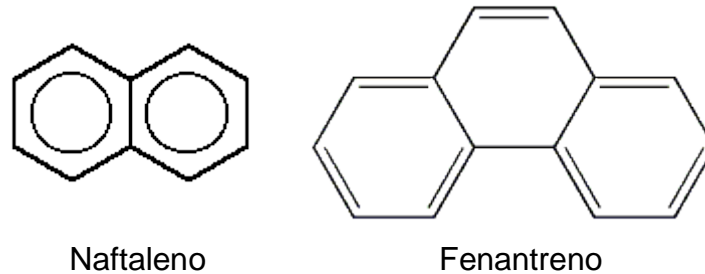


Figura 1. Exemplos de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs).

2.3.1 – Naftaleno

O naftaleno ($C_{10}H_8$) é um composto utilizado em estudos de degradação de HPAs por bactérias, por ser pouco solúvel em água e apresentar estrutura simples o que aumenta o risco de contaminação dos ambientes (GOYAL & ZYLSTRA, 1997). Alguns gêneros já foram estudados e verificados como capazes de utilizar o naftaleno como fonte de carbono para o desenvolvimento das células bacterianas, como por exemplo, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, e *Streptomyces*, sendo que essas bactérias apresentam um sistema de enzimas, que rompem as ligações dos anéis aromáticos. O naftaleno é, então, convertido em salicilato, este em catecol e subsequente em piruvato e acetaldeído (Figura 2).

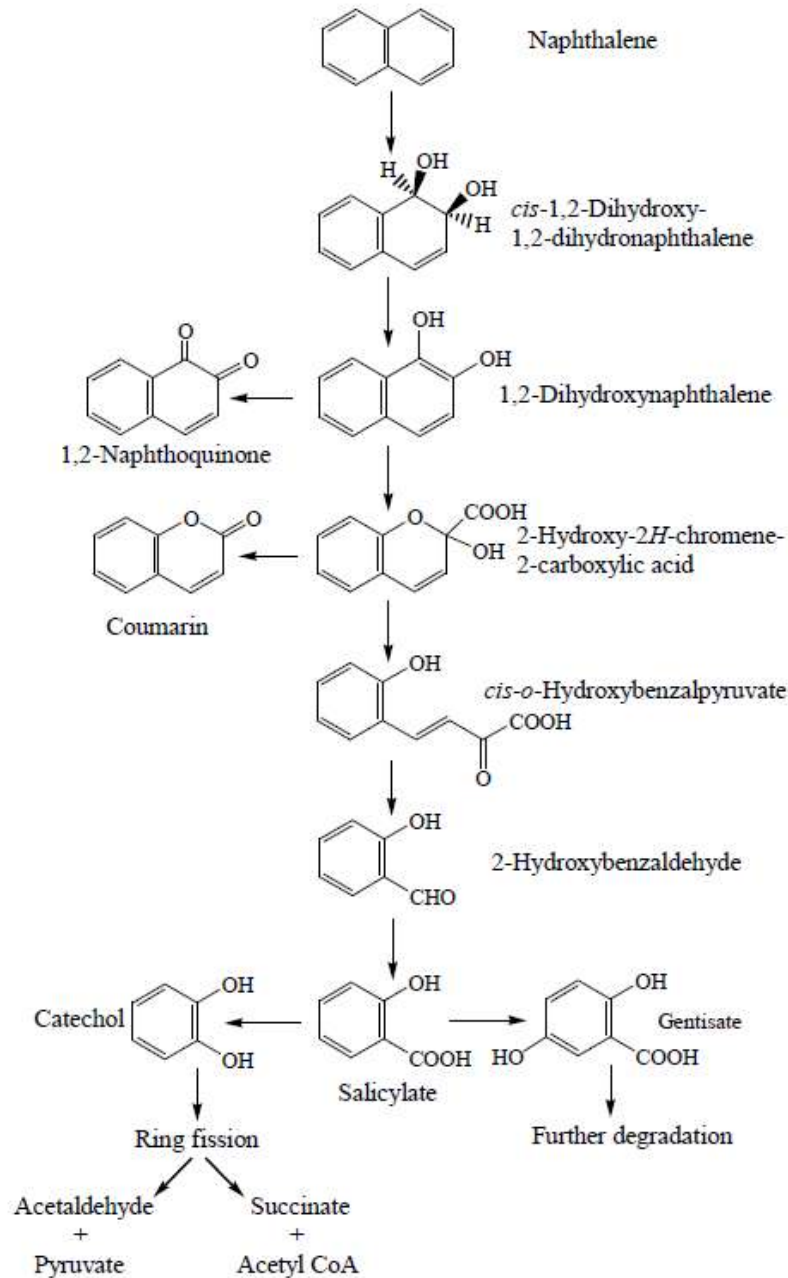


Figura 2. Vias catabólicas do naftaleno realizado por bactérias (SEO et al., 2009).

No estado de São Paulo há uma legislação que trata da contaminação de solos e água por HPAs. Assim, para o naftaleno, em concentrações iguais ou menores que 0,2 mg/ Kg de solo, significa que o solo ainda pode ser utilizado. Os valores de intervenção indicam que há riscos para a saúde humana caso as concentrações dos compostos estejam acima desse valor. Para o naftaleno é de 0,2 mg em 25 m³ de solo e 100 m³ para a água (JACQUES et al. 2007a).

2.3.2 – Fenantreno

O fenantreno ($C_{14}H_{10}$) apresenta três anéis aromáticos e é utilizado na produção de corantes e explosivos. Vários gêneros de bactérias apresentam a estrutura genética capaz de expressar enzimas capazes de degradar esse composto, tais como *Acidovorax*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* e *Sphingomonas*. O composto contamina solos, sedimentos e água e é utilizado em estudos visando compreender as vias catabólicas de degradação, por ser um HPA carcinogênico ao seres vivos. A Figura 3 mostra as etapas da degradação do fenantreno.

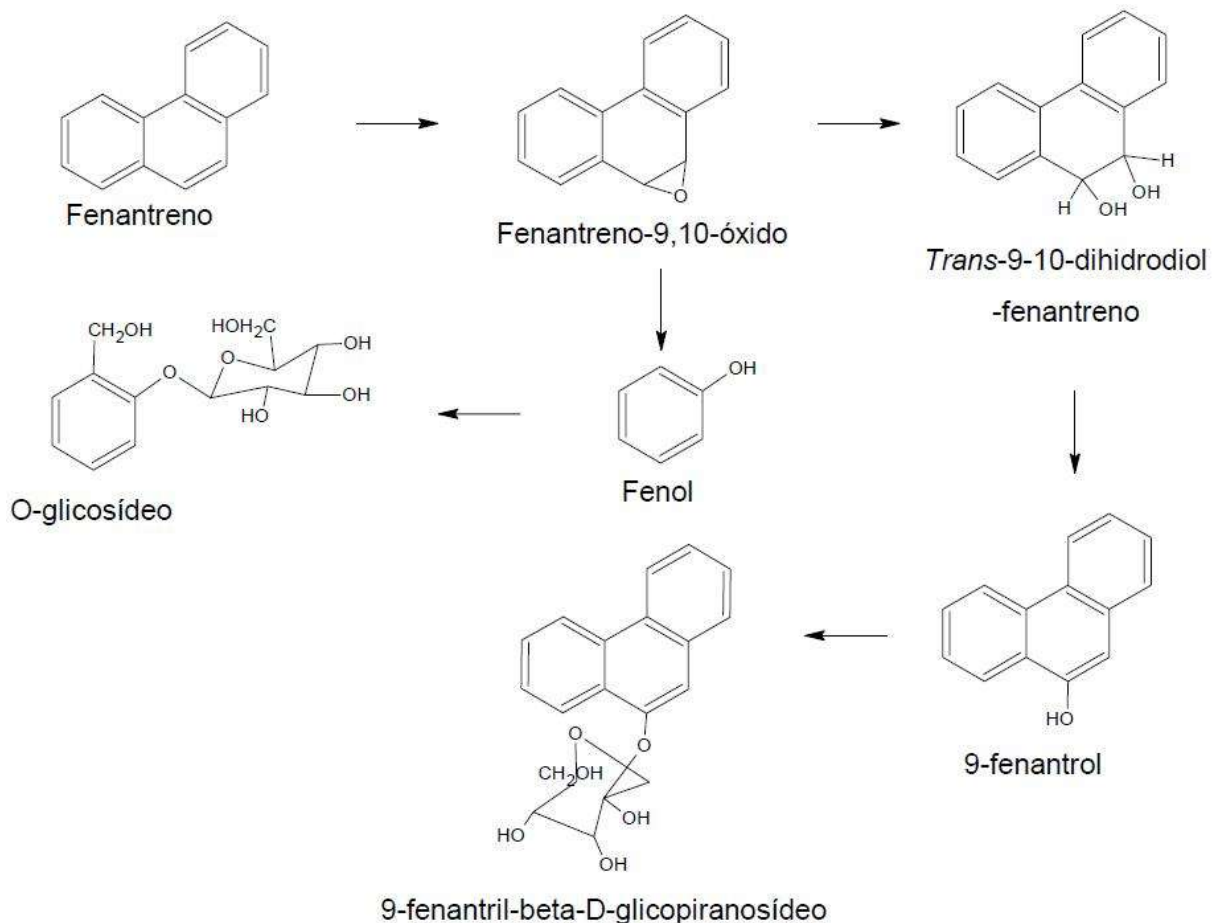


Figura 3. Degradação do fenantreno (JACQUES, 2005).

2.3.3 – Diesel

O diesel é uma mistura complexa de hidrocarbonetos formada de 40% de alcanos, 39% de cicloalcanos, 20% de HPAs e o restante é enxofre, oxigênio e nitrogênio, contém cadeias carbônicas de 5 a 40 carbonos por moléculas e é proveniente da destilação do petróleo (VIEIRA et al., 2007). É considerado medianamente tóxico, inflamável, volátil e de coloração variando do amarelo ao ambar. No Brasil, dois tipos de diesel são comercializados como combustível: o diesel D (também chamado de urbano ou metropolitano) e o diesel B (comum), que se diferenciam pelo teor de enxofre, o urbano contém somente 0,5% de enxofre, reduzindo os impactos ambientais.

2.3.3.1 – Biodiesel

O biodiesel é um combustível proveniente da biomassa renovável, como os óleos vegetais e a gordura animal, que possa substituir os combustíveis de origem fóssil e mais poluentes. É produzido por meio de reações químicas de transesterificação (Figura 4) onde os triglicerídeos são transformados em ésteres de ácidos graxos. O biodiesel pode ser utilizado puro, recebendo a denominação B100 ou misturado ao diesel, que no Brasil, em 2005, entrou em vigor a Lei 11.097 que dispõe a adição de um percentual de 5% ao diesel até 2012. Para a mistura, a nomenclatura recebe o número que corresponde à quantidade de biodiesel que foi adicionado ao diesel, por exemplo, uma mistura com 25% de biodiesel é chamada B25. Hoje, o biodiesel comercializado é o B5 (Biodieselbr, 2011). O uso do biodiesel leva à vantagens ecológicas, como a diminuição dos poluentes no ar e é mais facilmente degradado por micro-organismos, pois não apresenta o anel aromático em sua estrutura.

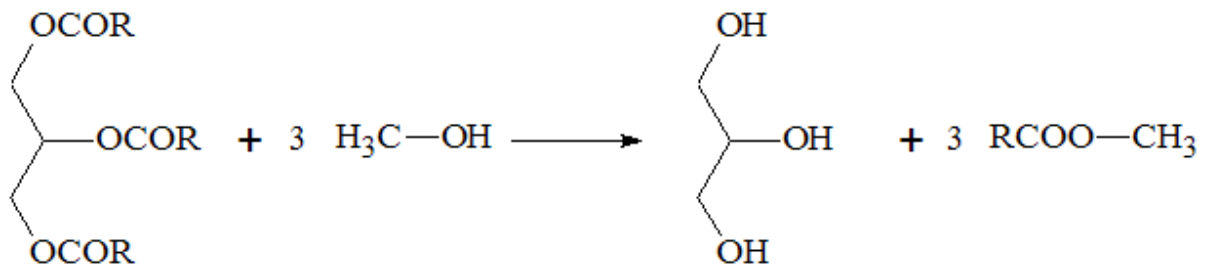


Figura 4. Processo de formação do biodiesel.

2.4 – Técnicas Moleculares – genes 16S rRNA e *recA*

A Biologia Molecular teve seu grande marco em 1953, com Watson e Crick que propuseram o modelo da dupla-hélice do DNA, a partir daí, várias técnicas foram desenvolvidas baseadas na leitura do código genético. Em 1975, Nathans e Smith purificaram enzimas de restrição que são ferramentas para a manipulação, isolamento e amplificação de DNA *in vitro*, assim, foi possível fazer a clonagem desses fragmentos de DNA, juntamente com a técnica descrita por Berg, em 1972, do DNA recombinante. Ainda em 1975, a técnica *Southern blotting* foi desenvolvida para a localização de genes. Em 1977, a técnica de sequenciamento de DNA permitiu a identificação das sequências específicas de genes de interesse. O próximo passo na biologia molecular foi em 1987, quando Kary Mullis realizou a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) a qual utiliza a enzima DNA polimerase, um par de oligonucleotídeos iniciadores e nucleotídeos para a construção de novas cópias do gene de interesse. A partir dessa técnica houve o desenvolvimento de variações como a PCR-transcriptase reversa (RT-PCR), PCR em tempo-real (qPCR) entre outras (REIS et al., 2002).

Diversas técnicas moleculares estão disponíveis para estudos ecológicos, muitos utilizando a amplificação da região do DNA que codifica a subunidade ribossomal 16S por meio da técnica de PCR, que detecta os micro-organismos presentes em amostras ambientais sem a necessidade do isolamento. A tentativa de isolar micro-organismos, até o momento não-cultivados, muitas vezes não é bem sucedida, visto que para alguns gêneros, o estudo nutricional não é totalmente elucidado. O estudo da diversidade microbiana em solo, por exemplo, por meio da análise do 16S rRNA em bactérias nos fornece conhecimento sobre as relações

filogenéticas existentes entre os micro-organismos, bem como a função desse grupo no meio ambiente, melhorando o manejo de áreas agrícolas e sustentáveis (MACRAE, 2000).

A proteína RecAp bacteriana proveniente da expressão do gene *recA* está relacionada à reparação do DNA durante o processo de recombinação (HOLMES et al., 2004; MILLER & KOKJOHN, 1990). Dentro do complexo *Burkholderia cepacia* (CBC) a análise do gene 16S rRNA se torna limitante, uma vez que os isolados são geneticamente semelhantes, assim, a análise filogenética por meio do gene *recA* se torna eficiente para distinguir as espécies por meio da sequência nucleotídica polimórfica.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Linhagens Bacterianas

De um acervo de 542 isolados presentes na Coleção do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), provenientes do isolamento de amostras ambientais do solo amazônico de Terra Preta Antropogênica e adjacências, obtidos de projetos desenvolvidos anteriormente por estudantes desta instituição, foram utilizados neste estudo. Linhagens adicionais de referência foram obtidas do The DSMZ (*German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*), sendo elas: DSMZ 291 - *Pseudomonas putida*, DSMZ 6506 - *Pseudomonas fluorescens*, DSMZ 6899 - *Pseudomonas putida*, DSMZ 8369 - *Pseudomonas fluorescens* e DSMZ 11319 - *Burkholderia vietnamiensis*.

Esses isolados estavam armazenados em glicerol 50%, em freezer -80°C e 50 µL de cada cultura foram transferidos para tubos de 50 mL contendo meio Nutriente (Item 3.2), sendo submetidos a agitação orbital de 170 rpm, a uma temperatura de 30°C por 24-48 horas. Após o crescimento, uma alíquota foi inoculada mediante uma estria em placa de Petri, contendo o mesmo meio de cultivo, certificando-se da pureza da cultura. As culturas contaminadas foram purificadas. A partir da análise morfológica da cor, foram obtidos 3 padrões de coloração, os isolados de coloração amarelo (A) e creme (B) (Figura 5) foram excluídos, visto que foram classificados pela análise do gene 16S rRNA como,

respectivamente, *Sphingomonas* sp. e *Microbacterium binotii*, e as culturas trabalhadas tem coloração branca-leitosa.

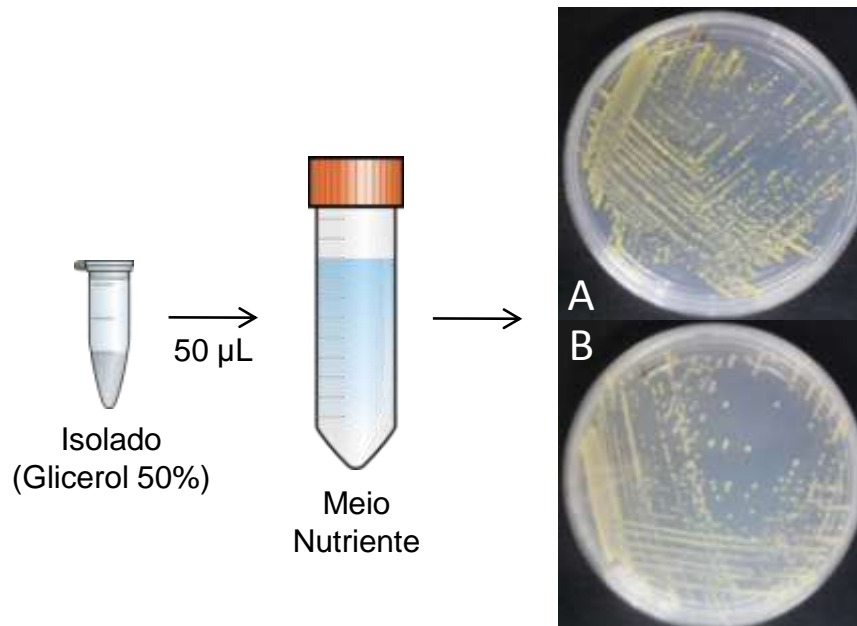


Figura 5. Procedimento para o crescimento dos isolados.

3.2 – Meios de Cultura

As bactérias foram rotineiramente mantidas em meio Nutriente, caldo e/ ou agar, por ser um meio utilizado para a conservação e manutenção de culturas, além de ser simples e econômico. O meio Nutriente é composto por (g.L^{-1}): extrato de carne: 3,0; peptona: 5,0; agar (no caso de meio sólido): 20 g, $\text{pH} = 6,8 (\pm 0,2)$. A temperatura ótima para o crescimento das bactérias foi a 30°C , por 24-48 horas, e quando utilizadas em meio líquido, com agitação orbital de 170 rpm. Para o teste de biodegradação o meio utilizado foi o Bushnell-Hass (BH), composto por (g.L^{-1}): MgSO_4 : 0,2; CaCl_2 : 0,02; KH_2PO_4 : 1,0; K_2HPO_4 : 1,0; NH_4NO_3 : 1,0; FeCl_3 : 0,05 (DIFCO MANUAL, 1984).

3.3 – Extração do DNA dos Isolados

A preparação do DNA dos 450 isolados foi realizada de acordo com Stirling (2003), com modificações, onde 50 µL da cultura-estoque (glicerol 50%) de cada isolado foram transferidos para tubos de 50 mL contendo 10 mL de meio nutriente líquido e, foram submetidos à agitação orbital (170 rpm) por 24-48 horas a 30°C. Da suspensão celular, 1,5 mL foram transferidos para microtubos de 1,7 mL e submetidos à centrifugação por 4 minutos, a 14000 rpm, sendo que essa operação se repetiu, em algumas amostras, pois a quantidade de precipitado não era suficiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e para romper as células, acrescentou-se 400 µL do Tampão A (Composição – suficiente para 50 amostras: 400 µL de Triton X-100; 2 mL de SDS 10%; 400 µL de 5 M NaCl; 200 µL de 1 M Tris-HCl pH = 8,0; 40 µL de 0,5 M EDTA pH=8,0 e 16,960 mL de água ultra-pura esterilizada), 200 mg de pérolas de vidro 0,1 mm, 100 µL de fenol e 100 µL de CIA (24 álcool isoamílico: 1 clorofórmio), sobre agitação horizontal por 3 minutos. Foram adicionados 400 µL de tampão TE (Para um volume final de 50 mL: 500 µL de 1 M Tris-HCl pH=8,0, 100 µL de 0,5 M EDTA pH=8,0 e água ultra-pura) e homogeneizado, por inversão, 20 vezes. O material foi centrifugado por 5 minutos, a 14000 rpm e o sobrenadante foi transferido para novo microtubo, sendo adicionado 1 mL de etanol absoluto, homogeneizado e centrifugado por mais 5 minutos, a 14000 rpm. Nesta etapa, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 400 µL de tampão TE e 10 µL de 4 M de acetato de amônio, homogeneizado 20 vezes e adicionado 1 mL de etanol absoluto, centrifugado por 5 minutos, à 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado por completo e o precipitado foi submetido à secagem em concentrador de DNA, por 10 minutos a 30°C. Após a secagem, foi adicionado ao precipitado 40 µL de Tris-RNase (Para um volume final de 10 mL: 100 µL de RNase (10 mg/ mL), 100 µL de 1 M Tris-HCl pH=8,0 e água ultra-pura) e incubado a 37°C durante 30 minutos em banho-maria. A Figura 6 esquematiza esse protocolo de extração de DNA bacteriano.

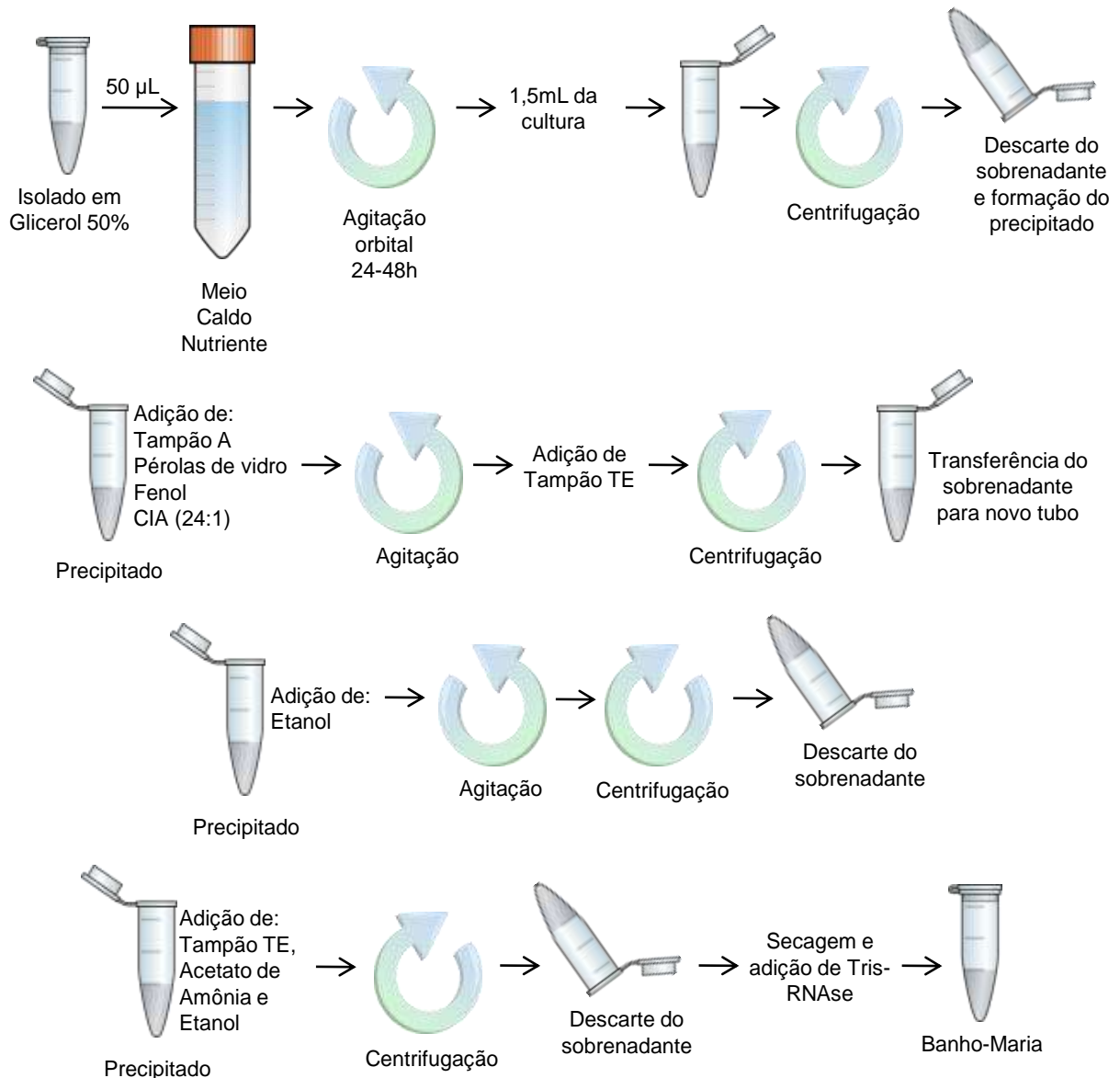


Figura 6. Esquema do protocolo de extração de DNA dos isolados de *Burkholderia* obtidos da Terra Preta Antropogênica da Amazônia e adjacentes.

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro (NanoDrop 1000, USA) utilizando-se 2 µL de cada solução. E após a quantificação, cada solução foi padronizada com água ultra-pura (Milli-Q) para 20 ng de DNA em 200 µL de volume final. A nova solução de DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed™ em tampão TSB (BRODY & KERN, 2004). Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi utilizado o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen). Para as amostras que houve falha na diluição, foi realizada nova quantificação em espectrofotômetro e nova diluição do DNA concentrado.

3.4 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação do gene 16S rRNA dos isolados foi realizada pela técnica de PCR, segundo Weisburg et al. (1991). As reações foram preparadas em placas de 96 poços, para um volume final de 25 μL , contendo 1 μL de DNA (20 ng), 2,5 μL de tampão para PCR 10X, 0,75 μL de 50 mM MgCl_2 , 0,25 μL de 10 mM dNTPs, 1 μL de cada *primer* fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') a 5 pmols, 0,2 μL de 5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 18,3 μL água Milli-Q autoclavada. A amplificação foi realizada em termociclador com a programação de: 94°C por 4 minutos, 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, seguido de extensão final a 72°C por 10 minutos. A Figura 7 esquematiza este protocolo da PCR e os procedimentos de purificação do produto da PCR.

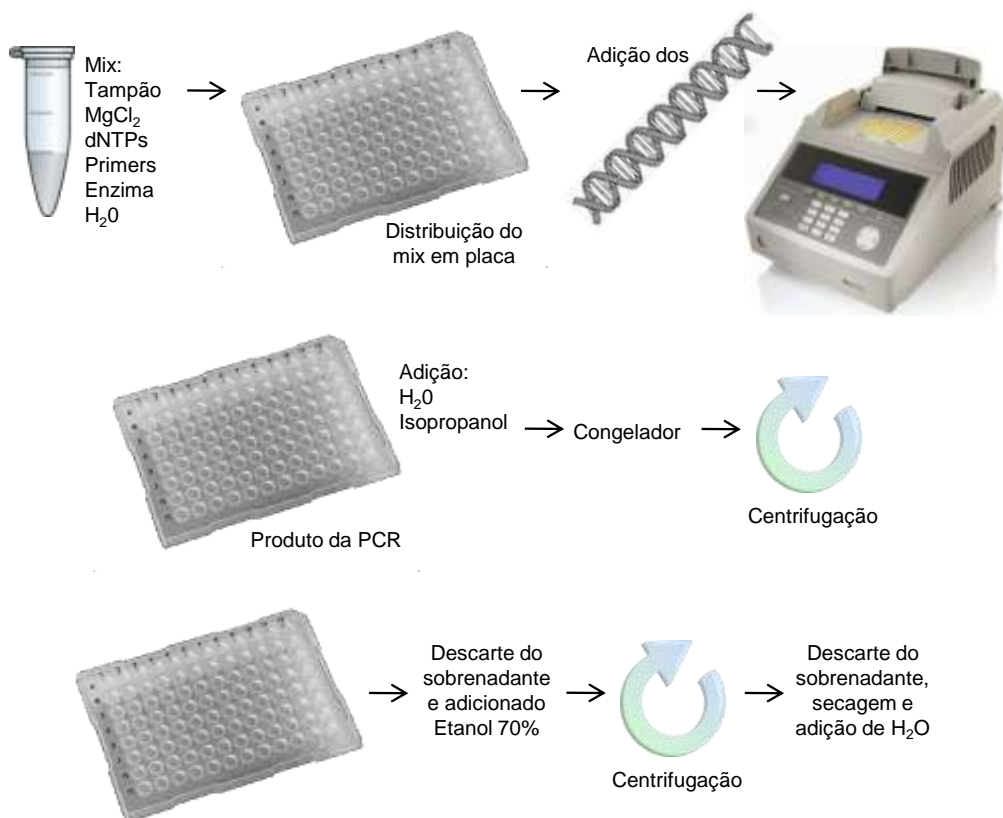


Figura 7. Esquema simplificado do protocolo de PCR e purificação dos produtos obtidos.

A análise do produto amplificado foi em gel de agarose a 1% com marcador molecular *Low DNA Mass ladder* (Invitrogen) submetido à corrida eletroforética a 90 V por 30 minutos e, logo em seguida foi fotodocumentado. As amostras amplificadas foram purificadas, acrescentando 20 µL de água Milli-Q (autoclavada) e 60 µL de isopropanol 100%, homogeneizadas e incubadas por 2 horas à -20°C. Após esse tempo, a solução foi centrifugada por 90 minutos a 4000 rpm, temperatura ambiente. O sobrenadante foi totalmente descartado por inversão da placa e foram adicionados 200 µL de etanol 70% ao precipitado, homogeneizado e centrifugado novamente por 90 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em termociclador por 10 minutos, 40°C. Após a secagem, foram adicionados ao precipitado 20 µL de água Milli-Q esterilizada. Após homogeneização, 3 µL foram analisados novamente em gel de agarose 1%, conforme descrito acima. O produto de PCR foi estocado em *freezer* -20°C.

Pela análise do gene 16S rRNA, foi possível identificar 177 isolados de *Burkholderia*. Estes foram submetidos a PCR de amplificação do gene *recA* que foi realizada de acordo com Mahenthalingam et al. (2000) modificando a quantidade de *primer* e do cloreto de magnésio. Para uma reação de volume final de 25 µL, foram adicionados 2,5 µL de *buffer* PCR 10X, 1,0 µL de 50 mM MgCl₂, 0,25 µL de 10 mM dNTPs, 1,0 µL de cada *primer* BCR 3 (5'-GTCGCAGGCGCTGCGCAA- 3') e BCR 4 (5'-GCGCAGCGCCTGCGACAT-3') (5pmols), 0,2 µL *Platinum® Taq* DNA Polimerase (5 U/ µL) (Invitrogen), 14,55 µL de água Milli-Q (autoclavada) e 40-50 ng de DNA de cada amostra por reação. A amplificação foi realizada para 25 ciclos de 30 segundos à 94°C, 45 segundos à 58°C e 1 minuto à 72°C, com extensão final de 10 minutos à 72°C. Após a amplificação, o produto de PCR foi purificado com isopropanol e etanol, como descrito acima, e foi quantificado em gel de agarose 1%, utilizando o marcador molecular *Low DNA Mass ladder* (Invitrogen).

3.5 – Reação de Sequenciamento

Após a precipitação dos produtos de PCR do gene 16S rRNA foi preparada a reação de sequenciamento parcial desse gene, utilizando o *kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing* (Amersham, Biosciences GE), em placa de 96 poços, onde cada reação continha 2 µL de tampão *Save Money* 2,5X (2 mL de 1 M Tris-HCl

pH=9,0; 50 μL de 1 M MgCl_2 e 7,95 mL de água ultra-pura autoclavada), 1 μL de *primer* fD1 (5pmols), 2 μL de *DYEnamic*, 1 μL de DNA por amostra (aproximadamente 75 - 90 ng) e 4 μL de água ultra-pura autoclavada. A amplificação ocorreu em 25 ciclos de 20 segundos à 95°C, 15 segundos à 55°C e 60 segundos à 60°C.

Para a precipitação dos produtos das reações de sequenciamento, foram adicionado 2 μL de acetato de sódio/ EDTA (Para uma solução de 50 mL: 6,15 gramas de acetato de sódio, 25 mL de EDTA 0,5 M pH=8,0, ajuste do pH para 8,0 e completar o volume com água ultra-pura e autoclavar a solução) em cada amostra e 60 μL de etanol 100%, centrifugados por 90 minutos, a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado invertendo a placa, em seguida foram adicionado 150 μL de etanol 70% e a placa foi centrifugada por mais 90 minutos, a 4000 rpm. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado, seco à 40°C por 10 minutos, em termociclador. Ao *pellet* foram adicionados 10 μL de *Hi-Di Formamide* (Applied Biosystems), homogeneizado e submetidos ao sequenciador *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). A Figura 8 esquematiza este protocolo de sequenciamento.

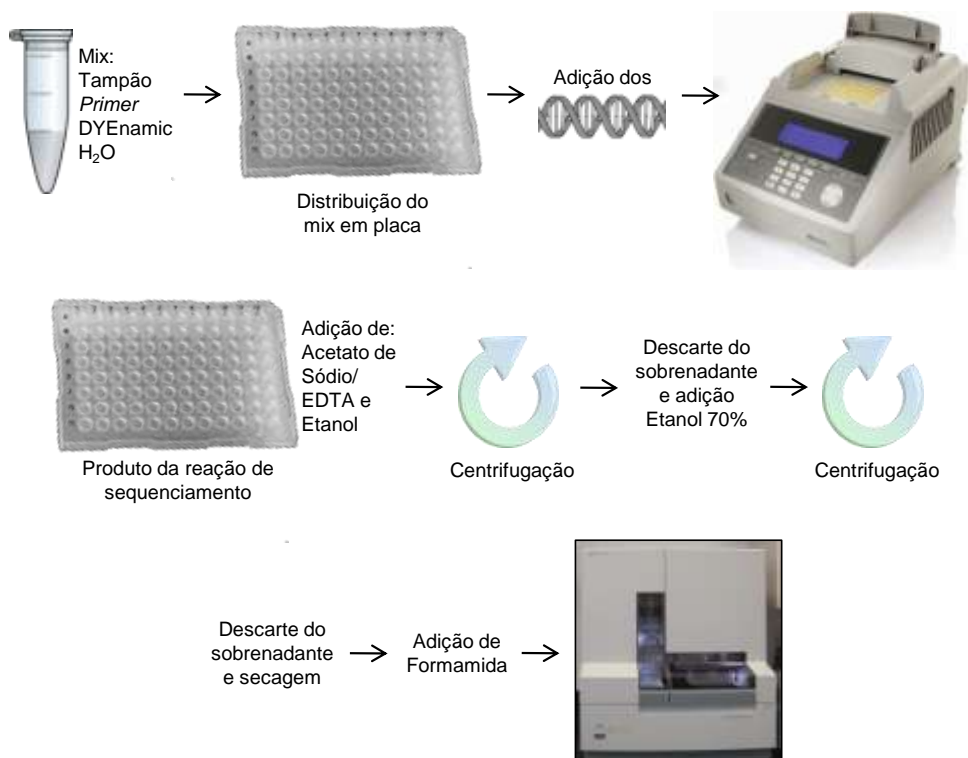


Figura 8. Esquema da reação de sequenciamento de DNA.

Para a reação de sequenciamento do gene *recA* dos 177 isolados, o protocolo foi o mesmo descrito acima, modificando somente os *primers* utilizados, BCR 3 e BCR 4 (5 pmols) e a temperatura de anelamento para 58°C. A purificação do produto da reação de sequenciamento procedeu-se da mesma maneira, como descrito acima.

3.6 – Análises das sequências

As sequências obtidas foram editadas usando o programa Phred/Phrap/Consed (*Linux*), onde as bases de baixa qualidade (≤ 20) foram removidas. As sequências editadas foram comparadas com sequências depositadas no *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI – www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando o programa *nucleotide blast* do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1997) e com o bando de dados do *Ribosomal Database Project* (RDP – www.rdp.cme.msu.edu), determinando a identidade das sequências dos isolados com as sequências do banco de dados.

O número de UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais) foi determinado pelo programa Mothur (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2005), considerando o nível de similaridade de 0,03. O alinhamento das sequências gênicas foi efetuado empregando-se o programa *Clustal W* (THOMPSON et al., 1997). A partir do alinhamento, foi construída a árvore filogenética pelo método de *Neighbour-Joining* baseados no método de *Jukes-Cantor* e valor de “*bootstrap*” de 1000 repetições, utilizando o software MEGA, versão 4.0.

3.7 – Teste de Biodegradação de Hidrocarbonetos

O teste de biodegradação foi realizado conforme Hanson et al. (1993), com algumas modificações. Esse teste é utilizado para a detecção de linhagens bacterianas com a capacidade de biodegradação e baseia-se na aplicação do indicador redox DCPIP (2,6-diclorofenol-indofenol) à solução contendo os HPAs/ Diesel, bem como os isolados. Conforme as bactérias utilizam os substratos como fontes de carbono, ocorre a liberação de elétrons que são transferidos ao indicador,

que sofre redução e sua consequente descoloração (de azul para incolor), conforme Figura 9.

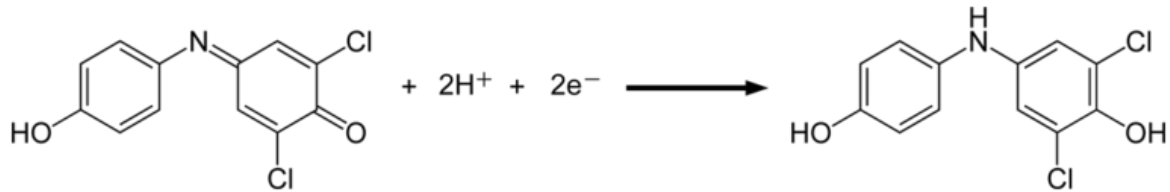


Figura 9. Processo de redução do indicador DCPIP.

Um teste foi realizado com quatro linhagens de referência DSMZ (291, 6899, 6506 e 8369) para verificar o tempo de biodegradação dos substratos, a linhagem mais eficiente e a concentração mais adequada dos substratos para o teste de biodegradação com os isolados de *Burkholderia*. Assim, quatro placas foram preparadas com os padrões DSMZ e os três substratos (Naftaleno, fenantreno e diesel), em diferentes concentrações. Para o naftaleno e fenantreno foram utilizadas as concentrações: 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; e 1%; e para o diesel, foram utilizadas as seguintes concentrações no experimento: 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 20%. O teste foi realizado em triplicata sendo os padrões utilizados: DSMZ 291 – *Pseudomonas putida*; DSMZ 6899 – *Pseudomonas putida*; DSMZ 6506 – *Pseudomonas fluorescens* e DSMZ 8369 – *Pseudomonas fluorescens*.

Assim, para a realização dos testes de biodegradação com os isolados de *Burkholderia* o padrão utilizado foi o DSMZ 6506 - *P. fluorescens* e a concentração final dos substratos naftaleno e fenantreno foi 0,2% e, para o diesel, foi de 8%.

Em seguida, um segundo teste foi realizado com 15 isolados de *Burkholderia* escolhidos aleatoriamente. Esses isolados foram cultivados em tubos de 50 mL contendo 10 mL de meio de cultura BH (descrito no item 3.2) e 1% de glicose, porém esse teste foi considerado falso-positivo, visto que ocorreu o consumo da glicose contida no meio BH e a consequente descoloração do indicador DCPIP.

Um novo teste foi programado com os 174 isolados (visto que três isolados - 1, 10 e 246 - estavam com as células inviáveis) que foram incubados em tubos com 10 mL de meio BH esterilizado sem glicose, mantidos por 72-96h à 30°C, 170 rpm. Após o crescimento, a absorbância de cada amostra foi medida e ajustada para 0,3-0,4 a 600nm (LELLIOTT & STEAD, 1987), que corresponde a 10^8 - 10^9 unidade

formadora de colônia (UFC)/ mL. O teste foi realizado em placas de 96 poços dividida em CN (controle negativo), N (naftaleno), F (fenantreno), D (diesel) e CP (controle positivo), sendo o volume final de 300 μL / poço. Em cada poço da placa, foi adicionado meio BH (estéril) nos seguintes volumes: CN – 294 μL , N – 266 μL , F e D – 250 μL , com exceção do CP que foi adicionado 274 μL de meio BH com 1% de glicose, para verificar a vitalidade dos isolados. O segundo passo foi a adição, em todos os poços, de 6 μL do indicador DCPIP 0,2% (preparado na hora do uso, protegido da luz e filtrado), e em cada coluna referente aos compostos, foram adicionados 8 μL de naftaleno 5% (dissolvido em acetona), 24 μL de fenantreno 2,5% (dissolvido em acetona) e o 24 μL de diesel (Distribuidora Shell – 3% de biodiesel). Os inóculos (20 μL) foram adicionados em todos os poços, com exceção do controle negativo, sendo distribuídos por linhas nas placas. As placas foram mantidas em estufa, 30°C, com agitação orbital a 170 rpm por uma semana, e diariamente a absorbância das placas foi medida e fotografadas. A Figura 10 esquematiza este protocolo.

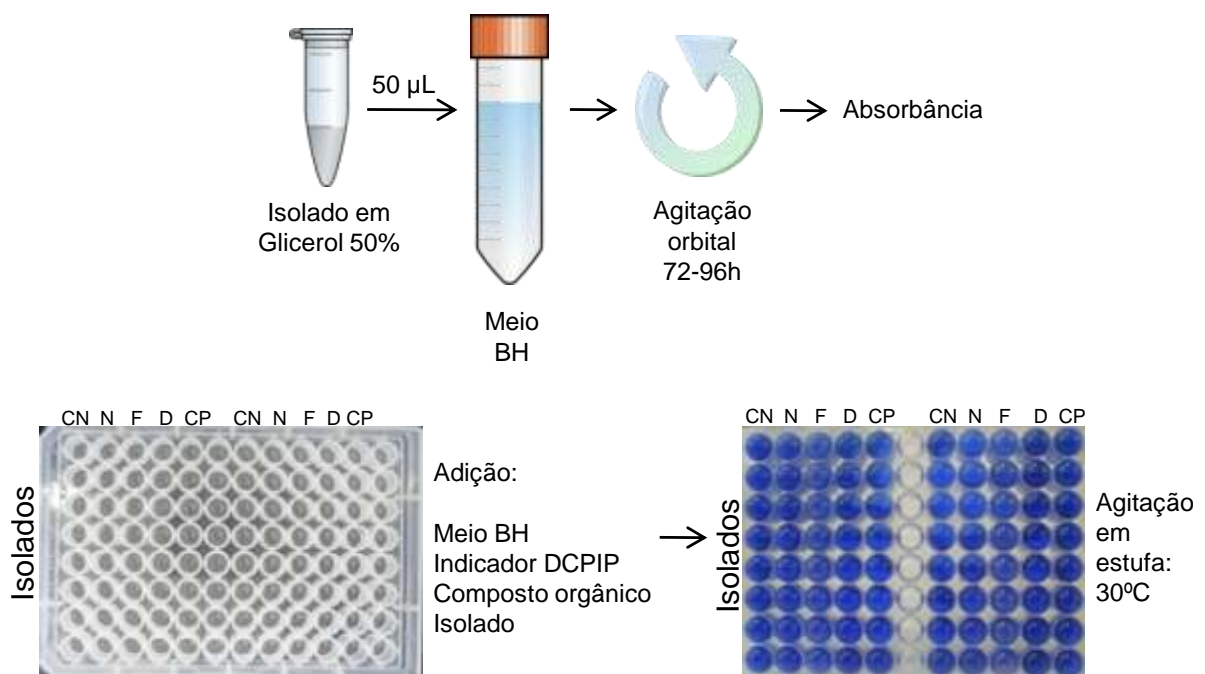


Figura 10. Protocolo simplificado do teste de biodegradação dos substratos: naftaleno, fenantreno e diesel, por isolados de *Burkholderia*.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Extração do DNA dos Isolados

A extração do DNA dos isolados foi realizada com sucesso, obtendo quantidade e qualidade suficiente para as análises moleculares. As amostras foram quantificadas por espectrofotômetro e a seguir diluiu-se o DNA para aproximadamente 20 ng por amostra. Após a diluição, preparou-se um gel de agarose 1% (Figura 11) para verificar a eficiência da diluição e a qualidade do DNA de cada amostra.

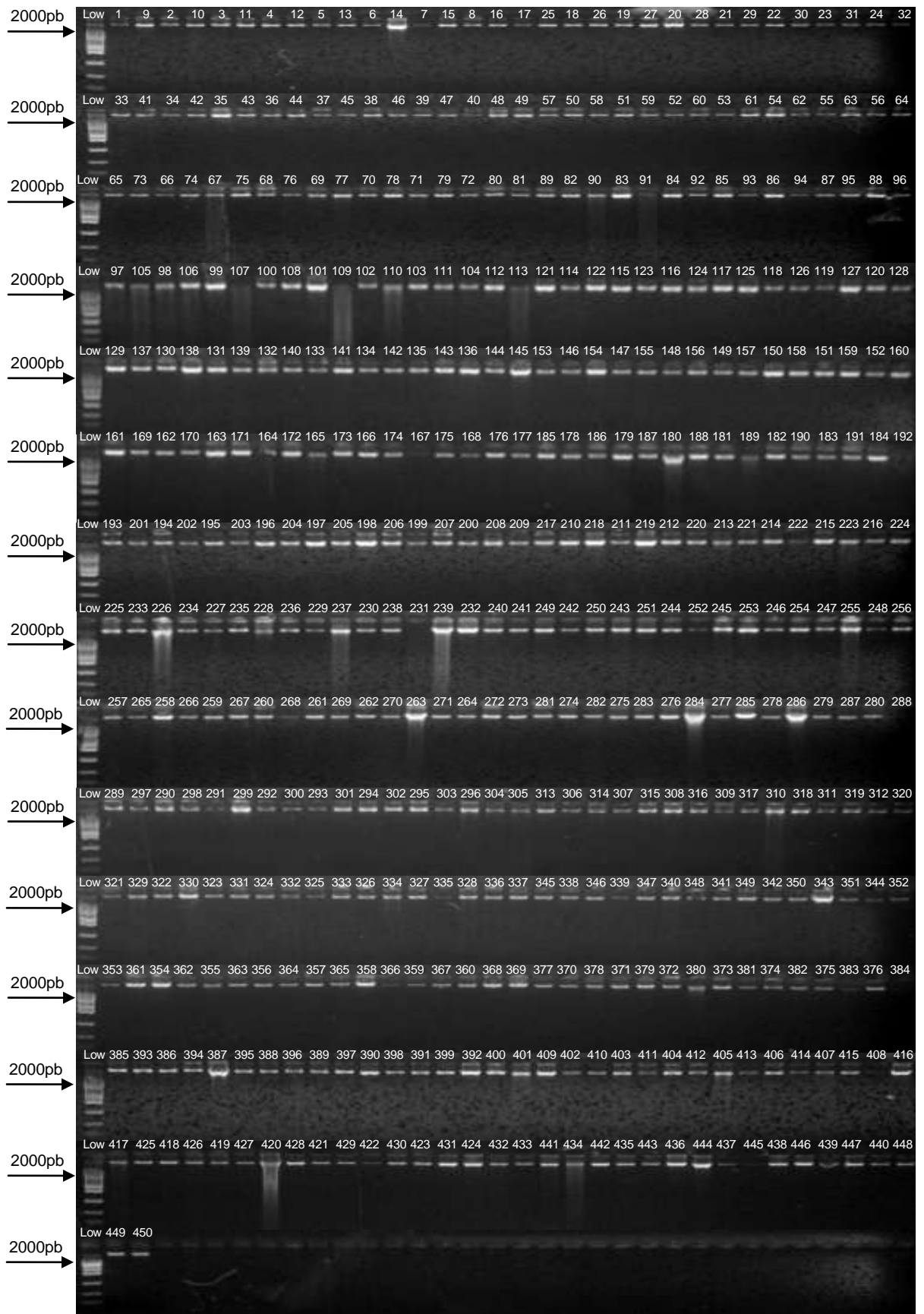


Figura 11. Quantificação das amostras de DNA diluído dos 450 isolados.

4.2 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Após a extração dos DNAs dos isolados, foi realizada a amplificação do gene 16S rRNA através da PCR utilizando os *primers* fD1 e rD1. Logo em seguida, os produtos da PCR foram purificados, quantificados em gel de agarose 1%, como mostra a Figura 12. A quantidade e qualidade da amplificação foram suficientes para realizar a reação de sequenciamento, para obtenção das sequências do gene 16S rRNA

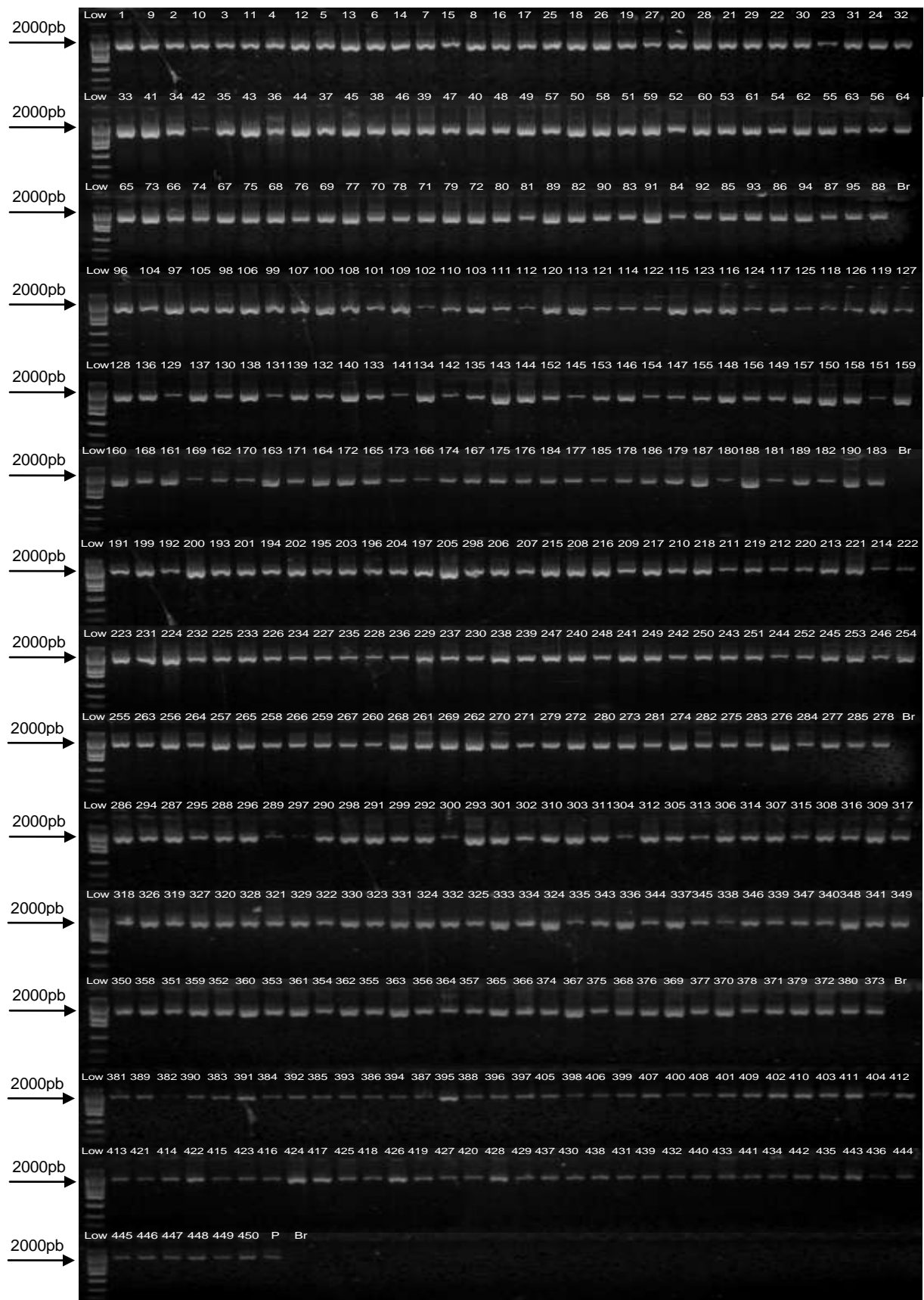


Figura 12. Amplificação do gene 16S rRNA dos 450 isolados. P é o padrão DSMZ 11319 – *B. vietnamiensis* e Br é a reação em branco.

Após a amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA, foram obtidos 177 isolados identificados como sendo do gênero *Burkholderia*. E para esses isolados, foi feita a PCR para a amplificação de gene *recA*, por meio dos *primers* BCR3 e BCR4. Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados e quantificados em gel de agarose 1%, como mostra a Figura 13.

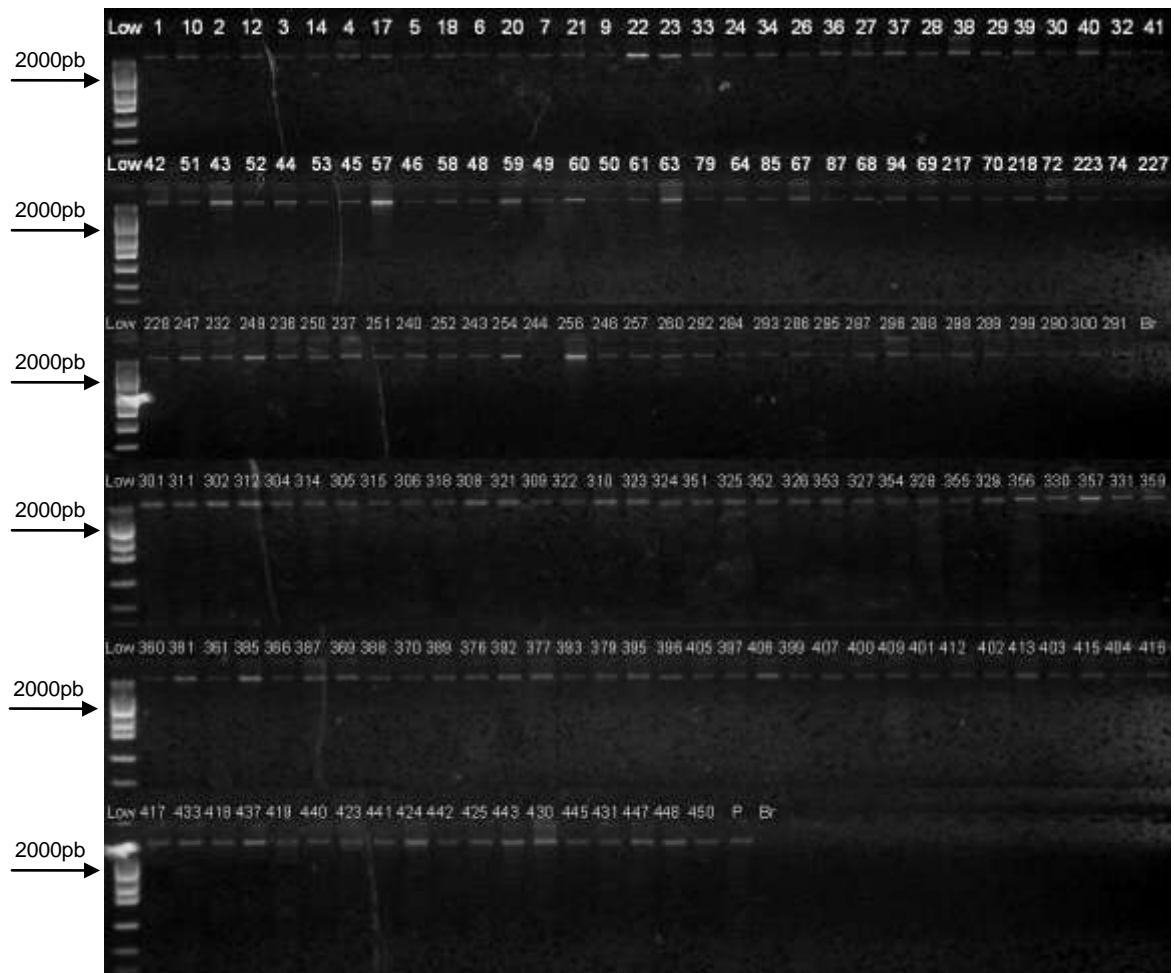


Figura 13. Amplificação do gene *recA* dos 177 isolados de *Burkholderia*. P é o padrão DSMZ 11319 – *B. vietnamiensis* e Br é o branco da reação.

4.3 – Análise Molecular dos Isolados

4.3.1 – Gene 16S rRNA

O Complexo *Burkholderia cepacia* apresenta linhagens fenotipicamente semelhantes, porém geneticamente diferentes. Assim a análise genética desses micro-organismos é muito importante para os estudos taxonômicos, bem como para o conhecimento e aplicação de suas atividades metabólicas no ramo econômico e ambiental. Através dos bancos de dados do NCBI e do RDP, as sequências obtidas pelo sequenciamento de gene 16S rRNA dos 450 isolados foram comparadas e classificadas numa variação de identidade de 91% a 100%. Os isolados 85 – *Burkholderia unamae* (93%); 140 – *Staphylococcus aureus* (91%); 201 – *Paenibacillus* sp. (96%); 219 – *Pectobacterium cacticida* (91%) e 241 – *Bacillus thuringiensis* (96%) foram os únicos isolados que apresentaram similaridade abaixo de 97%. O isolado 85 que foi classificado como o gênero de interesse, pode ter apresentado baixa similaridade devido aos novos isolados pouco estudados até o momento. Desses 450 isolados da coleção, 177 foram identificados como sendo do gênero *Burkholderia*.

Na comparação entre os bancos de dados do NCBI e do RDP, utilizados para identificar os isolados, houve diferença entre eles, devido ao fato de que o banco de dados do NCBI possui uma quantidade enorme de sequências que podem ser depositadas sem muito critério, ao contrário do banco de dados do RDP, que possui ferramentas especializadas. Na comparação, 92 sequências foram igualmente classificadas pelos dois bancos de dados, 84 sequências foram identificadas até o nível de espécie pelo banco do RDP e, ao nível de gênero pelo NCBI, e apenas uma sequência foi classificada ao nível de espécie pelo NCBI e ao nível de gênero pelo RDP. Sendo assim, as 177 sequências obtidas do sequenciamento do gene 16S rRNA foram processadas no programa Mothur que agrupou as sequências semelhantes, correspondentes a mesma UTO (Unidade Taxonômica Operacional) por níveis de similaridade de 0,03. A Tabela 1 expressa as sequências que foram consideradas semelhantes.

Tabela 1 – Sequências semelhantes agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) pelo programa MOTHUR.

UTOs	Isolados
A	1; 10
B	2; 3; 4; 5; 6; 14; 17; 21; 22; 23; 24; 27; 36; 37; 39; 43; 44; 45; 46; 48; 58; 60; 63; 67; 69
C	7; 9; 18; 20; 28; 29; 38; 59; 94; 244; 246; 251; 256; 260; 286; 289; 290; 291; 299; 301; 302; 310; 314; 318; 322; 324; 326; 327; 328; 329; 360; 377; 406; 407; 450
D	12; 32; 33; 34; 41; 87; 217; 223; 284; 287; 288; 292; 293; 295; 296; 298; 304; 306; 308; 309; 311; 315; 321; 323; 325; 330; 351; 359; 366; 370; 393; 400; 402; 404; 405; 409; 418; 441; 443; 445; 447; 448
E	26; 64; 300; 305; 312; 355; 357; 361; 412; 413; 415; 416; 417; 419; 424; 425; 433; 437
F	30; 40
G	42; 49; 53; 57; 74
H	50; 51; 52; 61; 68; 72; 79; 237
I	70
J	85
K	379; 392; 396; 397; 399
L	236; 243; 250; 385; 388; 218; 227; 232; 240; 247; 249; 254; 257; 331; 352; 381; 387; 389; 395; 401; 403; 423; 430; 431; 440; 442
M	228; 252; 356
N	353; 354
O	369
P	376

A partir do resultado do sequenciamento do gene 16S rRNA e do agrupamento por similaridade, as sequências foram alinhadas com auxílio do programa MEGA e a árvore filogenética foi construída (Figura 14). O número sobre os braços são valores de *bootstrap* obtidos em 1000 repetições, expressos em porcentagem. A análise da árvore revelou grupos compostos por linhagens diferentes entre si. A UTO nomeada como **A**, que está representada na árvore filogenética pelo isolado BCM 10 (*Burkholderia* sp.), apresentou 47% de similaridade com *Burkholderia glathei*. O grupo **B**, representado por BCM 27 (*B. ambifaria*), apresentou 33% de semelhança evolutiva com o grupo formado por essa espécie, porém, apresenta algumas características exclusivas. O grupo **C**, representado pelo isolado BCM 310 (*B. gladioli*), apresentou 99% de similaridade com essa espécie,

porém foi agrupado com 59% de semelhança com a espécie *B. glumae*. O representante da UTO **D**, BCM 287 (*B. multivorans*), é uma espécie considerada patogênica, formou um grupo externo ao clado que contém as espécies ditas patogênicas, como *B. cepacia* e *B. cenocepacia*. Para o grupo **E**, o representante na árvore é BCM 415 (*B. tropica*), apresentando 67% de similaridade com *B. tropica*. O grupo **F**, representado por BCM 30 (*B. ferrariae*), apresentou 58% de semelhança com *B. ferrariae*. Neste clado, o representante do grupo **M**, BCM 228 (*B. mimosarum*), está presente sendo semelhante com *B. mimosarum*. Para o grupo **G**, que tem como representante o isolado BCM 42 (*B. unamae*), apresentou uma distância evolutiva do clado formado por linhagens como *B. mimosarum* e *B. silvatlantica*. Neste clado também está presente o isolado BCM 70 (*B. nodosa*), representante do grupo **I** e BCM 85 (*B. unamae*), representante do grupo **J**, possuindo características exclusivas. O isolado BCM 72 (*Burkholderia* sp.), que é o representante do grupo **H**, apresentou 37% de similaridade com a espécie *B. sacchari*. O representante do grupo **K**, BCM 396 (*B. phenazinium*), apresentou 46% de similaridade com *B. ginsengisoli*, enquanto que o grupo **L**, representado por BCM 250 (*B. lata*), apresentou 100% de semelhança com *B. caribensis*. O representante do grupo **N**, BCM 353 (*B. lata*), apresentou 90% de semelhança com *B. tuberum*. O grupo **O**, representado pelo isolado BCM 369 (*B. arboris*), está localizado num braço externo ao clado formado por espécies patogênicas, indicando que esse grupo possui características distintas. O grupo **P**, representado por BCM 376 (*B. phymatum*) apresentou 97% de similaridade com essa mesma espécie. Foi utilizado a espécie *Pandoraea pulmonicola* formando um grupo externo à todos os clados.

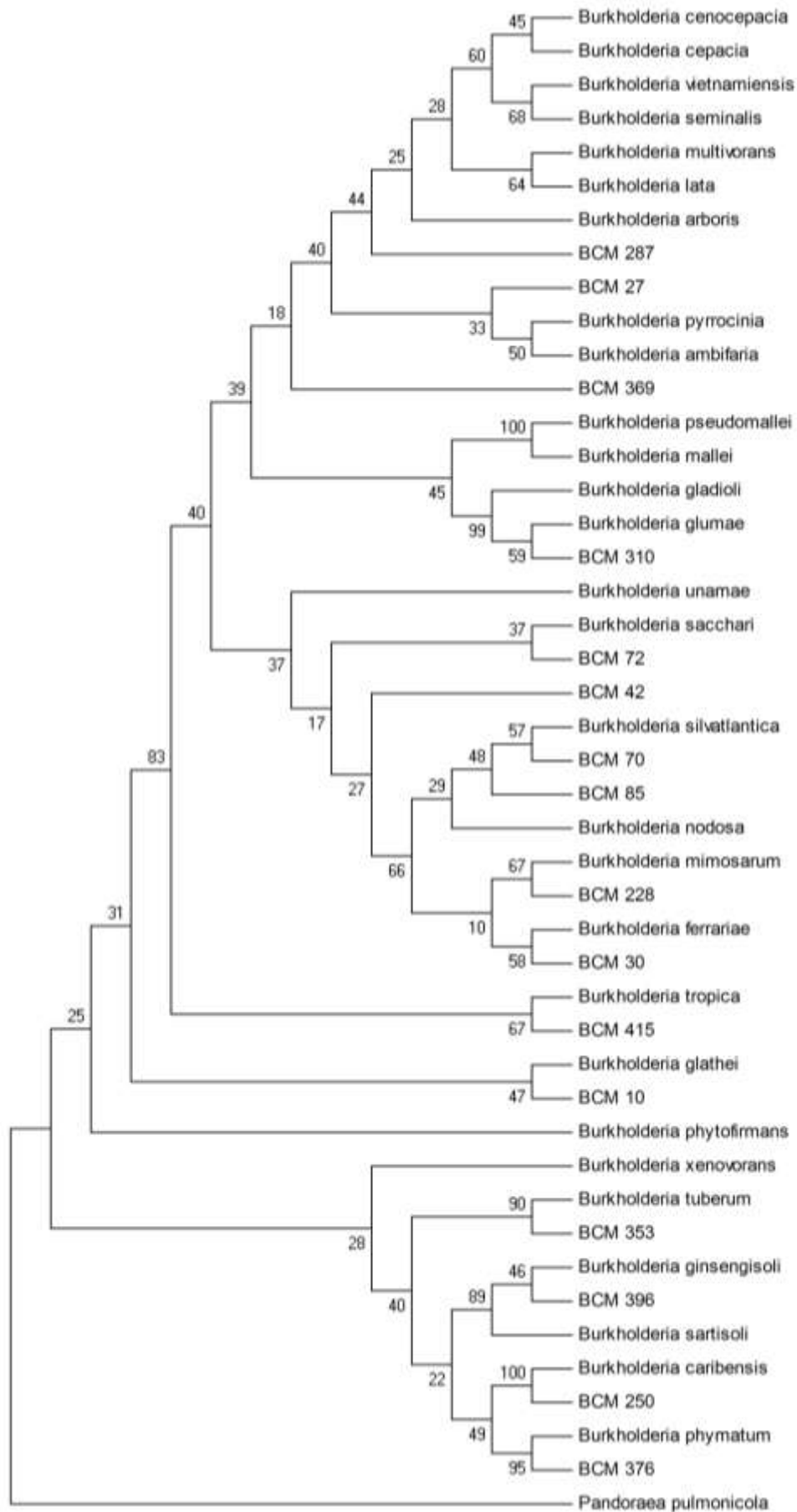


Figura 14. Árvore filogenética construída usando o método *Neighbour-Joining*, baseada nas seqüências do gene 16S rRNA dos isolados de *Burkholderia*.

4.3.2 – Gene *recA*

Após o sequenciamento das 177 amostras, classificadas pelo gene 16S rRNA como sendo do gênero *Burkholderia*, essas amostras foram preparadas para o sequenciamento do gene *recA*. Após esse sequenciamento, as amostras foram analisadas e editadas no programa phred/Phrap/consed, onde as bases de baixa qualidade foram excluídas das sequências. Pelo programa Mothur, as sequências semelhantes foram agrupadas por níveis de similaridade de 0,05. A Tabela 2 agrupa as 177 sequências em 30 UTOs.

Tabela 2 – Sequências do gene *recA* semelhantes agrupadas pelo programa Mothur.

UTOs	Isolados
A1	2; 14; 30; 45; 87; 291; 302
B1	4; 51; 328; 395
C1	6; 20; 38; 49; 70; 327; 385; 424
D1	9; 67; 227; 304; 357; 387; 393; 441
E1	5; 12; 53; 69; 300; 351; 425;
F1	18; 21; 59; 228; 326; 396
G1	9; 23; 52; 218; 305; 415
H1	26; 27; 63; 244; 356; 403; 442
I1	10; 33; 64; 240; 389; 397; 437
J1	7; 39; 46; 72; 355; 376; 433
K1	24; 40; 68; 247; 361; 412; 440
L1	1; 42; 48; 85; 312; 413; 450
M1	22; 43; 58; 79; 290; 423
N1	28; 37; 217; 306; 352; 409
O1	50; 223; 249; 388
P1	57; 94; 251; 329; 401
Q1	60; 252; 301; 354; 430
R1	3; 36; 232; 256; 293; 370; 445
S1	236; 260; 284; 308; 392; 405
T1	243; 286; 295; 360; 366; 402; 418; 448
U1	17; 34; 44; 287; 311; 325; 400; 447
V1	237; 246; 288; 309; 404; 443
W 1	32; 289; 292; 353; 419
X1	41; 296; 299; 381; 406
Y1	29; 298; 324; 369; 417
Z1	61; 310; 315; 379; 431
A2	257; 321; 331; 399
B2	250; 314; 323
C2	254; 322; 330; 407; 416
D2	74; 318; 359; 377

O alinhamento foi realizado no programa *BioEdit*, pela ferramenta *Clustal W*, juntamente com sequências de referências obtidas do banco de dados do *FunGene*

(<http://fungene.cme.msu.edu/index.spr>) e, a árvore filogenética (Figura15) foi construída no programa MEGA.

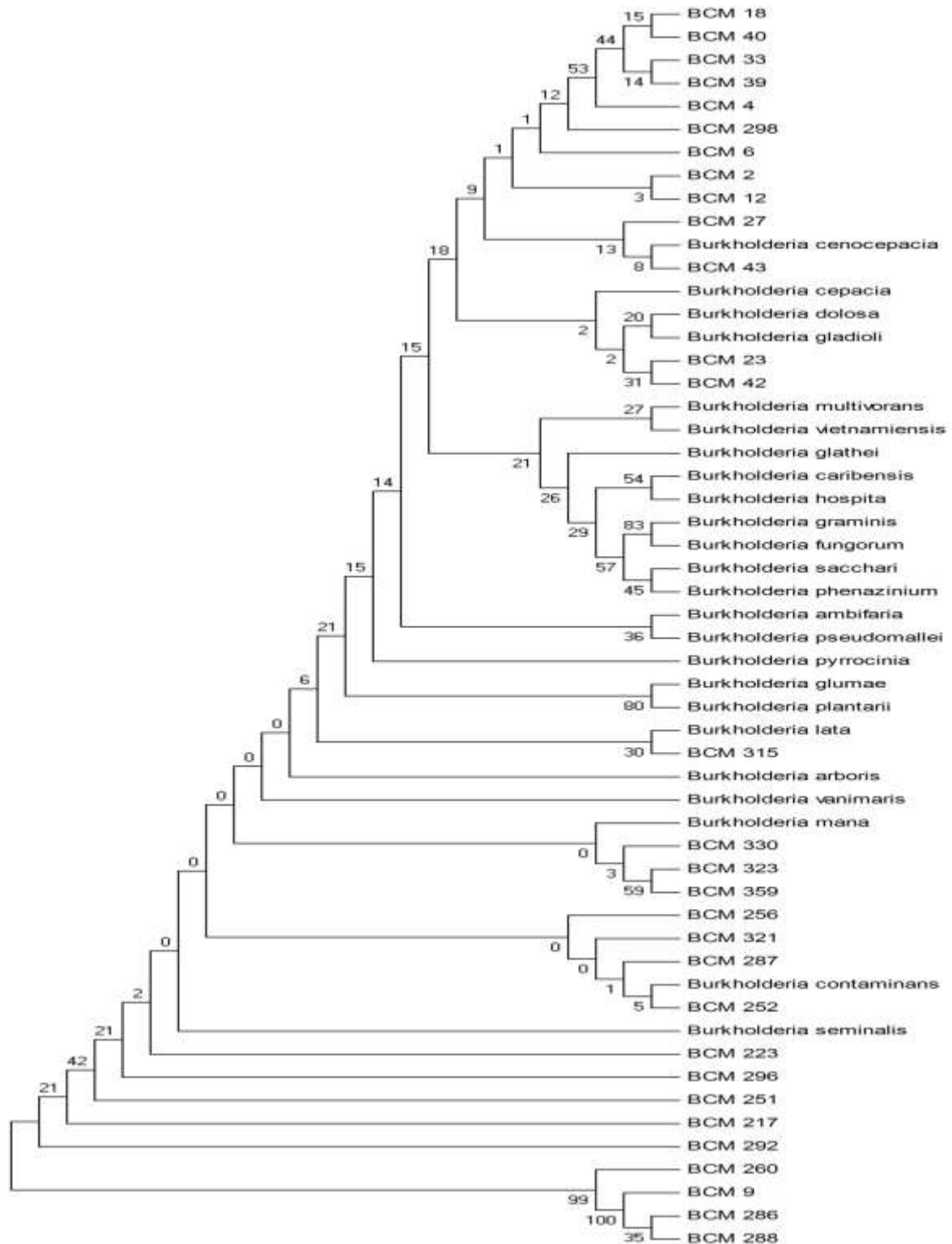


Figura 15. Árvore filogenética construída usando o método *Neighbour-Joining*, baseada nas sequências do gene *recA* dos isolados de *Burkholderia*.

A análise da árvore filogenética, construída com base nas sequências obtidas pelo sequenciamento do gene *recA*, nos mostra que vários isolados não apresentaram parentesco evolutivo com nenhuma das sequências de referência, tendo características genéticas distintas. O grupo de isolados na base da árvore, formado por 223, 296, 251, 217, 292, 260, 9, 286 e 288 é um exemplo desta distância genética.

O segundo grupo sem similaridade genética com as sequências de referências está localizado no topo da árvore, formado pelos isolados: 18, 40, 33, 39, 4, 298, 6, 2, 12, 27, 43, 23 e 42. Nesses dois grupos, alguns isolados apresentaram similaridade entre si, como é o caso do isolado 33 e 39, ambos identificados como *Burkholderia* sp.

Para os isolados 2, 6, 9, 12, 18, 33, 39 e 40 que foram identificados como sendo *Burkholderia* sp., pela análise do sequenciamento, e estão agrupados na árvore sem similaridade com as sequências de referências, podem, após muitos estudos genéticos e também bioquímicos, ser classificados como novas espécies desse gênero.

Os isolados 252, 256, 287 e 321 apresentam características genéticas semelhantes à *Burkholderia contaminans*. Para os isolados 323, 330 e 359 apresentam características comuns a *Burkholderia mana*. O isolado 315 foi o único a estar no mesmo clado da árvore que *Burkholderia lata*. No grupo das patogênicas, os isolados 23 e 42 se assemelham com *Burkholderia cepacia* e os isolados 27 e 43, com *Burkholderia cenocepacia*.

Visto que os isolados de *Burkholderia* utilizados neste estudo foram obtidos de zonas tropicais e que o *primer* utilizado para a amplificação do gene *recA* foi desenhado com base na sequência gênica de linhagens bacterianas européias, a falta de similaridade pode ser explicada diante desse fato, uma vez que as sequências dos isolados não se agruparam com as sequências de referências. Assim, há a necessidade de muitos estudos nas regiões tropicais para conhecer melhor as linhagens bacterianas bem como a biodiversidade local.

4.2 – Teste de Biodegradação de Hidrocarbonetos

As placas com os padrões DSMZ 291, 6506, 6899 e 8369, utilizados no teste de biodegradação foram mantidas em estufa com agitação orbital por uma semana. As Figuras 16; 17; 18 e 19 expressam a evolução do teste com esses padrões.

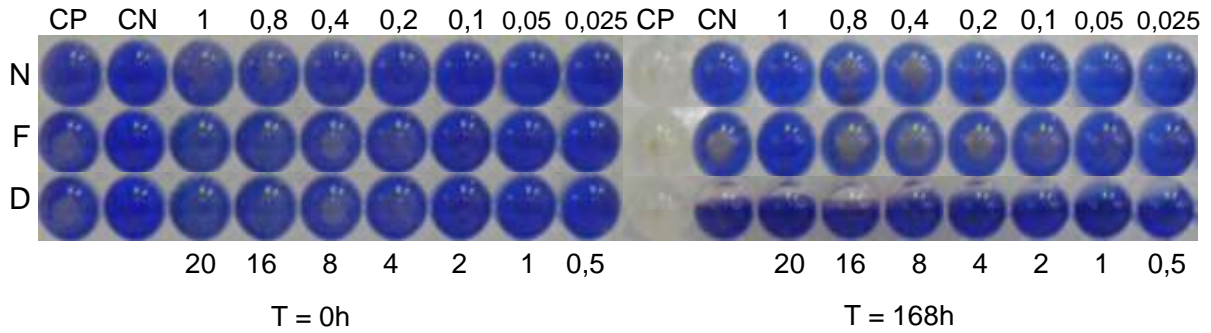


Figura 16. Teste de biodegradação com o padrão DSMZ 291 – *Pseudomonas putida*.

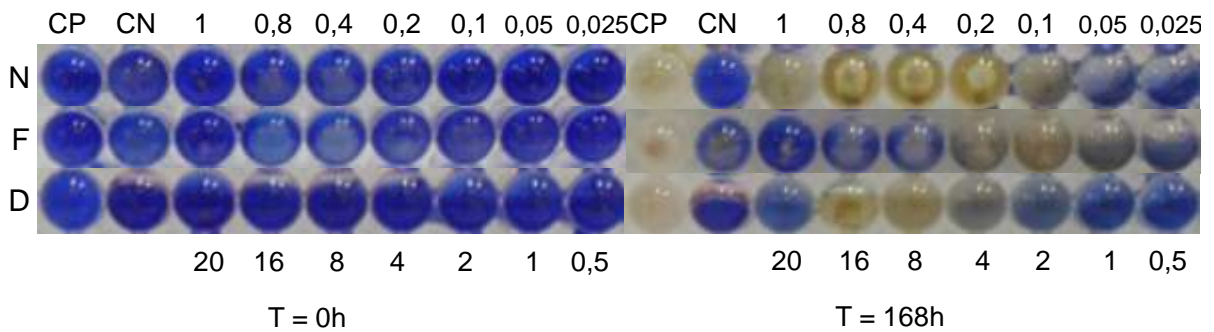


Figura 17. Teste de biodegradação com o padrão DSMZ 6506 – *Pseudomonas fluorescens*.

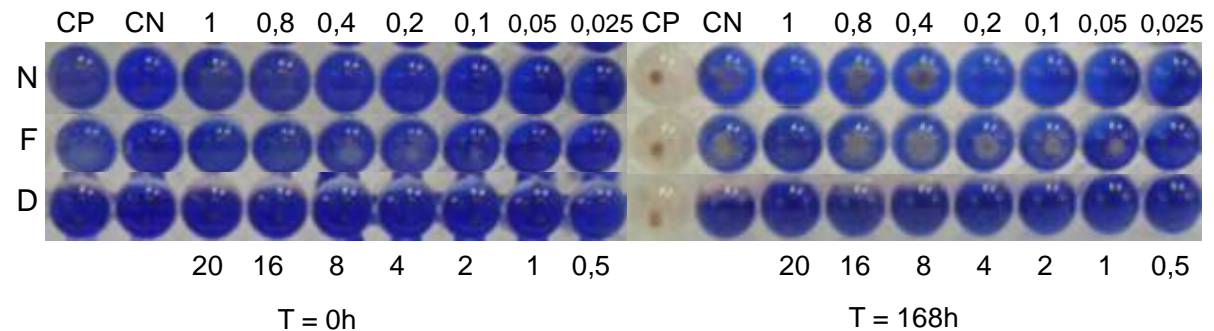


Figura 18. Teste de biodegradação com o padrão DSMZ 6899 – *Pseudomonas putida*.

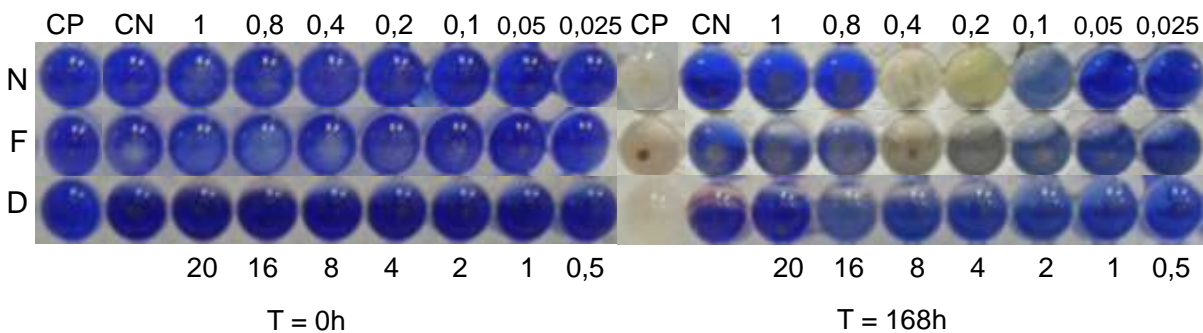


Figura 19. Teste de biodegradação com o padrão DSMZ 8369 – *Pseudomonas fluorescens*.

A realização do teste de biodegradação do naftaleno, fenantreno e diesel com os padrões DSMZ, mostrou que todos os controles positivos (CP) apresentaram células ativas, visto que houve o consumo da glicose contida no meio BH e a consequente descoloração do indicador DCPIP (de azul para incolor).

Para o teste com os padrões DSMZ 291 e 6899 (ambos *P. putida*), não houve uma descoloração acentuada do indicador DCPIP, assim pode-se concluir que não houve degradação dos substratos. O padrão DSMZ 8369 (*P. fluorescens*) consumiu somente o naftaleno e o fenantreno com eficiências, nas concentrações 0,2-0,4%, porém para o diesel não houve variação significativa.

O padrão DSMZ 6506 (*P. fluorescens*) foi o mais eficiente na degradação dos três substratos. Para o naftaleno, houve a degradação nas concentrações entre 0,1-1%. Já para o fenantreno, por ser pouco solúvel e tóxico para as células, nas concentrações maiores que 0,4%, não houve a degradação do substrato, sendo verificada nas concentrações entre 0,05-0,2%. Para o diesel, por possuir cadeias alifáticas mais fácil de serem quebradas pelo metabolismo celular, pode ser verificada a degradação nas concentrações finais entre 2-16%. Nas baixas concentrações, 0,5 e 1%, não houve degradação desse substrato e um dos fatores pode ter sido devido a evaporação.

A Tabela 3 expressa a absorbância obtida no tempo 0h e no tempo 168h dos padrões DSMZ pela descoloração do indicador DCPIP por meio da degradação dos hidrocarbonetos.

Tabela 3 – Absorbância medida no tempo 0h e 168h de experimento com as padrões DSMZ

Concentração (%)	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4	0,5	0,8	1	2	4	8	16	20
Padrão DSMZ 291 - <i>Pseudomonas putida</i>													
N (0h)	2,37	2,42	2,55	2,70	2,85		3,03	3,20					
N(168h)	1,97	1,95	1,76	2,13	2,56		2,97	3,02					
F (0h)	2,38	2,43	2,70	3,01	-		-	-					
F (168h)	2,00	2,05	2,58	3,16	-		-	-					
D (0h)						2,34		2,39	2,39	2,37	2,34	2,40	2,38
D (168h)						1,76		1,87	1,97	1,92	1,85	1,93	1,87
Padrão DSMZ 6506 - <i>Pseudomonas fluorescens</i>													
N (0h)	2,33	2,46	2,49	2,59	2,66		2,98	2,97					
N(168h)	1,18	1,18	0,80	0,71	0,95		0,60	0,57					
F (0h)	2,34	2,54	2,63	3,15	3,34		-	-					
F (168h)	2,06	1,27	0,89	0,72	3,18		-	-					
D (0h)						2,43		2,45	2,52	2,48	2,46	2,50	2,49
D (168h)						1,28		1,29	0,99	0,85	0,77	0,81	1,11
Padrão DSMZ 6899 - <i>Pseudomonas putida</i>													
N (0h)	2,46	2,44	2,55	2,58	2,57		3,01	3,04					
N(168h)	2,35	2,22	2,21	2,23	2,41		2,90	2,77					
F (0h)	2,45	2,57	2,89	3,46	3,23		-	-					
F (168h)	1,45	1,38	1,79	1,75	2,38		-	-					
D (0h)						2,34		2,42	2,43	2,38	2,41	2,44	2,53
D (168h)						0,44		1,45	1,51	1,32	1,50	1,30	1,51
Padrão DSMZ 8369 - <i>Pseudomonas fluorescens</i>													
N (0h)	2,39	2,39	2,50	2,72	2,74		3,03	2,90					
N(168h)	2,35	2,22	1,11	0,83	0,71		2,90	2,85					
F (0h)	2,66	2,79	3,15	3,34	-		-	-					
F (168h)	1,45	1,38	2,79	2,75	-		-	-					
D (0h)						2,48		2,54	2,53	2,54	2,49	2,47	2,67
D (168h)						1,81		2,02	2,02	1,95	1,75	1,53	1,66

Legenda: N – naftaleno; F – fenantreno; D – Diesel.

Visualmente, a descoloração do indicador DCPIP não é tão evidente para os padrões DSMZ 291 e 6899, nas diferentes concentrações. Porém, analisando a absorbância medida no decorrer de 168 horas, observa-se que houve uma ligeira queda no valor, com exceção para o substrato fenantreno, para o padrão DSMZ 291 na concentração 0,2% que teve seu valor ligeiramente aumentado.

Para o padrão DSMZ 8369, houve diminuição nos valores da absorbância para todos os substratos e em todas as concentrações, porém, para o naftaleno, nas concentrações entre 0,2-0,4% o valor quase zerou, confirmando a degradação eficiente desse padrão para esse substrato.

O padrão DSMZ 6506 – *P. fluorescens* – o mais eficiente na biodegradação, observa-se queda acentuada nos valores da absorbância no decorrer de 168h para os três substratos: naftaleno, fenantreno e diesel, confirmando a coloração incolor de DCPIP.

Após os testes com os padrões DSMZ e escolhido o padrão DSMZ 6506 – *Pseudomonas fluorescens*, foram realizados os testes com os 174 isolados de *Burkholderia*. Doze placas foram preparadas para o bioensaio, mantidas em estufa, com agitação orbital e verificadas diariamente, por uma semana (tempos 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas), conforme figuras abaixo. A Figura 20 representa a Placa 1 com 15 isolados de *Burkholderia*, no decorrer de uma semana. Esses isolados estão descritos na Tabela 4, que também resume qual substrato determinado isolado degradou, marcado com o tempo dessa degradação, ou se não foi possível degradar o substrato, marcado com um traço (-). A tabela também mostra a sua origem: TPA – Terra Preta Antropogênica ou ADJ – Adjacente à Terra Preta e os respectivos sítio: Hataraha; Caldeirão Cultivado (Cal-Cult); Caldeirão Capoeira (Cal-Cap) e Mina-I.

Tabela 4 – Isolados utilizados no teste de biodegradação – Placa 1.

Isolado	Descrição	Origem	N	F	D
2	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	TPA Cal-Cult	-	-	48h
3	<i>Burkholderia cepacia</i>	TPA Cal-Cult	-	-	96h
5	<i>Burkholderia ambifaria</i>	TPA Cal-Cult	-	-	168h
7	<i>Burkholderia glumae</i>	TPA Cal-Cult	-	-	168h
12	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	TPA Cal-Cult	-	48h	48h
18	<i>Burkholderia</i> sp.	TPA Cal-Cap	-	-	168h
30	<i>Burkholderia ferrariae</i>	TPA Cal-Cap	-	-	-
32	<i>Burkholderia lata</i>	TPA Cal-Cap	-	-	-
42	<i>Burkholderia unamae</i>	ADJ Cal-Cult	-	-	48h
64	<i>Burkholderia tropica</i>	ADJ Cal-Cult	-	-	-
70	<i>Burkholderia nodosa</i>	ADJ Cal-Cap	-	-	168h
87	<i>Burkholderia anthina</i>	ADJ Cal-Cap	-	-	168h
218	<i>Burkholderia bryophila</i>	TPA Hatahara	-	-	168h
227	<i>Burkholderia caribensis</i>	TPA Mina-I	-	-	168h
228	<i>Burkholderia mimosarum</i>	TPA Mina-I	-	-	96h

Legenda: N – naftaleno; F – fenantreno; D – diesel; (-) ausência de degradação.

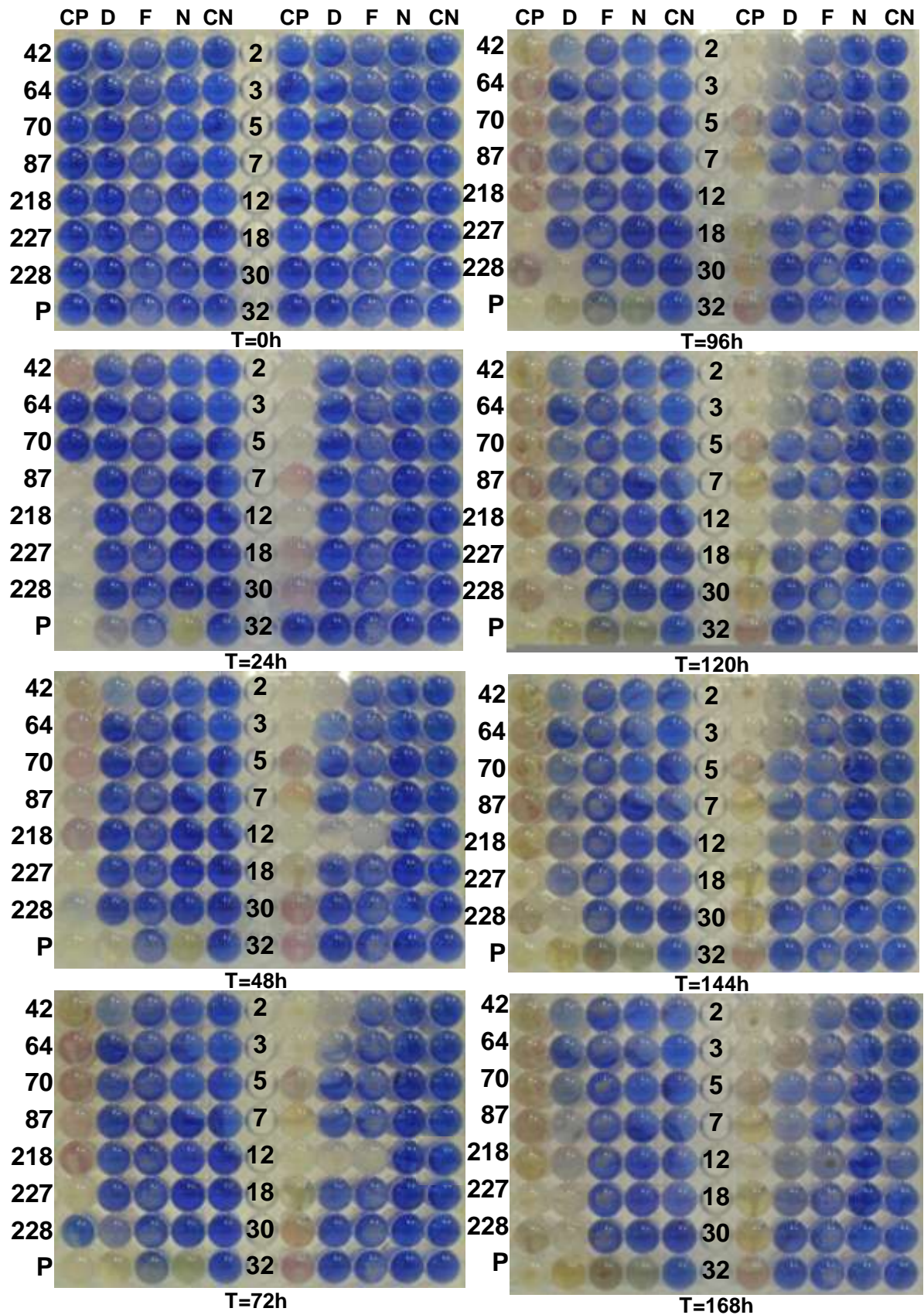


Figura 20. Teste de biodegradação referente à Placa 1 com isolados de *Burkholderia* e o padrão (P) analisados em uma semana. (CP – Controle Positivo, D - diesel, F – fenantreno, N – naftaleno, CN – Controle Negativo).

Analisando a Placa 1, nota-se que todos os controles positivos (CP) sofreram descoloração, portanto as células bacterianas estavam ativas e consumiram a glicose presente na solução. Quanto ao controle negativo (CN), nenhum foi degradado, mostrando que o teste não teve contaminação por outros micro-organismos ou que o indicador DCPIP sofre descoloração devido a fatores externos ao bioensaio.

O padrão DSMZ 6506 – *Pseudomonas fluorescens*, representado na figura acima como P, consumiu o substrato naftaleno (N) em 24 horas, verificado pela descoloração do indicador redox DCPIP (de azul para amarelo claro), uma vez que o consumo do substrato gera elétrons que reduzem o indicador, descolorindo-o. Porém, visualmente, nenhum dos isolados analisados nesta placa foram capazes de assimilar o naftaleno como fonte de carbono. Para o fenantreno (F), o padrão consumiu totalmente esse substrato em 96 horas e o isolado 12 (*Burkholderia cenocepacia*) foi o único que degradou o substrato, em 48 horas, sendo mais eficiente que o padrão. Para o diesel (D), o padrão degradou esse substrato em 48 horas. Nesse mesmo tempo, os isolados 2, 12 e 42 degradaram esse substrato, em 96 horas os isolados 3 e 228 degradaram o diesel e em 168 horas os isolados 7, 70, 87, 218 e 227 degradaram o diesel.

A absorbância da placa foi medida diariamente e o gráfico 1 demonstra que houve diminuição nos valores da absorbância desta placa para os substratos: naftaleno, fenantreno e diesel.

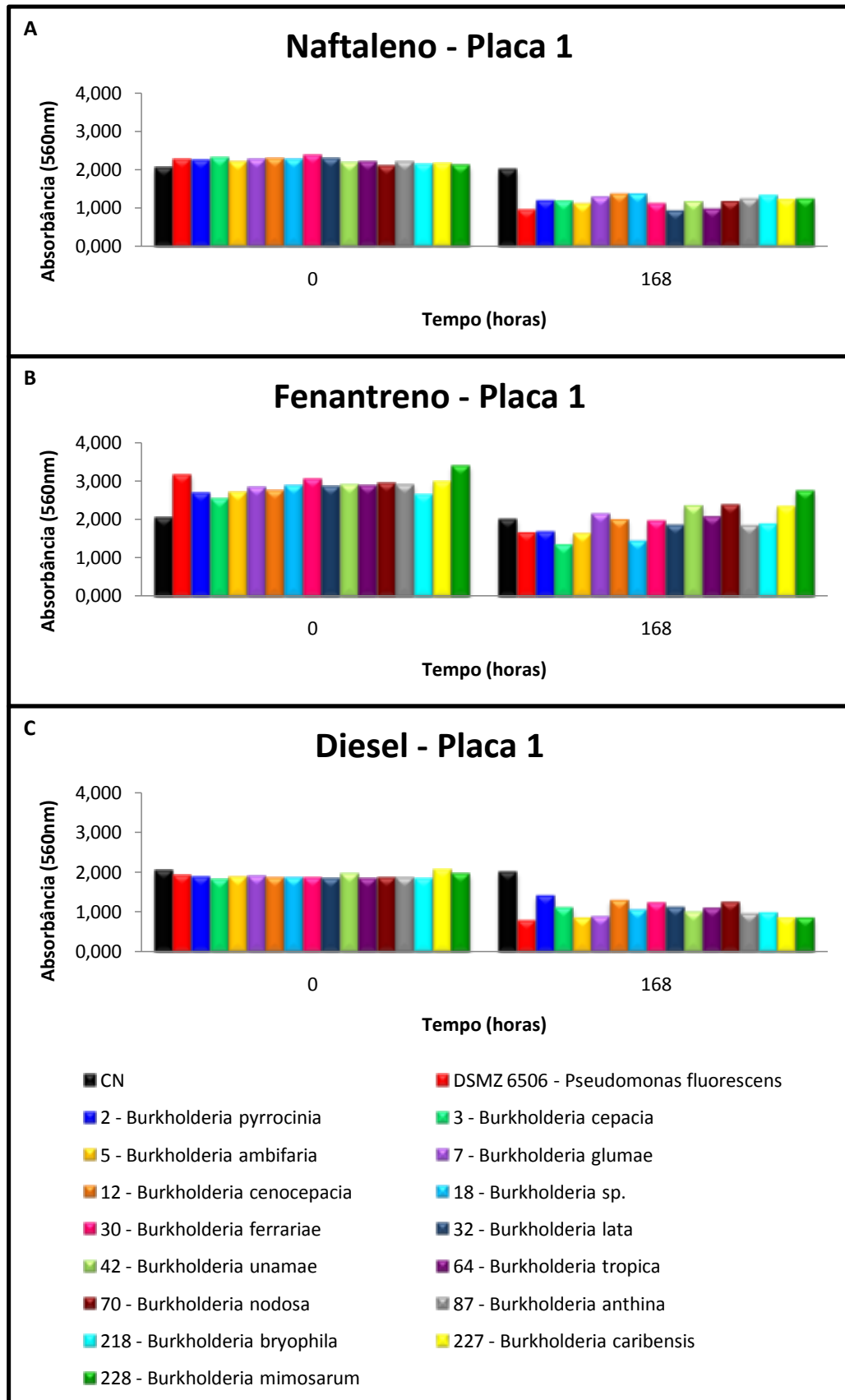


Gráfico 1. Variação da absorbância na biodegradação dos substratos no tempo 0h e 168h para os isolados da Placa 1.

Pelo Gráfico 1-A, que expressa a variação da absorvância medida no tempo 0 hora e depois de 168 horas de experimento para a degradação do naftaleno, nota-se que para os 15 isolados analisados, houve diminuição nos valores da absorvância, porém, nenhum valor inferior ao do padrão. O Gráfico 1-B, que representa a variação da absorvância no mesmo intervalo de tempo para o fenantreno, observa-se que houve queda dos valores da absorvância em todos os casos, com exceção do controle negativo (CN). Para os isolados 3 (*Burkholderia cepacia*), 5 (*Burkholderia ambifaria*) e 18 (*Burkholderia* sp.) os valores foram inferiores ao valor obtido pelo padrão e não houve descoloração total do indicador DCPIP. Outro fato observado, é que para o padrão, ao degradar o fenantreno, houve multiplicação celular e sua conseqüente morte, ficando acumulada no fundo da placa, isso pode ter mantido o valor da absorvância superior aos três isolados citados acima, aos quais não nota-se esse acúmulo celular. No Gráfico 1-C, referente aos valores da absorvância no tempo 0 hora e 168 hora para o diesel, verifica-se que houve diminuição para todos os isolados e que nenhum valor ficou abaixo do padrão.

A segunda placa (Placa 2) preparada para o teste de biodegradação está representada na Figura 21, foi registrada diariamente e os outros 15 isolados de *Burkholderia* testados estão descritos na Tabela 5, bem como sua origem.

Tabela 5 – Isolados utilizados no teste de biodegradação – Placa 2.

Isolado	Descrição	Origem	N	F	D
4	<i>Burkholderia arboris</i>	TPA Cal-Cult	-	48h	48h
6	<i>Burkholderia ambifaria</i>	TPA Cal-Cult	-	48h	24h
9	<i>Burkholderia glumae</i>	TPA Cal-Cult	-	-	24h
14	<i>Burkholderia cepacia</i>	TPA Cal-Cult	-	-	48h
17	<i>Burkholderia cepacia</i>	TPA Cal-Cap	-	-	96h
20	<i>Burkholderia</i> sp.	TPA Cal-Cap	-	-	72h
21	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	TPA Cal-Cap	-	-	48h
22	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	TPA Cal-Cap	-	-	48h
23	<i>Burkholderia ambifaria</i>	TPA Cal-Cap	72h	-	-
24	<i>Burkholderia ambifaria</i>	TPA Cal-Cap	72h	-	48h
240	<i>Burkholderia sartisoli</i>	TPA Mina-I	-	-	144h
247	<i>Burkholderia ginsengisoli</i>	ADJ Mina-I	-	-	144h
287	<i>Burkholderia multivorans</i>	TPA Mina-I	-	-	48h
376	<i>Burkholderia phymatum</i>	TPA Mina-I	-	-	144h
395	<i>Burkholderia phenazinium</i>	TPA Mina-I	-	-	120h

Legenda: N – naftaleno; F – fenantreno; D – diesel; (-) ausência de degradação.

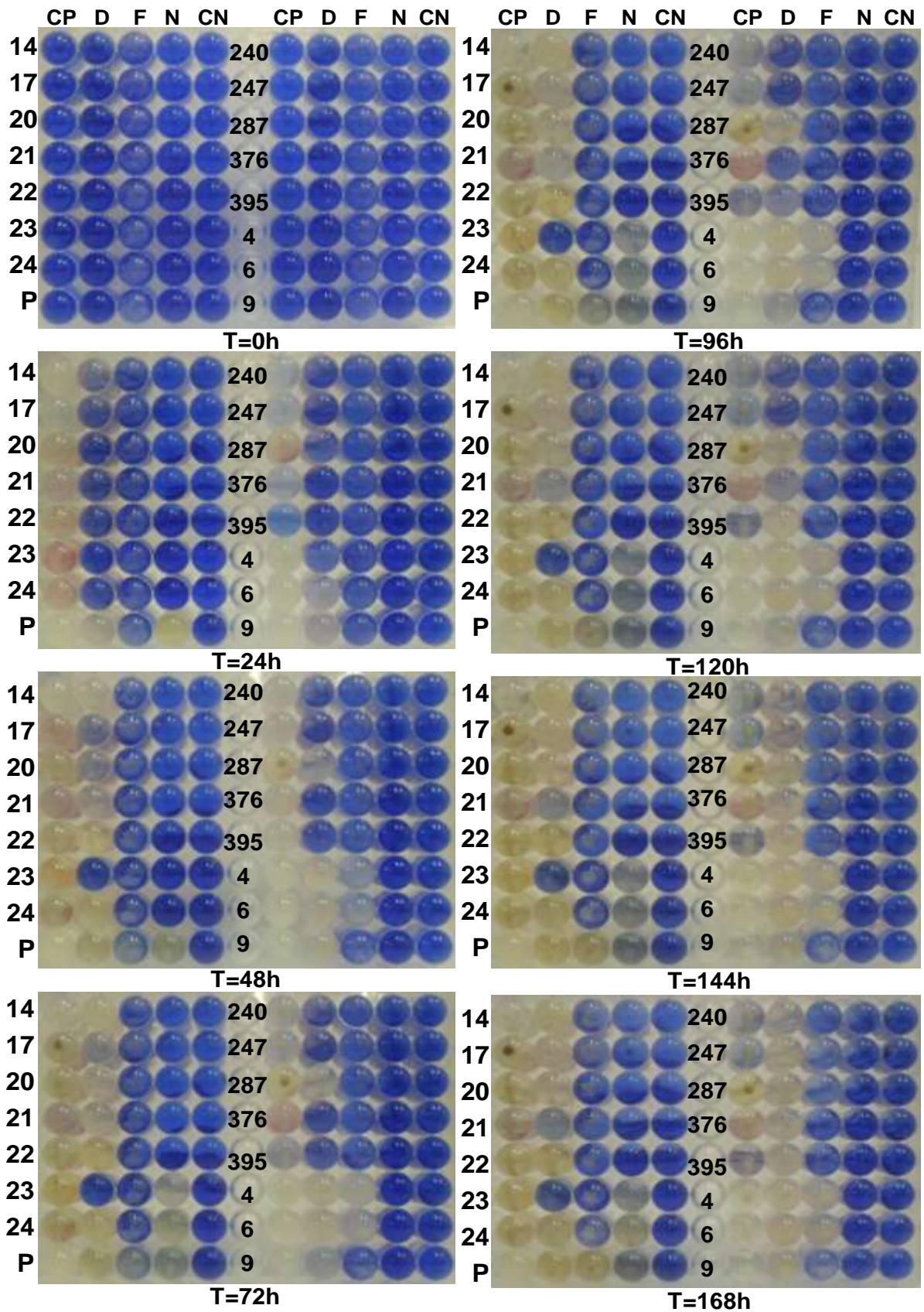


Figura 21. Teste de biodegradação referente à Placa 2 com isolados de *Burkholderia* e o padrão (P) analisados em uma semana. (CP – Controle Positivo, D - diesel, F – fenantreno, N – naftaleno, CN – Controle Negativo).

Ao analisar a Placa 2, observa-se que todos os controles positivos (CP) ficaram incolores, visto que houve o consumo da glicose pelas células bacterianas e com isso, a descoloração do indicador DCPIP. Entretanto, os controles negativos (CN) não perderam sua coloração, mostrando que a solução do bioensaio não foi contaminada. O padrão degradou o naftaleno e o diesel em 24 horas, enquanto que o fenantreno foi degradado em 96 horas.

Os isolados 23 e 24 (ambos classificados como *Burkholderia ambifaria*) foram os únicos capazes de degradar o naftaleno, num tempo de 72 horas, sendo menos eficientes que o padrão. Já os isolados 4 (*Burkholderia arboris*) e 6 (*Burkholderia ambifaria*) degradaram o fenantreno em 48 horas, sendo mais eficiente que o padrão. Para o substrato diesel, os isolados 6 e 9 (*Burkholderia glumae*) degradaram esse substrato em 24 horas, como o padrão e somente o isolado 23 não foi capaz de degradar o diesel, os outros isolados analisados nesta placa foram eficientes na biodegradação do diesel.

A partir dos valores da absorbância medida ao longo de uma semana, o Gráfico 2 foi construído com base nos dados referentes ao tempo 0 hora e 168 horas para os três substratos analisados: naftaleno, fenantreno e diesel.

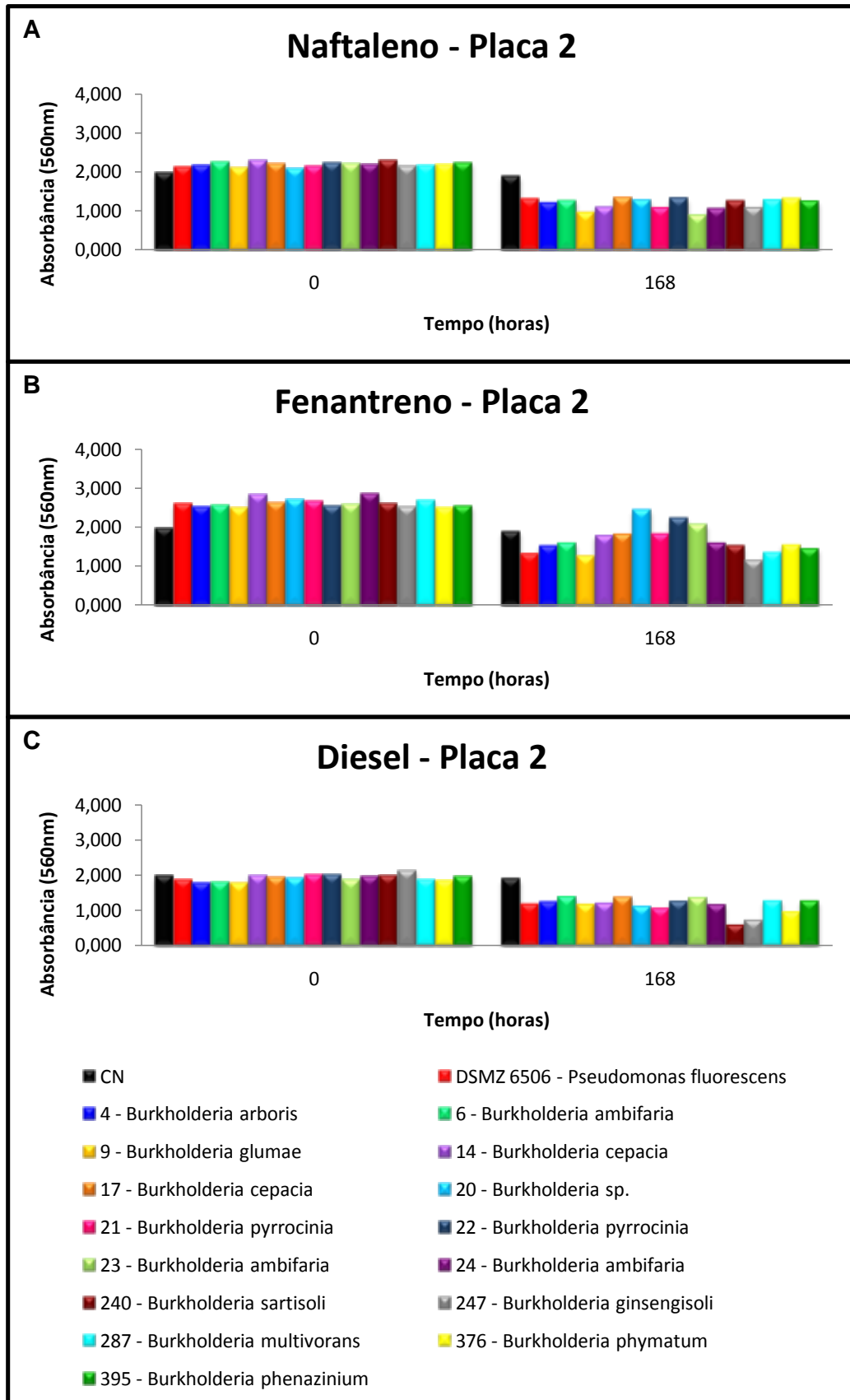


Gráfico 2. Variação da absorbância na biodegradação dos substratos no tempo 0h e 168 h para os isolados da Placa 2.

Nota-se, pelo Gráfico 2-A, que expressa a variação da absorbância para o naftaleno, que o único isolado em que o valor ficou acima do padrão foi o 17 (*B. cepacia*). Os isolados 22 (*B. pyrrocinia*) e 376 (*B. phymatum*) apresentaram valores praticamente idênticos ao padrão, enquanto que os outros isolados apresentaram absorbância menor que o padrão.

O Gráfico 2-B que expressa os dados da absorbância para o substrato fenantreno, observa-se que os isolados 9 (*Burkholderia glumae*) e 247 (*Burkholderia ginsengisoli*) apresentaram um valor inferior ao padrão, sendo mais eficientes na degradação desse substrato.

O Gráfico 2-C representa a variação da absorbância em 168 horas para o substrato diesel. O isolado 9 apresentou desempenho na degradação similar ao padrão e para os isolados 20, 21, 24, 240, 247 e 376 o valor da absorbância foi inferior ao padrão, sendo o isolado 240 (*Burkholderia sartisoli*) o que apresentou o menor valor da absorbância.

Os isolados utilizados na terceira placa estão descritos na Tabela 6, que também resume o tempo de degradação de cada isolado, para cada substrato, e sua origem. O teste foi registrado diariamente por uma semana, sendo representada na Figura 22.

Tabela 6 – Isolados utilizados no teste de biodegradação – Placa 3.

Isolado	Descrição	Origem	N	F	D
26	<i>Burkholderia tropica</i>	TPA Cal-Cap	-	-	168h
27	<i>Burkholderia ambifaria</i>	TPA Cal-Cap	-	-	48h
28	<i>Burkholderia cepacia</i>	TPA Cal-Cap	-	-	48h
29	<i>Burkholderia arboris</i>	TPA Cal-Cap	-	-	48h
41	<i>Burkholderia lata</i>	ADJ Cal-Cult	-	-	96h
43	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	ADJ Cal-Cult	-	-	72h
49	<i>Burkholderia unamae</i>	ADJ Cal-Cult	168h	168h	168h
59	<i>Burkholderia glumae</i>	ADJ Cal-Cult	144h	-	24h
85	<i>Burkholderia unamae</i>	ADJ Cal-Cap	-	-	24h
217	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	TPA Hatahara	-	-	24h
232	<i>Burkholderia caribensis</i>	TPA Mina-I	-	-	48h
252	<i>Burkholderia seminalis</i>	TPA Mina-I	-	-	48h
254	<i>Burkholderia sartisoli</i>	TPA Mina-I	72h	96h	48h
291	<i>Burkholderia gladioli</i>	TPA Mina-I	72h	72h	48h
396	<i>Burkholderia phenazinium</i>	TPA Mina-I	48h	-	48h

Legenda: N – naftaleno; F – fenantreno; D – diesel; (-) ausência de degradação.

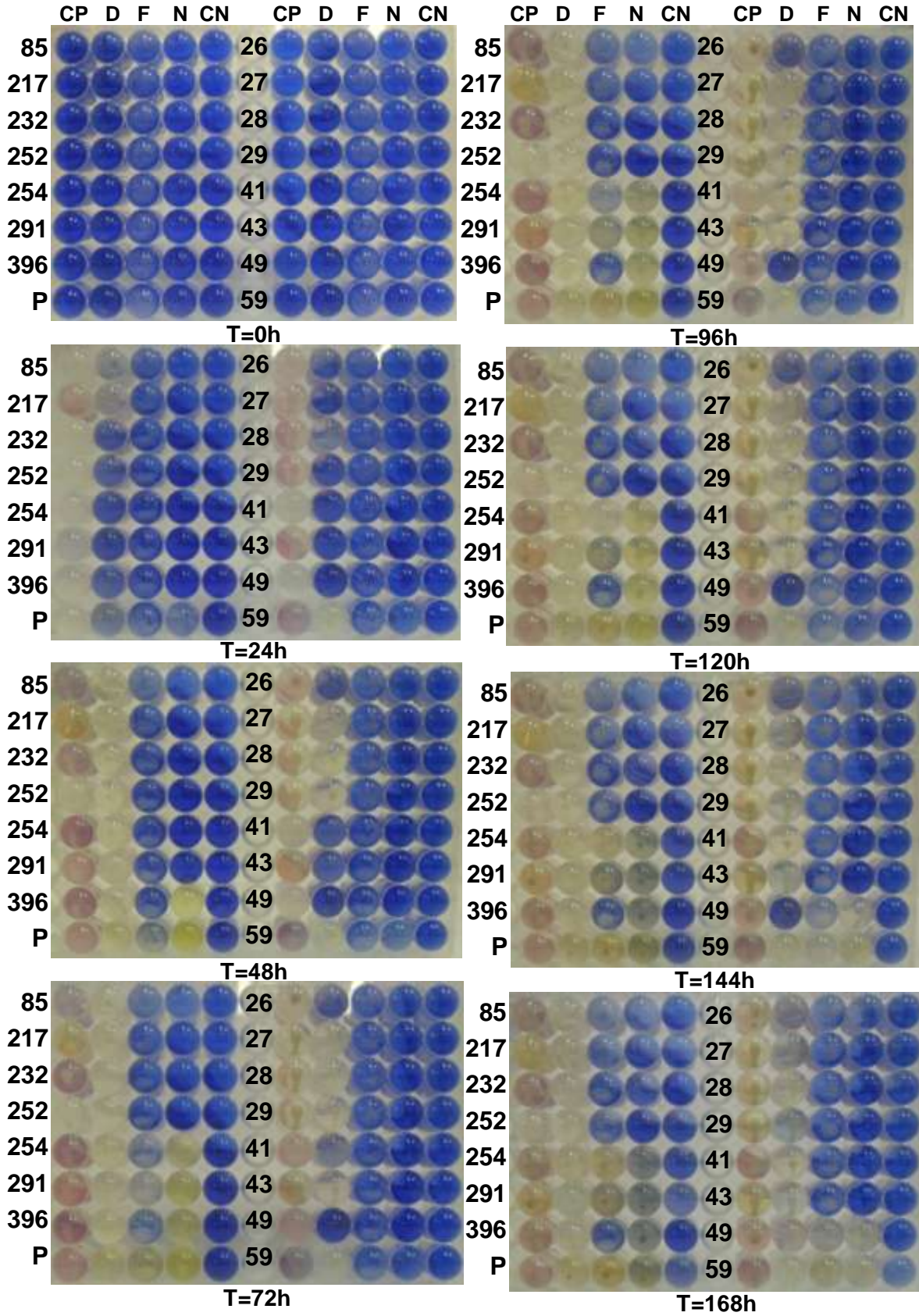


Figura 22. Teste de biodegradação referente à Placa 3 com isolados de *Burkholderia* e o padrão (P) analisados em uma semana. (CP – Controle Positivo, D - diesel, F – fenantreno, N – naftaleno, CN – Controle Negativo).

Pela análise visual da Placa 3, observa-se que todos os controles positivos ficaram incolores, revelando que os isolados foram capazes de utilizar a glicose como fonte de carbono, descolorindo o indicador DCPIP e que nenhum controle negativo foi descolorido, o que indica que nenhuma solução estava contaminada. O padrão DSMZ 6506 (*Pseudomonas fluorescens*) degradou o diesel e o naftaleno em 48 horas, já o fenantreno foi degradado em 72 horas.

Nessa placa, nota-se que cinco isolados foram capazes de utilizar o naftaleno como fonte de carbono para o crescimento celular, sendo eles 49 (*Burkholderia unamae*) e 59 (*B. glumae*), em 144 horas; 254 (*B. sartisoli*) e 291 (*B. gladioli*) em 72 horas e o isolado 396 (*B. phenazinium*) em 48 horas, sendo esse com desempenho similar ao padrão. Para o fenantreno, quatro isolados foram capazes de degradá-lo: 49 em 168 horas, 59 em 144 horas, 254 em 120 horas e 291 em 72 horas, sendo esse isolado apresentando desempenho na degradação do substrato igualmente ao padrão. Para o diesel, todos os isolados degradaram esse substrato, porém os isolados 28, 59, 85 e 217 foram mais rápidos na degradação que o padrão, que ocorreu em 24 horas.

A absorbância da Placa 3 foi medida diariamente e o Gráficos 3 expressa a variação da absorbância para os três substratos: naftaleno, fenantreno e diesel, medida em 0 hora e após 168 horas. Verifica-se que houve diminuição em todos os valores da absorbância para os três substratos.

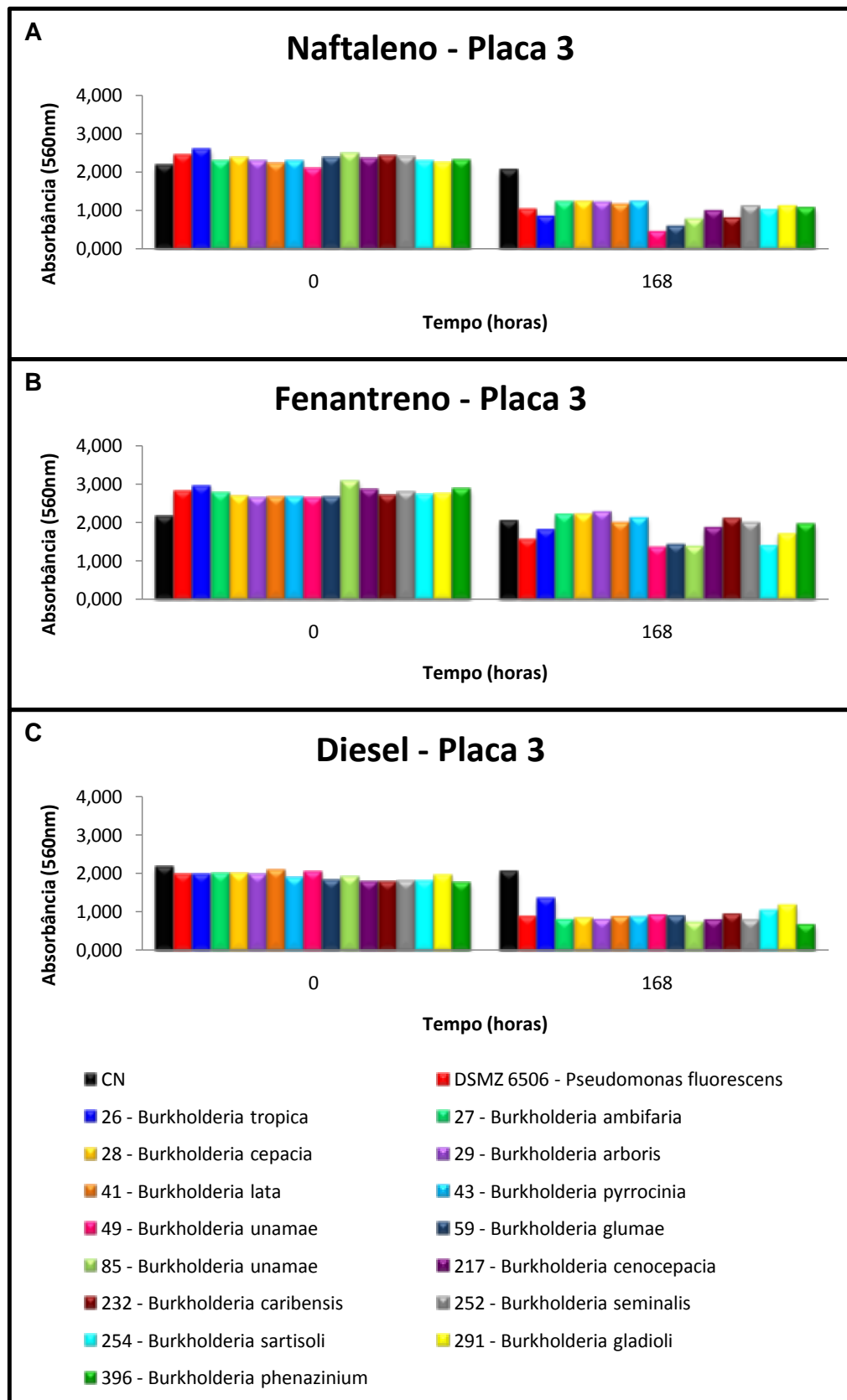


Gráfico 3. Variação da absorbância na biodegradação dos substratos no tempo 0 e 168h para os isolados da Placa 3.

O Gráfico 3-A, expressa a variação da absorvância medida no tempo 0 e 168 horas, referente ao substrato naftaleno, para os 15 isolados. Nota-se que, para os isolados 26; 49; 59; 85; 217 e 232 o valor da absorvância foi inferior ao do padrão.

No Gráfico 3-B, que representa a variação da absorvância para o fenantreno, observa-se que os isolados 49; 59; 85 e 254 apresentaram valores inferiores que o padrão DSMZ 6506. E para o diesel, Gráfico 3-C, os mais eficientes na degradação do substrato foram 27; 28; 29; 85; 217; 252 e 396.

Outros 15 isolados de *Burkholderia* foram utilizados na Placa 4 para o bioensaio de degradação dos substratos: diesel, fenantreno e naftaleno, no decorrer de uma semana, sendo que os valores da absorvância foram registrados diariamente e a placa foi fotografada (Figura 23). Esses isolados estão descritos na Tabela 7 que também resume a origem dos isolados e o tempo de degradação dos substratos.

Tabela 7 – Isolados utilizados no teste de biodegradação – Placa 4.

Isolado	Descrição	Origem	N	F	D
33	<i>Burkholderia cepacia</i>	TPA Cal-Cap	-	-	48h
39	<i>Burkholderia</i> sp.	TPA Cal-Cap	-	-	48h
44	<i>Burkholderia cepacia</i>	ADJ Cal-Cult	-	120h	48h
45	<i>Burkholderia ambifaria</i>	ADJ Cal-Cult	-	-	96h
79	<i>Burkholderia tropica</i>	ADJ Cal-Cap	-	-	96h
94	<i>Burkholderia seminalis</i>	TPA Mina-I	-	-	144h
249	<i>Burkholderia caribensis</i>	ADJ Mina-I	-	-	144h
257	<i>Burkholderia lata</i>	ADJ Hatahara	-	168h	72h
286	<i>Burkholderia glumae</i>	TPA Mina-I	-	-	24h
292	<i>Burkholderia lata</i>	TPA Mina-I	-	-	24h
293	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	TPA Mina-I	120h	-	48h
301	<i>Burkholderia seminalis</i>	ADJ Mina-I	-	-	48h
302	<i>Burkholderia gladioli</i>	ADJ Mina-I	144h	-	48h
352	<i>Burkholderia ginsengisoli</i>	ADJ Mina-I	120h	-	72h
356	<i>Burkholderia mimosarum</i>	ADJ Mina-I	120h	-	48h

Legenda: N – naftaleno; F – fenantreno; D – diesel; (-) ausência de degradação.

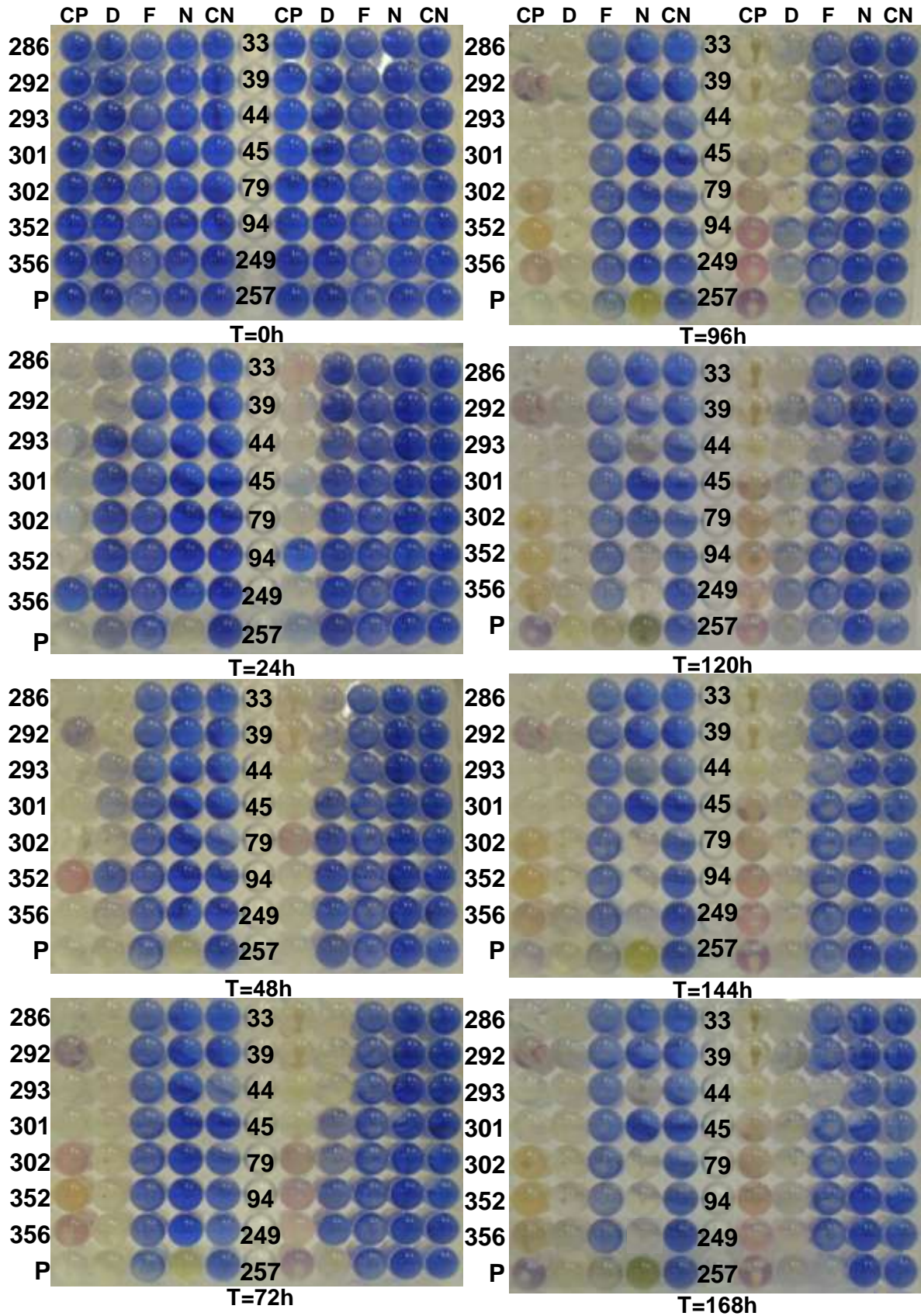


Figura 23. Teste de biodegradação referente à Placa 4 com isolados de *Burkholderia* e o padrão (P) analisados diariamente durante uma semana. (CP – Controle Positivo, D - diesel, F – fenantreno, N – naftaleno, CN – Controle Negativo).

Pela análise visual da Placa 4, pode-se observar que todos os controles positivos (CP) foram capazes de utilizar a glicose como fonte de crescimento celular, descolorindo, assim, o indicador DCPIP. Para os controles negativos (CN) nenhum sofreu descoloração, o que mostra que o bioensaio estava livre de contaminação. O padrão DSMZ 6506 (P) degradou o naftaleno em 24 horas. O substrato diesel foi degradado em 48 horas e para o fenantreno, por ser pouco solúvel e tóxico para as células bacterianas, a degradação foi em 120 horas.

Ao analisar os isolados de *Burkholderia*, nota-se que para o naftaleno, quatro isolados foram capazes de utilizar esse substrato como fonte de carbono, sendo eles: 293; 352; 356 em 120 horas e 302 em 144 horas, porém, nenhum foi mais eficiente que o padrão.

Para o substrato fenantreno, o isolado 44 foi capaz de metabolizar esse substrato em 120 horas, mesmo tempo que o padrão, e o isolado 257 degradou o substrato em 168 horas.

O diesel, por ter uma estrutura mais simples, foi metabolizado por um maior número de isolados, sendo que os isolados 286 e 292 foram mais eficientes que o padrão, pois o tempo de degradação foi de 24 horas. Os isolados 33, 39, 44, 293, 301, 302 e 356 degradaram o diesel em 48 horas, mesmo tempo que o padrão. No tempo de 72 horas, os isolados 257 e 352 degradaram esse substrato. Dois isolados degradaram o diesel em 96 horas, sendo eles 45 e 79. E em 144 horas, os isolados 94 e 249 degradaram esse substrato.

A absorvância da placa foi medida diariamente por uma semana e, a partir dos valores no tempo 0 hora e no tempo 168 horas o Gráfico 4 foi construído.

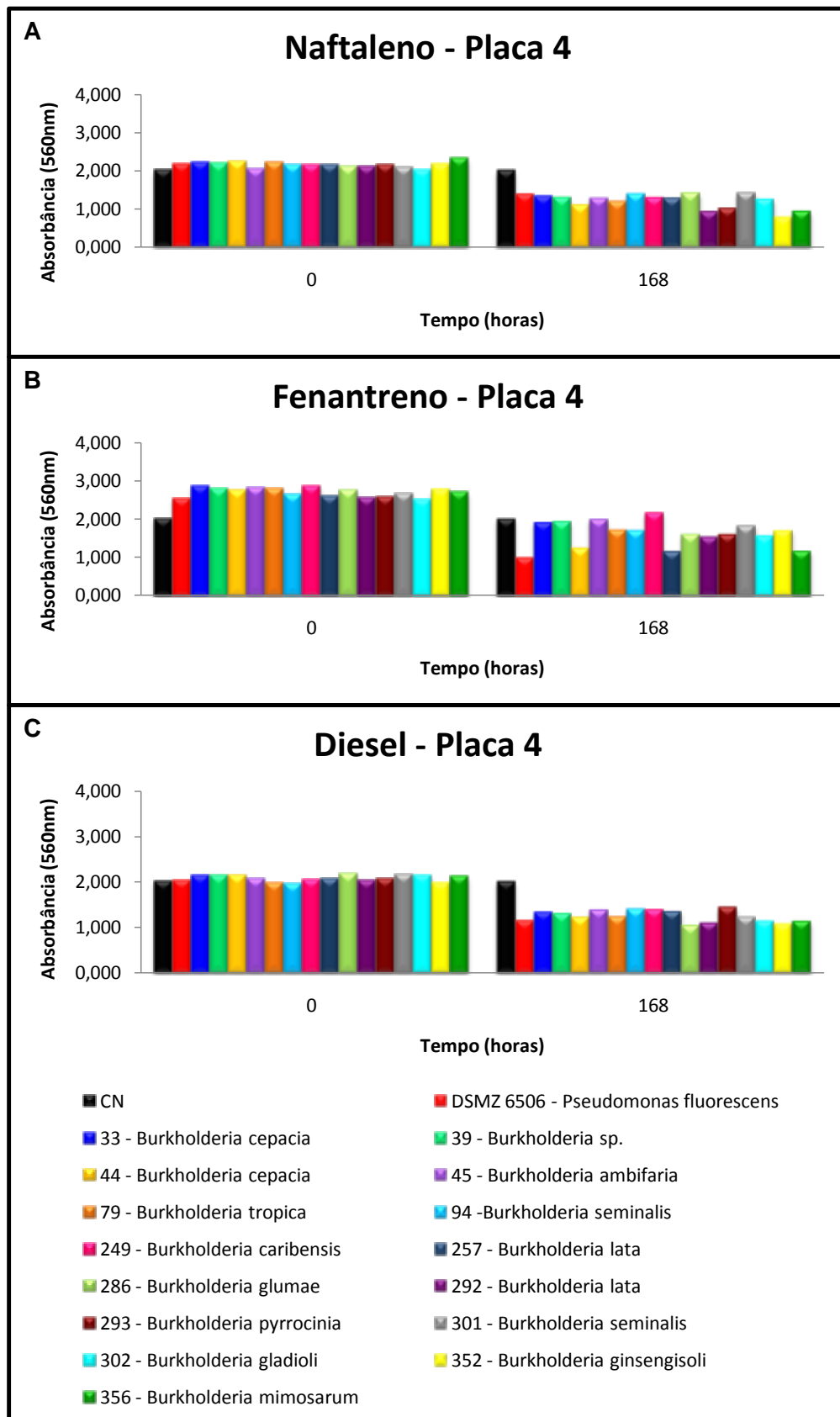


Gráfico 4. Variação da absorbância na biodegradação dos substratos no tempo 0 e 168 horas para os isolados da Placa 4.

Pelo Gráfico 4-A, que representa a variação da absorvância no bioensaio com o naftaleno, registrou-se que para todos os isolados houve diminuição dos valores, exceto para os isolados 94, que teve valor muito próximo do padrão e, para os isolados 286 e 301 que apresentaram valores acima do padrão.

O Gráfico 4-B que representa a variação da absorvância para o substrato fenantreno, observou-se que houve uma queda nos valores para todos os isolados, porém, nenhum foi menor que o padrão. Para o diesel, Gráfico 4-C, todos os valores foram menores depois de 168 horas de experimento e para os isolados 286, 292, 352 e 356 a absorvância foi menor do que o padrão.

Uma quinta placa foi preparada utilizando mais 15 isolados da coleção e estão descritos na Tabela 8, que também revela o local de origem desses isolados e um resumo do tempo de degradação de cada um dos substratos: naftaleno, fenantreno e diesel.

Tabela 8 – Isolados utilizados no teste de biodegradação – Placa 5.

Isolado	Descrição	Origem	N	F	D
34	<i>Burkholderia cepacia</i>	TPA Cal-Cap	-	-	-
36	<i>Burkholderia cepacia</i>	TPA Cal-Cap	-	-	-
40	<i>Burkholderia heleaia</i>	ADJ Cal-Cult	-	-	-
46	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	ADJ Cal-Cult	-	-	-
48	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	ADJ Cal-Cult	72h	48h	96h
50	<i>Burkholderia seminalis</i>	ADJ Cal-Cult	-	-	-
58	<i>Burkholderia ambifaria</i>	ADJ Cal-Cult	-	-	-
60	<i>Burkholderia seminalis</i>	ADJ Cal-Cult	-	-	-
236	<i>Burkholderia caribensis</i>	TPA Mina-I	-	168h	-
244	<i>Burkholderia glumae</i>	TPA Mina-I	168h	120h	48h
284	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	TPA Mina-I	-	168h	72h
300	<i>Burkholderia tropica</i>	TPA Mina-I	-	-	-
310	<i>Burkholderia gladioli</i>	ADJ Mina-I	-	168h	48h
392	<i>Burkholderia sartisoli</i>	TPA Mina-I	-	-	-
397	<i>Burkholderia ginsengisoli</i>	TPA Mina-I	-	-	-

Legenda: N – naftaleno; F – fenantreno; D – diesel; (-) ausência de degradação.

Diariamente a placa 5 foi fotografada e sua absorvância medida por espectrofotometria. A Figura 24 mostra o decorrer de uma semana (168h) para esse teste de biodegradação com os isolados descritos acima.

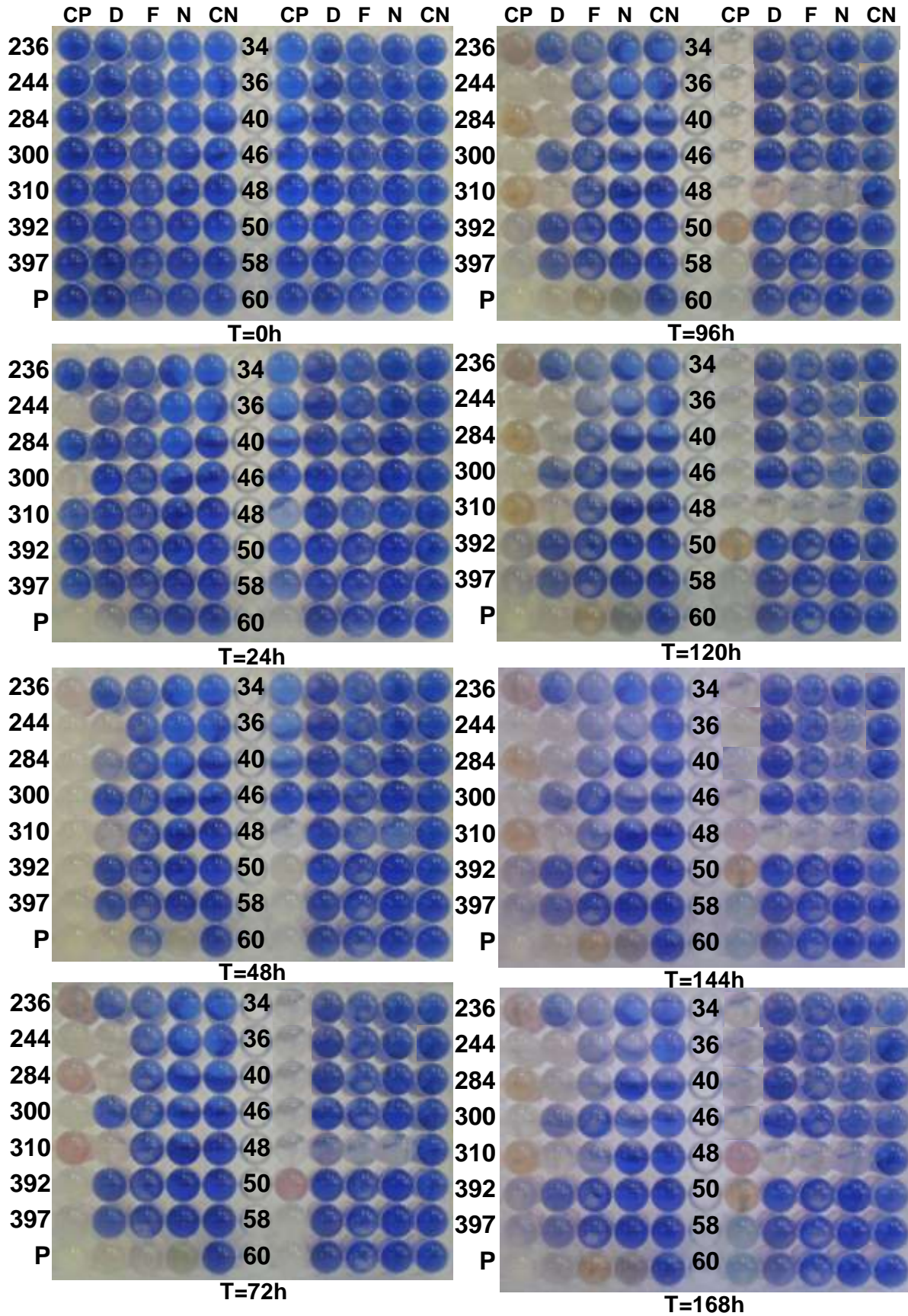


Figura 24. Teste de biodegradação referente à Placa 5 com isolados de *Burkholderia* e o padrão (P) analisados diariamente durante uma semana. (CP – Controle Positivo, D - diesel, F – fenantreno, N – naftaleno, CN – Controle Negativo).

Analisando a Figura 24, observa-se que todos os controles positivos ficaram incolores no decorrer de uma semana, visto que as células bacterianas consumiram a glicose e através desse metabolismo, gerou elétrons que se associaram ao indicador DCPIP, descolorindo-o. Para os controles negativos, o indicador não perdeu sua coloração, indicando que o teste foi realizado sem contaminação das soluções.

O padrão (*Pseudomonas fluorescens*) foi capaz de assimilar os três compostos: diesel (D) em 24 horas, fenantreno (F) em 72 horas e naftaleno (N) em 48 horas.

Para o substrato naftaleno, cinco isolados de *Burkholderia* foram capazes de degradar esse substrato: 48 em 72 horas; 36, 40 e 46 em 120 horas e 244 em 144 horas. Nenhum desses isolados foram mais eficiente, visualmente, que o padrão.

Para o substrato fenantreno, mais insolúvel e de difícil degradação, cinco isolados degradaram esse composto, sendo eles: 48 em 72 horas de experimento, mesmo tempo que o padrão utilizou para degradar esse substrato; 236 e 244, em 144 horas; e 284 e 310 em 168 horas.

O diesel foi degradado por quatro isolados apenas, sendo eles: 244 e 310 em 48 horas; 284 em 72 horas, os isolado 48 em 96 horas e os isolados 236, 300 e 397 em 168 horas.

A absorbância foi medida diariamente e o Gráfico 5 demonstra a variação dessa absorbância nos tempos 0 e 168 horas, para os três substratos: naftaleno, fenantreno e diesel.

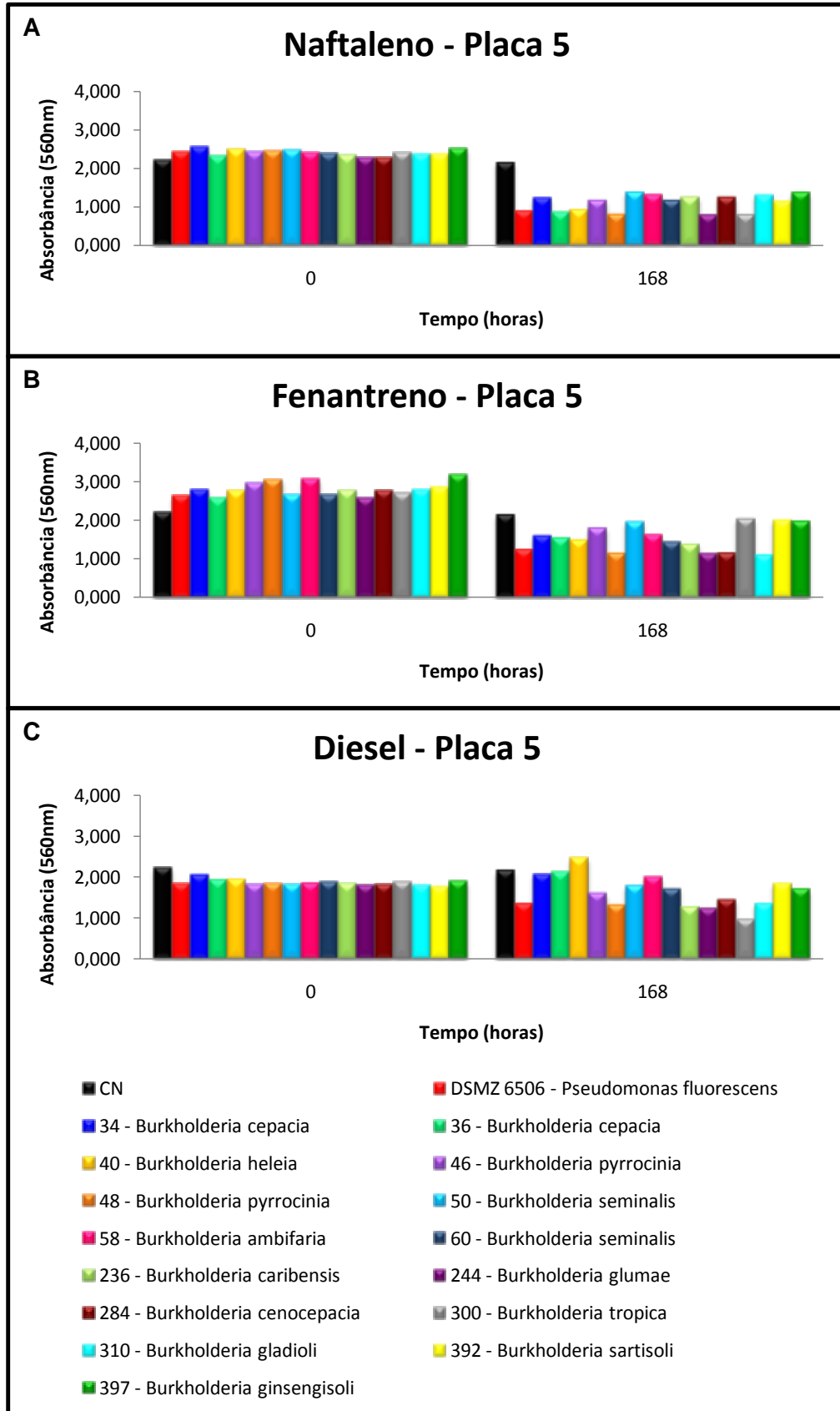


Gráfico 5. Variação da absorbância na biodegradação dos substratos no tempo 0 e 168 horas para os isolados da Placa 5.

Ao analisar o Gráfico 5-A, que representa a variação da absorvância no tempo 0 hora e 168 horas para o substrato naftaleno, observa-se que, para todos os isolados, o valor da absorvância diminuiu ao longo do experimento, comprovando a degradação desse substrato. Porém, para os isolados 36, 48, 244 e 300 o valor da absorvância foi menor do que o valor atingido pelo padrão.

Para o Gráfico 5-B, que representa os valores da absorvância para o substrato fenantreno, observa-se que para todos os isolados houve queda nos valores da absorvância no decorrer de uma semana e os isolados 48, 244, 284 e 310 apresentaram um valor abaixo do valor apresentado pelo padrão.

Os valores da absorvância obtido para o diesel estão expressos no Gráfico 5-C, nos tempos 0 e 168 horas. O valor da absorvância dos isolados 36, 40, 58 e 392 aumentou após 168 horas. Entretanto para o isolado 34, o valor permaneceu praticamente idêntico e para os outros isolados o valor diminuiu, porém, para os isolados 48, 236, 244 e 300 o valor da absorvância foi abaixo do valor obtido pelo padrão.

A sexta placa preparada para o teste de biodegradação contém os quinze isolados descritos na Tabela 9, que também descreve os sítios de origem desses isolados, bem como o resumo da biodegradação. A Figura 25 expressa o decorrer de uma semana para a Placa 6

Tabela 9 – Isolados utilizados no teste de biodegradação – Placa 6.

Isolado	Descrição	Origem	N	F	D
37	<i>Burkholderia cepacia</i>	TPA Cal-Cap	-	-	-
38	<i>Burkholderia cepacia</i>	TPA Cal-Cap	-	-	-
51	<i>Burkholderia arboris</i>	ADJ Cal-Cult	-	-	-
52	<i>Burkholderia</i> sp.	ADJ Cal-Cult	-	-	-
63	<i>Burkholderia ambifaria</i>	ADJ Cal-Cult	-	-	-
69	<i>Burkholderia ambifaria</i>	ADJ Cal-Cap	-	-	-
243	<i>Burkholderia caribensis</i>	TPA Mina-I	-	-	-
250	<i>Burkholderia lata</i>	ADJ Mina-I	-	-	-
251	<i>Burkholderia glumae</i>	ADJ Mina-I	-	-	48h
256	<i>Burkholderia glumae</i>	TPA Hatahara	-	-	48h
288	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	TPA Mina-I	-	-	48h
314	<i>Burkholderia gladioli</i>	ADJ Mina-I	-	-	144h
401	<i>Burkholderia ginsengisoli</i>	TPA Mina-I	-	-	-
443	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	ADJ Mina-I	-	-	72h
450	<i>Burkholderia</i> sp.	TPA Mina-I	-	120h	48h

Legenda: N – naftaleno; F – fenantreno; D – diesel; (-) ausência de degradação.

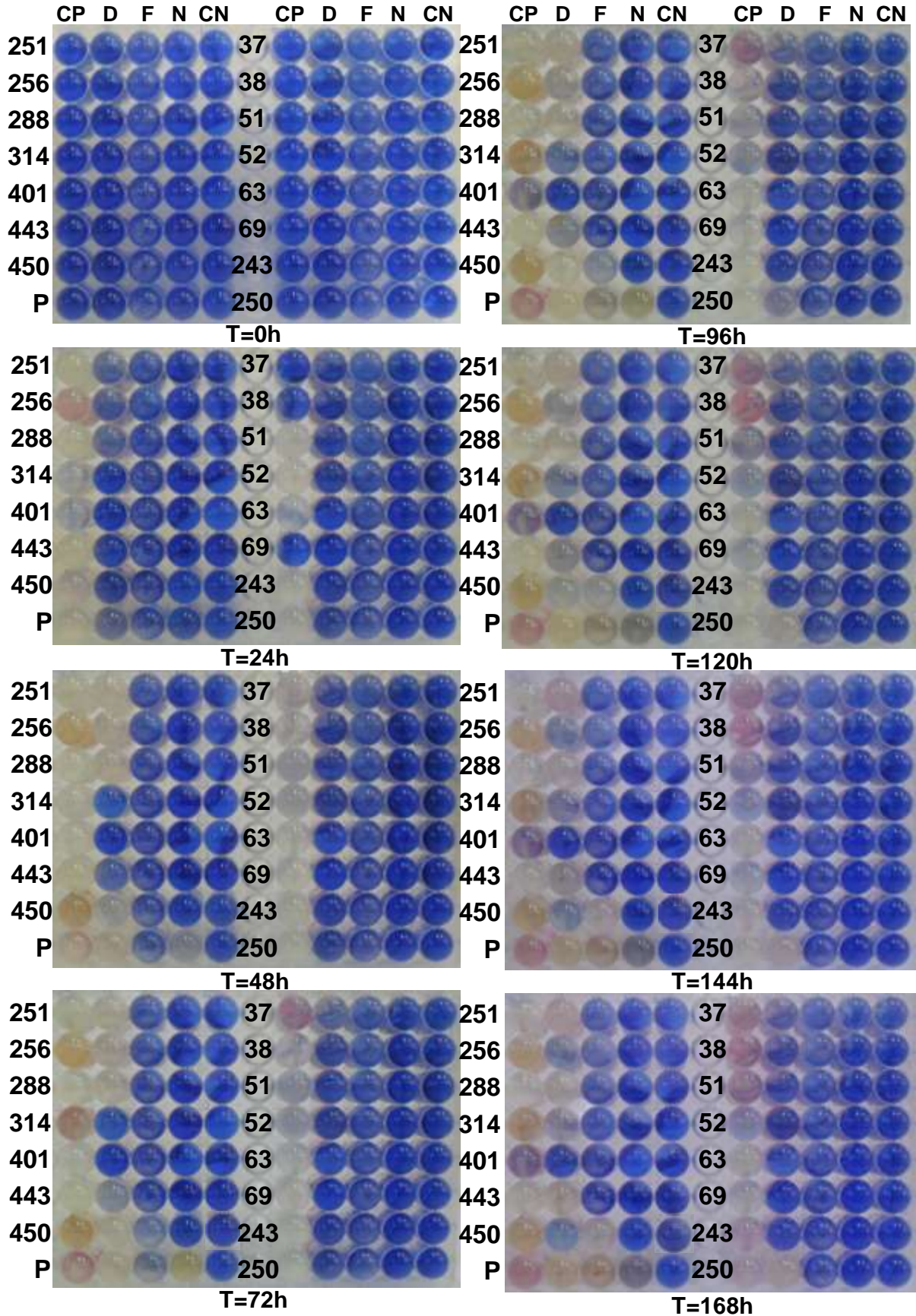


Figura 25. Teste de biodegradação referente à Placa 6 com isolados de *Burkholderia* e o padrão (P) analisados diariamente durante uma semana (168h). (CP – Controle Positivo, D - diesel, F – fenantreno, N – naftaleno, CN – Controle Negativo).

Ao analisar visualmente a Placa 6, verificou-se que todos os controles positivos (CP) sofreram descoloração de azul para incolor no decorrer de 168 horas. Isso demonstra que todos os isolados tinham células viáveis para a realização do teste de biodegradação e que utilizaram a glicose como fonte de carbono. Todos os controles negativos (CN) da placa 6 não sofreram descoloração, comprovando a ausência de contaminantes no teste.

Desses isolados, nenhum foi capaz de degradar o naftaleno. Para o substrato fenantreno, somente o isolado 450 utilizou esse substrato como fonte de carbono. Para o diesel, sete isolados foram capazes de degradar esse substrato, sendo eles: 251; 256; 288 e 450 degradaram o diesel em 48 horas, tempo similar ao padrão. O isolado 443 degradou o substrato em 72 horas e os isolados 250 e 314 degradaram o diesel em 96 horas.

O Gráfico 6 expressa a variação dos valores obtidos da absorbância no decorrer de 168 horas para os três substratos: naftaleno, fenantreno e diesel.

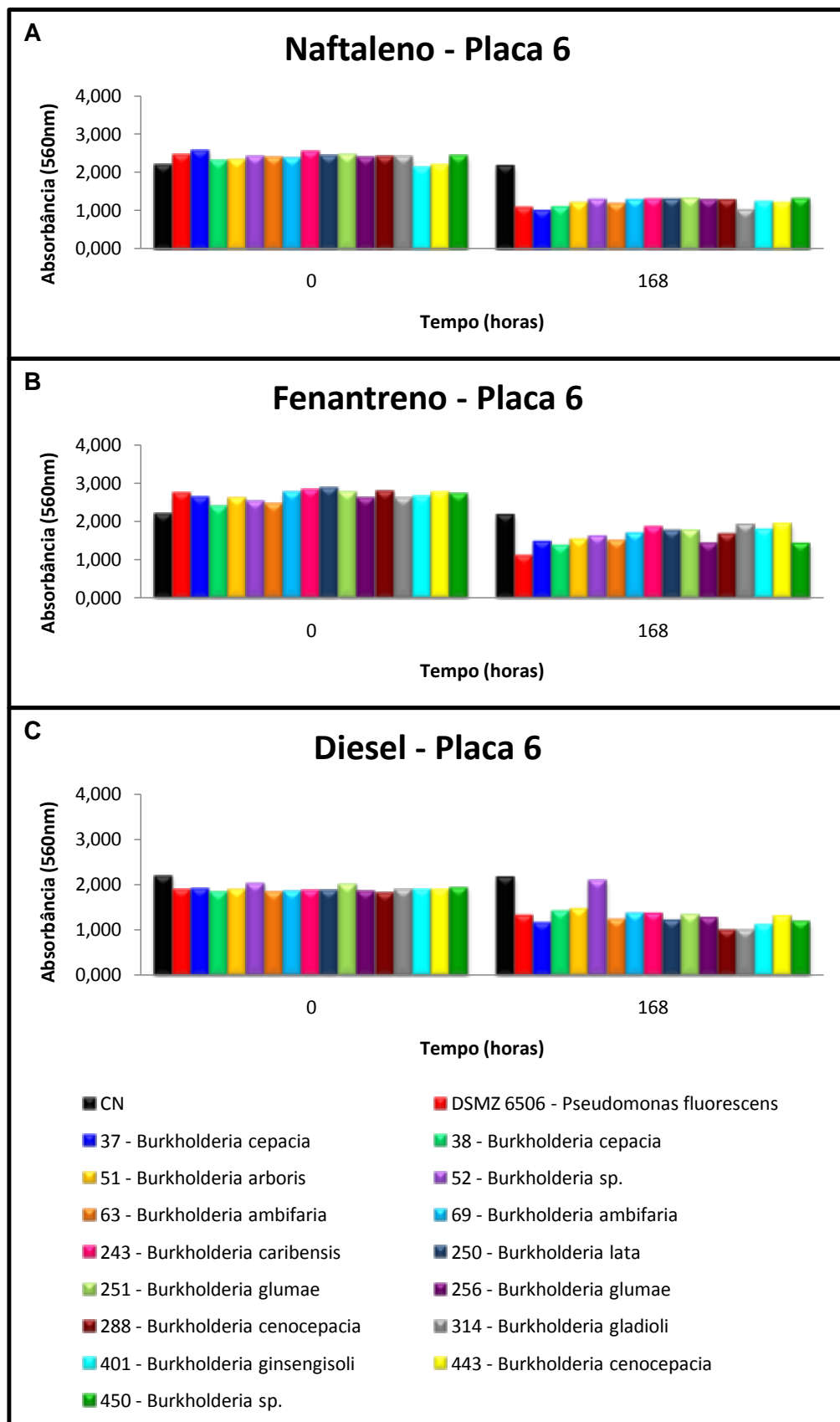


Gráfico 6. Variação da absorbância na biodegradação dos substratos no tempo 0 e 168 horas para os isolados da Placa 6.

O Gráfico 6-A que expressa a variação dos valores da absorbância para o substrato naftaleno, em 168 horas de experimento, mostra que para todos os isolados houve diminuição nos valores da absorbância após 168 horas e para os isolados 37 e 314, esse valor foi inferior que o valor atingido pelo padrão.

O Gráfico 6-B representa os valores da absorbância para o substrato fenantreno, e para todos os isolados, houve queda nos valores após 168 horas.

O Gráfico 6-C expressa os valores da absorbância medida ao longo de 168 horas para o substrato diesel e constata-se que para todos os isolados o valor diminuiu, exceto para o isolado 52, que houve aumento nesse valor.

A Placa 7 foi preparada para o teste e os isolados utilizados estão descritos na Tabela 10. A Figura 26 representa fotograficamente a diminuição da cor do indicador DCPIP no decorrer de 168 horas de experimento.

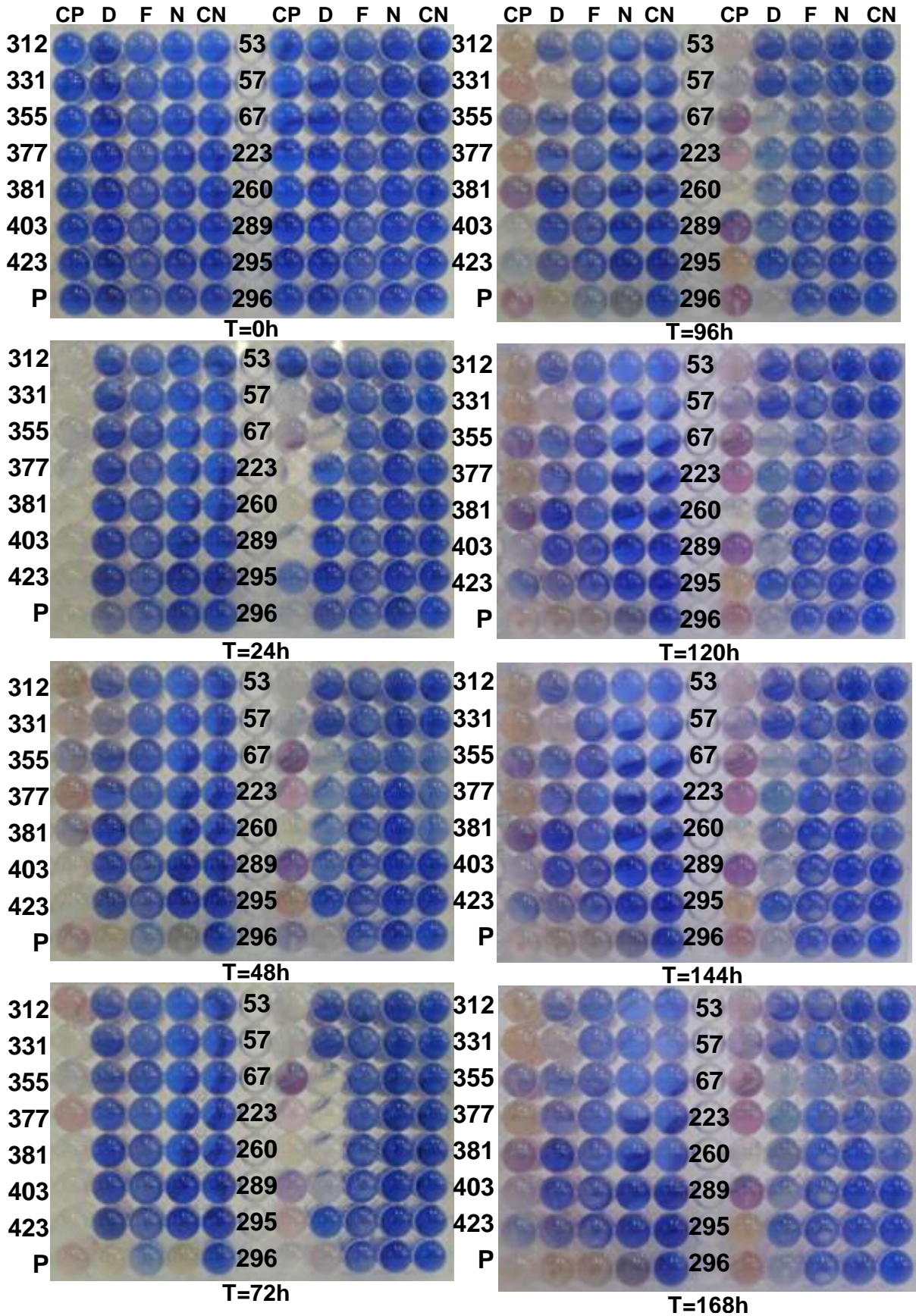


Figura 26. Teste de biodegradação referente à Placa 7 com isolados de *Burkholderia* e o padrão (P) analisados diariamente durante uma semana (168h). (CP – Controle Positivo, D - diesel, F – fenantreno, N – naftaleno, CN – Controle Negativo).

Visualmente, para todos os controles positivos (CP) da Placa 7 foram descoloridos, devido ao consumo de glicose pelos isolados. Para os controles negativos (CN) não houve descoloração. O padrão DSMZ 6506 degradou o naftaleno e o diesel em 48 horas de experimento, enquanto para o fenantreno, o tempo de degradação foi de 120 horas.

Dos 15 isolados utilizados nesta placa, somente o isolado 67 foi capaz de degradar o naftaleno e o fenantreno, em 168 horas. Esse mesmo isolado foi mais eficiente na degradação do diesel que o padrão, sendo o tempo de degradação de 24 horas. Outros isolados que degradaram o diesel foram: 296 em 48 horas; 223; 260 e 289 em 72 horas e o isolado 331 em 96 horas.

Tabela 10 – Isolados utilizados no teste de biodegradação – Placa 7.

Isolado	Descrição	Origem	N	F	D
53	<i>Burkholderia</i> sp.	ADJ Cal-Cult	-	-	-
57	<i>Burkholderia seminalis</i>	ADJ Cal-Cult	-	-	-
67	<i>Burkholderia cepacia</i>	ADJ Cal-Cap	168h	168h	24h
223	<i>Burkholderia seminalis</i>	TPA Hatahara	-	-	72h
260	<i>Burkholderia glumae</i>	ADJ Hatahara	-	-	72h
289	<i>Burkholderia lata</i>	TPA Mina-I	-	-	72h
295	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	TPA Mina-I	-	-	-
296	<i>Burkholderia lata</i>	TPA Mina-I	-	-	48h
312	<i>Burkholderia tropica</i>	ADJ Mina-I	-	-	-
331	<i>Burkholderia caribensis</i>	ADJ Mina-I	-	-	96h
355	<i>Burkholderia tropica</i>	ADJ Mina-I	-	-	-
377	<i>Burkholderia ambifaria</i>	TPA Mina-I	-	-	-
381	<i>Burkholderia caribensis</i>	TPA Mina-I	-	-	-
403	<i>Burkholderia sartisoli</i>	TPA Mina-I	-	-	-
423	<i>Burkholderia ginsengisoli</i>	ADJ Mina-I	-	-	-

Legenda: N – naftaleno; F – fenantreno; D – diesel; (-) ausência de degradação.

Diariamente a absorvância da Placa 7 foi medida e a partir desses dados, o Gráfico 7 foi construído, expressando a variação da absorvância no tempo 0 e 168 horas para os três substratos: naftaleno, fenantreno e diesel.

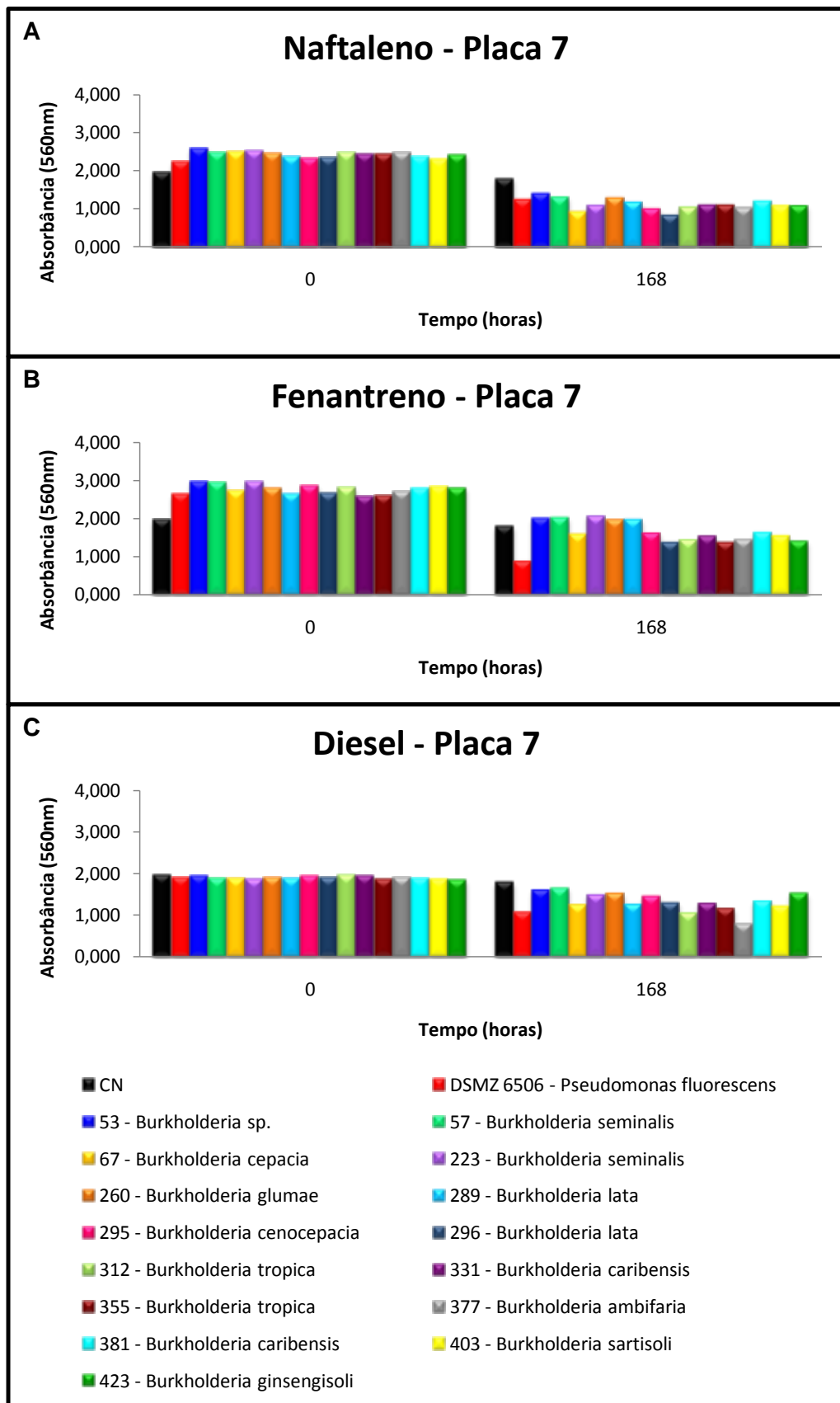


Gráfico 7. Variação da absorbância na biodegradação dos substratos no tempo 0 e 168 horas para os isolados da Placa 7.

Pela análise do Gráfico 7-A, que representa a variação da absorbância para o substrato naftaleno, observa-se que para todos os isolados houve uma queda no valor da absorbância. Somente os isolados 53, 57 e 260 tiveram o valor acima do valor do padrão.

O Gráfico 7-B analisa os valores da absorbância para o substrato fenantreno, nota-se que para todos os isolados os valores ficaram abaixo após 168 horas de experimento, porém nenhum isolado teve valor inferior ao padrão.

O Gráfico 7-C representa a variação da absorbância para o diesel, nota-se que para todos os isolados houve diminuição no valor da absorbância, porém o isolado 377 teve valor inferior ao padrão e o isolado 312 teve valor muito similar ao valor atingido pelo padrão.

A Placa 8 foi registrada diariamente por uma semana, como mostra a Figura 27. A descoloração do indicador DCPIP (azul para incolor) indica que o substrato utilizado foi degradado. Os isolados utilizados nessa placa estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11 – Isolados utilizados no teste de biodegradação – Placa 8.

Isolado	Descrição	Origem	N	F	D
61	<i>Burkholderia lata</i>	ADJ Cal-Cult	-	-	-
68	<i>Burkholderia</i> sp.	ADJ Cal-Cap	-	-	-
72	<i>Burkholderia</i> sp.	ADJ Cal-Cap	-	-	-
290	<i>Burkholderia glumae</i>	TPA Mina-I	-	-	72h
298	<i>Burkholderia arboris</i>	TPA Mina-I	-	-	72h
299	<i>Burkholderia lata</i>	TPA Mina-I	-	-	96h
304	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	ADJ Mina-I	-	-	48h
306	<i>Burkholderia cepacia</i>	ADJ Mina-I	-	-	72h
311	<i>Burkholderia cepacia</i>	ADJ Mina-I	-	-	72h
318	<i>Burkholderia lata</i>	ADJ Mina-I	-	-	72h
325	<i>Burkholderia cepacia</i>	ADJ Mina-I	-	-	48h
357	<i>Burkholderia tropica</i>	ADJ Mina-I	-	-	-
361	<i>Burkholderia tropica</i>	ADJ Mina-I	120h	-	-
385	<i>Burkholderia caribensis</i>	TPA Mina-I	96h	-	-
387	<i>Burkholderia caribensis</i>	TPA Mina-I	-	-	-

Legenda: N – naftaleno; F – fenantreno; D – diesel; (-) ausência de degradação.

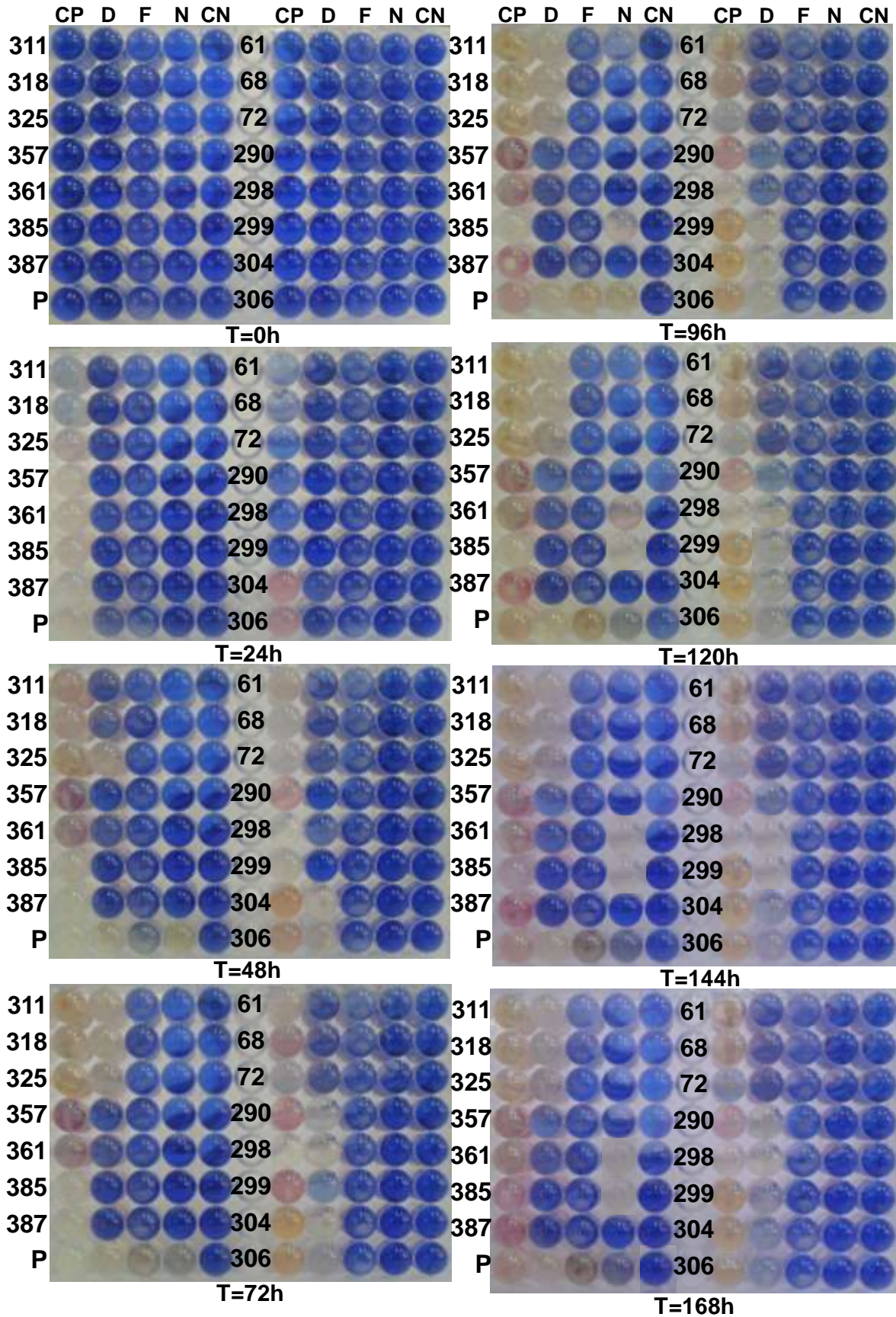


Figura 27. Teste de biodegradação referente à Placa 8 com isolados de *Burkholderia* e o padrão (P) analisados diariamente durante uma semana (168h). (CP – Controle Positivo, D - diesel, F – fenantreno, N – naftaleno, CN – Controle Negativo).

Analisando a Placa 8, observa-se que todos os controles positivos (CP) perderam a coloração, devido ao fato de que as células dos isolados foram capazes de utilizar a glicose presente na solução e ocorreu a liberação de elétrons que reduziram o indicador DCPIP, descolorindo-o. Para os controles negativos (CN) nenhum teste sofreu descoloração, verificando que o teste estava sem contaminação. O padrão (P) – *Pseudomonas fluorescens* degradou o naftaleno (N) e o diesel (D) em 48 horas e para o substrato fenantreno (F) a degradação ocorreu em 72 horas.

Os isolados 361 e 385 foram os únicos que degradaram o substrato naftaleno, em 120 e 96 horas, respectivamente. O substrato fenantreno não foi degradado por nenhum isolado desta placa, possivelmente por ser pouco solúvel e mais tóxico que os outros substratos.

O diesel foi o substrato metabolizado por um número maior de isolados entre eles: 304, 306 e 325 em 48 horas, tempo similar ao obtido pelo padrão; 290, 298, 311 e 318 em 72 horas e o isolado 299 que degradou o diesel em 96 horas.

A absorbância da placa foi medida diariamente por uma semana e a partir desses valores, o Gráfico 8 foi construído para cada substrato no tempo 0 e 168 horas.

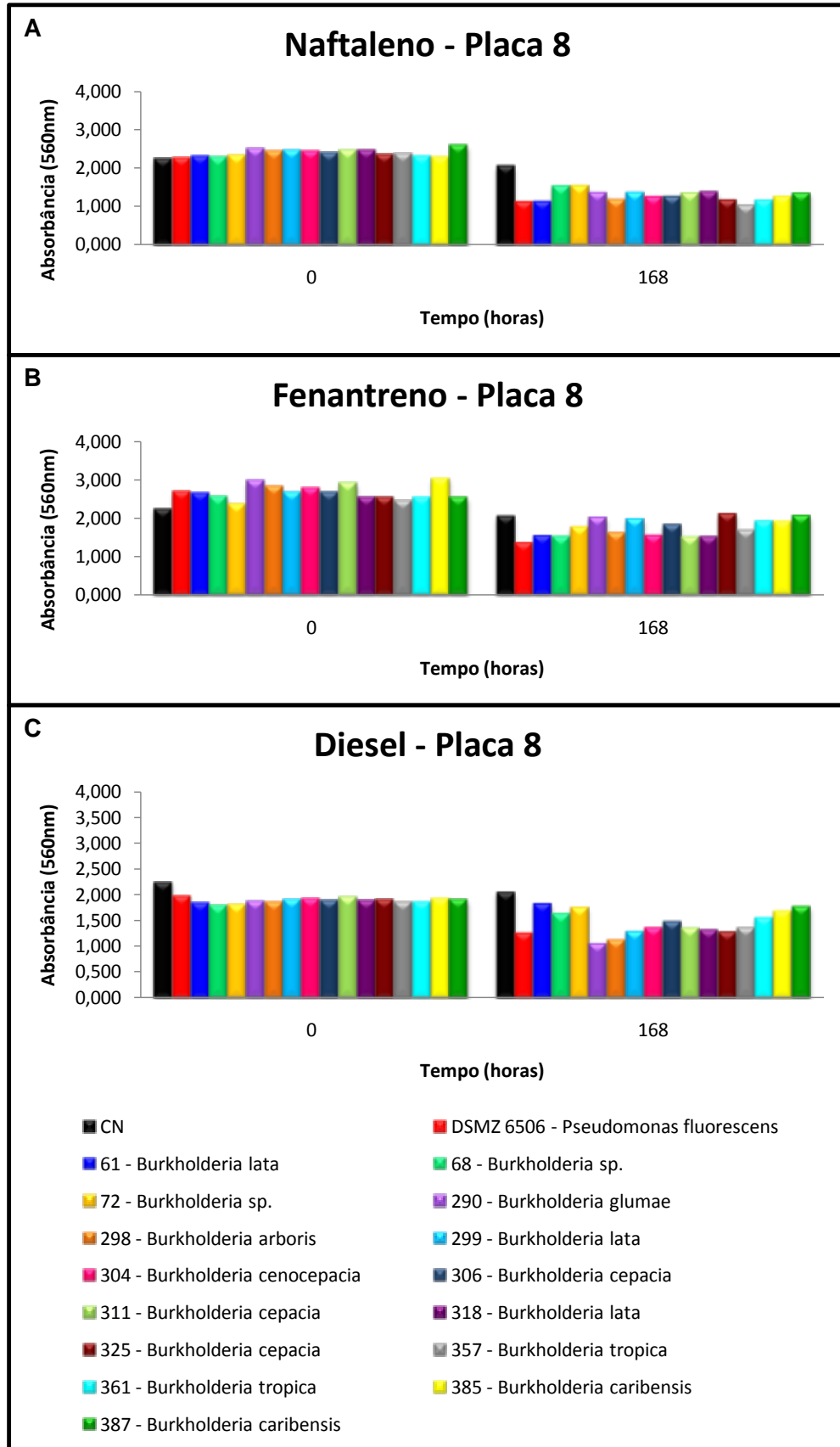


Gráfico 8. Variação da absorbância na biodegradação dos substratos no tempo 0 e 168 horas para os isolados da Placa 8.

O Gráfico 8-A expressa os valores da absorvância no tempo 0 e 168 horas, referente ao substrato naftaleno. Para todos os isolados houve queda nos valores da absorvância e somente o isolado 357 apresentou valores abaixo que o padrão.

Para o substrato fenantreno, Gráfico 8-B, todos os isolados tiveram seus valores de absorvância diminuídos, mas nenhum abaixo do padrão. Para o diesel, Gráfico 8-C, todos os isolados também apresentaram queda nos valores da absorvância, porém os isolados 290 e 298 apresentaram valores abaixo que o padrão.

A nona placa preparada para o teste de biodegradação contém os 15 isolados descritos na Tabela 12 que também expressa a origem desses isolados e um resumo do teste de biodegradação. Por outro lado, a Figura 28 mostra a evolução do experimento da descoloração do DCPIP da Placa 9 no decorrer de 168 horas.

Tabela 12 – Isolados utilizados no teste de biodegradação – Placa 9.

Isolado	Descrição	Origem	N	F	D
74	<i>Burkholderia lata</i>	ADJ Cal-Cap	-	-	168h
237	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	TPA Mina-I	-	-	168h
308	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	ADJ Mina-I	-	-	48h
309	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	ADJ Mina-I	-	-	48h
315	<i>Burkholderia lata</i>	ADJ Mina-I	-	-	48h
322	<i>Burkholderia glumae</i>	ADJ Mina-I	-	-	72h
324	<i>Burkholderia arboris</i>	ADJ Mina-I	-	-	72h
326	<i>Burkholderia glumae</i>	ADJ Mina-I	-	-	72h
353	<i>Burkholderia lata</i>	ADJ Mina-I	-	-	120h
370	<i>Burkholderia cepacia</i>	ADJ Mina-I	-	-	120h
388	<i>Burkholderia seminalis</i>	TPA Mina-I	-	-	-
389	<i>Burkholderia caribensis</i>	TPA Mina-I	-	-	-
400	<i>Burkholderia cepacia</i>	TPA Mina-I	-	-	48h
412	<i>Burkholderia tropica</i>	ADJ Mina-I	-	-	168h
413	<i>Burkholderia tropica</i>	ADJ Mina-I	-	-	-

Legenda: N – naftaleno; F – fenantreno; D – diesel; (-) ausência de degradação.

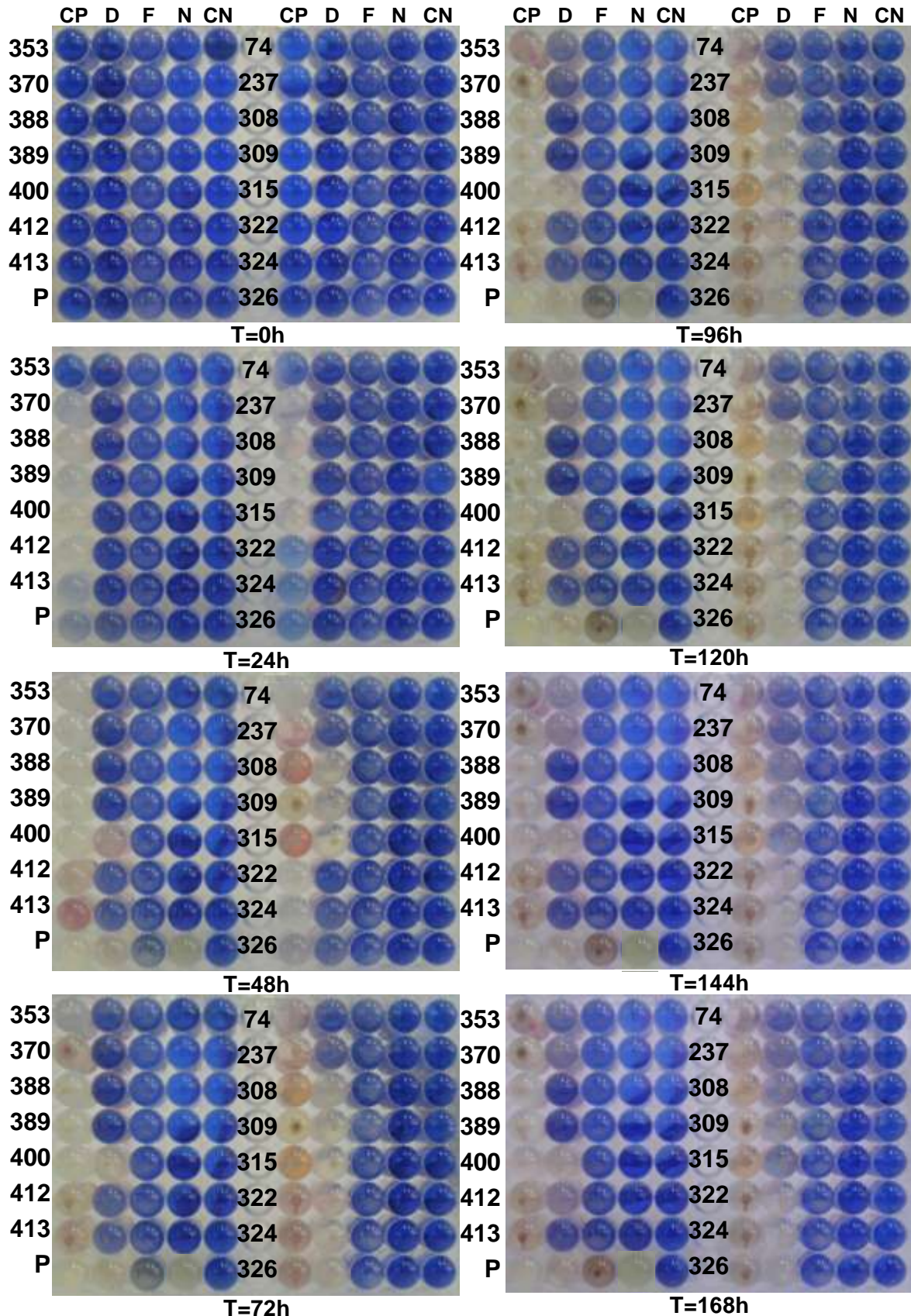


Figura 28. Teste de biodegradação referente à Placa 9 com isolados de *Burkholderia* e o padrão (P) analisados diariamente durante uma semana (168h). (CP – Controle Positivo, D - diesel, F – fenantreno, N – naftaleno, CN – Controle Negativo).

Na análise da Placa 9, observa-se que todos os controles positivos, que tem como fonte de carbono a glicose, teve o indicador DCPIP descolorido, confirmando que as células bacterianas estavam ativas para o bioensaio. Os controles negativos não foram degradados, concluindo que a placa não foi contaminada e que o indicador DCPIP não sofre descoloração via ambiente. O padrão (P) DSMZ 6506 degradou o diesel e o naftaleno em 48 horas e o fenantreno em 96 horas.

Nenhum dos isolados foram capazes de utilizar, como fonte de carbono para o crescimento celular, o naftaleno e o fenantreno.

Para o substrato diesel, em 48 horas de experimento os isolados 308, 309, 315 e 400 conseguiram degradar esse substrato, utilizando-o como fonte de carbono. Os isolados 322, 324 e 326 degradaram o diesel em 72 horas, os isolados 353 e 370 em 120 horas e em 168 horas, os isolados 237 e 412 degradaram o substrato.

A absorbância foi medida diariamente da placa por uma semana e o Gráfico 9 expressa a variação no tempo 0 e 160 horas para cada substrato.

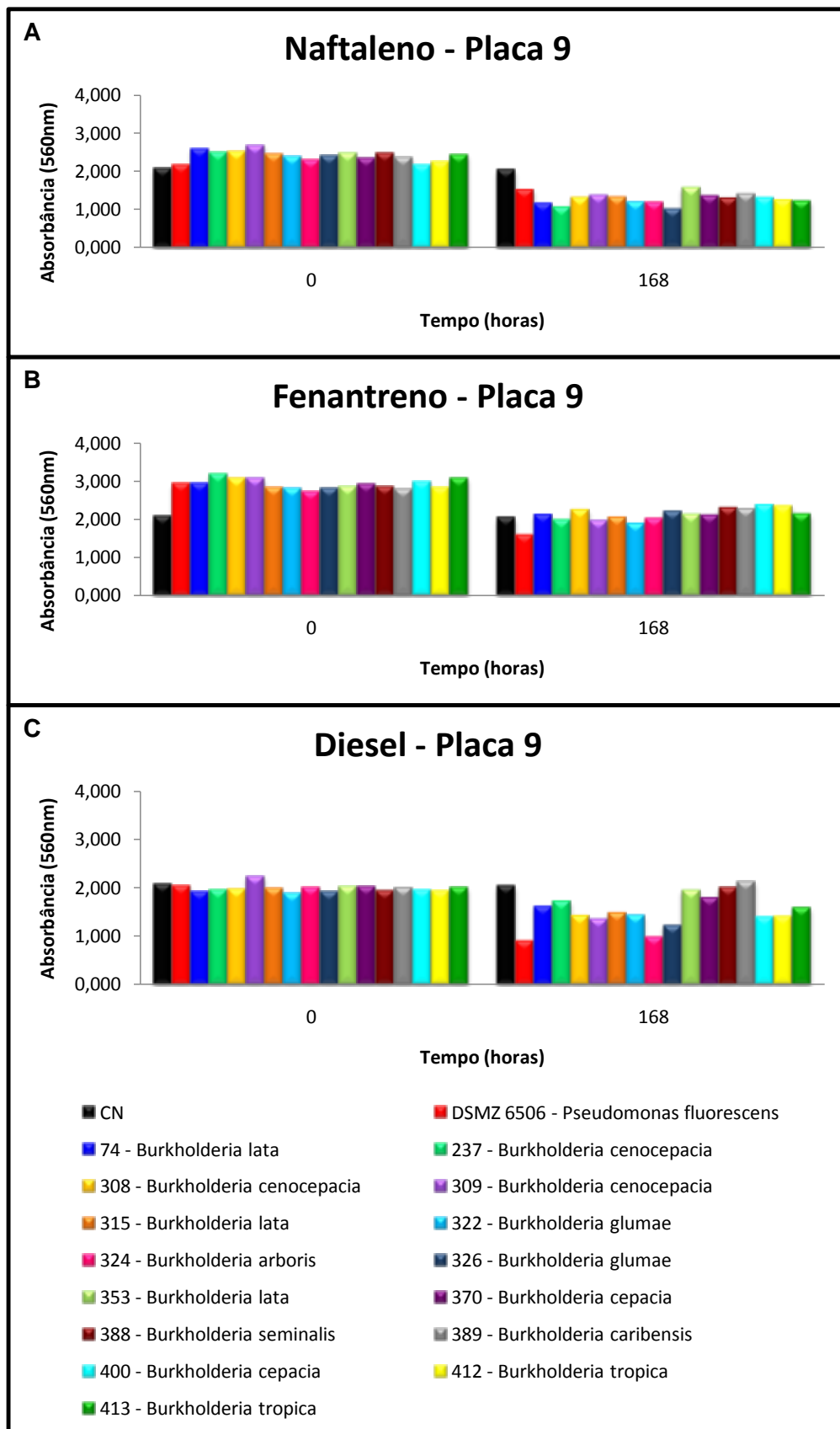


Gráfico 9. Variação da absorbância na biodegradação dos substratos no tempo 0 e 168 horas para os isolados da Placa 9.

A partir da análise do Gráfico 9-A, que representa a variação da absorvância para o substrato naftaleno, percebe-se uma queda nos valores para todos os isolados e também o valor é inferior ao atingido pelo padrão, exceto para o isolado 353.

O Gráfico 9-B representa a variação da absorvância para o substrato fenantreno e nota-se que para todos os isolados os valores diminuíram, porém nenhum abaixo do padrão.

O Gráfico 9-C representa a variação para o substrato diesel e os valores da absorvância para os isolados 388 e 389 aumentaram em 168 horas, visto que eles não conseguiram degradar o diesel, para os outros isolados o valor diminuiu, mas nenhum abaixo do valor do padrão.

A Placa 10 utilizou os isolados, para o teste de biodegradação dos substratos, descritos na Tabela 13. Essa tabela também apresenta a sítios de origem desses isolados e o resumo da biodegradação.

Tabela 13 – Isolados utilizados no teste de biodegradação – Placa 10.

Isolado	Descrição	Origem	N	F	D
321	<i>Burkholderia lata</i>	ADJ Mina-I	-	-	48h
323	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	ADJ Mina-I	-	-	48h
327	<i>Burkholderia glumae</i>	ADJ Mina-I	-	-	72h
328	<i>Burkholderia arboris</i>	ADJ Mina-I	-	-	48h
329	<i>Burkholderia seminalis</i>	ADJ Mina-I	-	-	72h
330	<i>Burkholderia lata</i>	ADJ Mina-I	-	-	48h
351	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	TPA Mina-I	-	-	72h
354	<i>Burkholderia seminalis</i>	ADJ Mina-I	-	-	168h
369	<i>Burkholderia arboris</i>	ADJ Mina-I	-	-	48h
409	<i>Burkholderia cepacia</i>	ADJ Mina-I	-	-	72h
415	<i>Burkholderia tropica</i>	ADJ Mina-I	-	-	168h
416	<i>Burkholderia tropica</i>	ADJ Mina-I	-	-	120h
430	<i>Burkholderia caribensis</i>	ADJ Mina-I	-	-	-
431	<i>Burkholderia caribensis</i>	ADJ Mina-I	-	-	72h
445	<i>Burkholderia cepacia</i>	ADJ Mina-I	-	-	96h

Legenda: N – naftaleno; F – fenantreno; D – diesel; (-) ausência de degradação.

A Figura 29 apresenta a evolução da degradação dos três substratos pelos isolados da Placa 10.

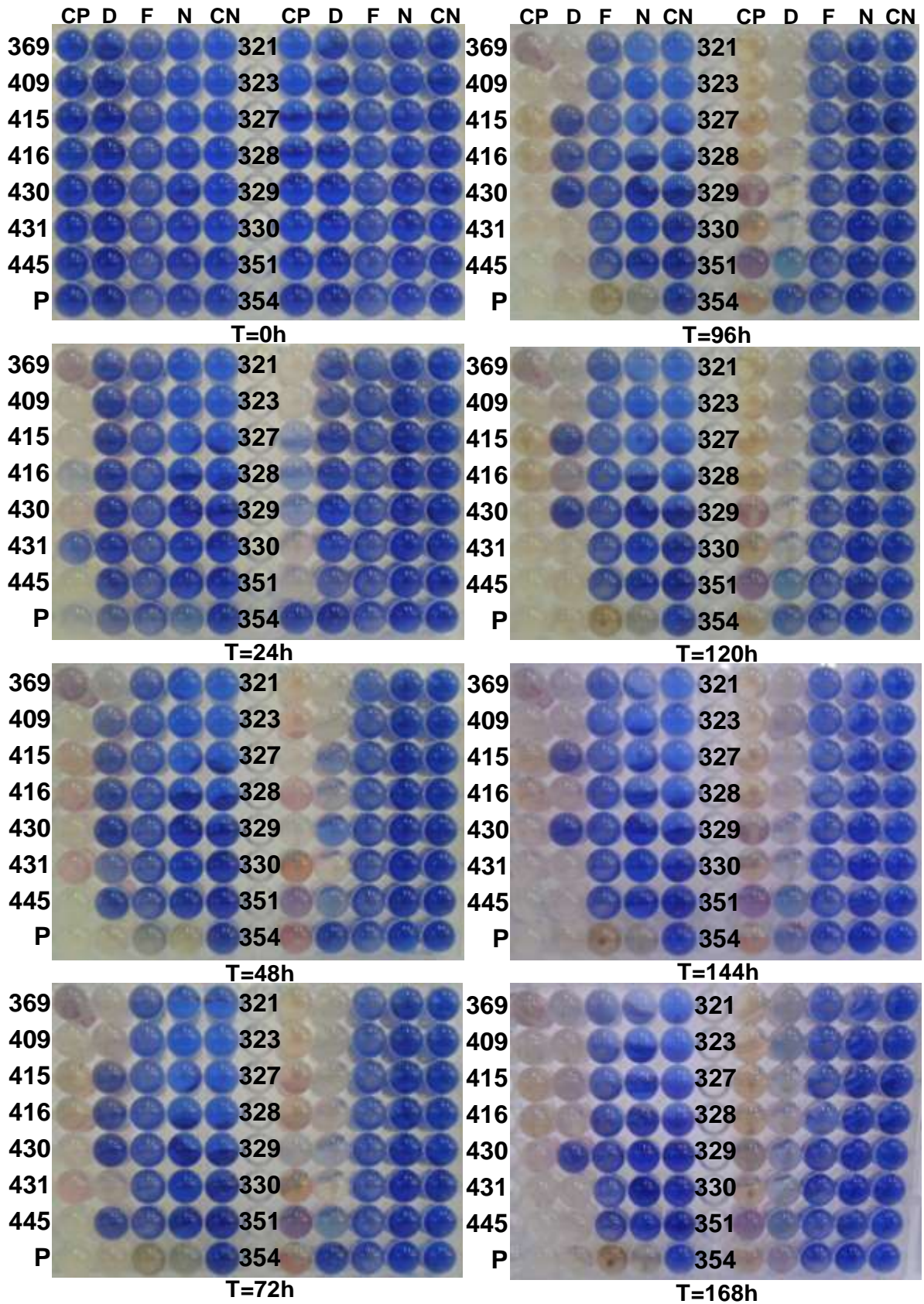


Figura 29. Teste de biodegradação referente à Placa 10 com isolados de *Burkholderia* e o padrão (P) analisados diariamente durante uma semana (168h). (CP – Controle Positivo, D - diesel, F – fenantreno, N – naftaleno, CN – Controle Negativo).

Analisando a Placa 10, observa-se que todos os controles positivos (CP) sofreram descoloração do indicador DCPIP, o que indica que os isolados estavam ativos e metabolizaram a glicose. Para o controle negativo, nenhum sofreu descoloração, visto que a placa não estava contaminada. O padrão (P) utilizado – *Pseudomonas fluorescens* degradou os três substratos em 48 horas de experimento.

Nenhum dos isolados foi capaz de degradar os substratos naftaleno (N) e o fenantreno (F), e para o diesel (D) os isolados 321, 323, 330, 351 e 369 degradaram esse substrato no mesmo tempo que padrão, 48 horas. Em 72 horas, os isolados 327, 328, 329, 409 e 431 degradaram o diesel. O isolado 445 degradou em 96 horas de experimento, o isolado 416 em 120 horas e os isolados 43, 354 e 415 em 168 horas.

A absorbância foi medida diariamente e a partir dos dados no tempo 0 e 168 horas, foi construído o Gráfico 10, a seguir discriminado.

O Gráfico 10-A representa a variação da absorbância para o substrato naftaleno e observa-se que para todos os isolados analisados, o valor diminuiu após 168 horas de experimento e para os isolados 351 e 369 o valor foi inferior ao valor obtido pelo padrão.

O Gráfico 10-B expressa a variação para o substrato fenantreno, e para todos os isolados houve redução dos valores da absorbância e nenhum ficou abaixo do padrão.

O Gráfico 10-C mostra a variação da absorbância para o substrato diesel e para todos os isolados os valores foram reduzidos após 168 horas e nenhuma abaixo do padrão.

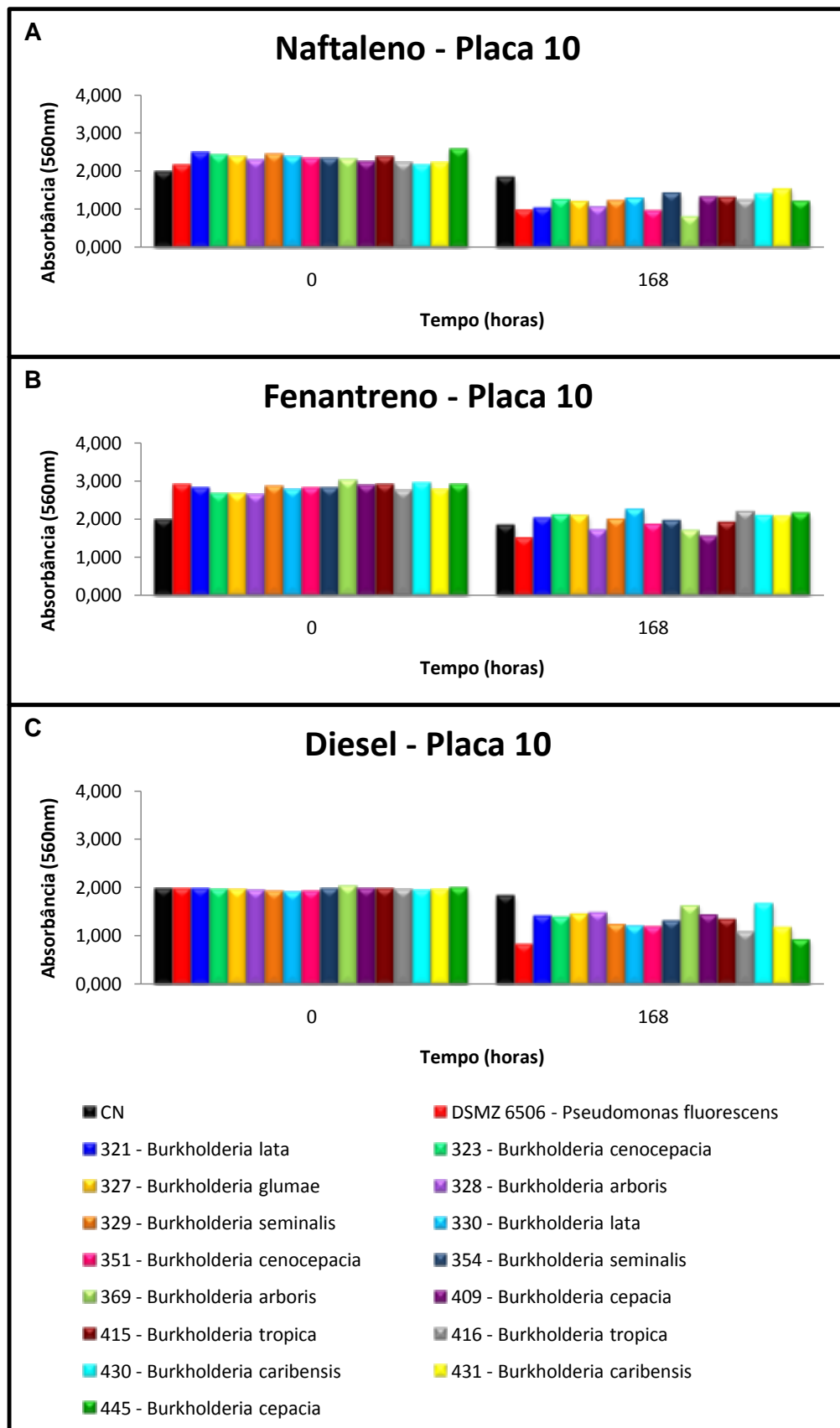


Gráfico 10. Variação da absorbância na biodegradação dos substratos no tempo 0 e 168 horas para os isolados da Placa 10.

A décima primeira placa foi preparada com mais 15 isolados, escolhidos aleatoriamente, que estão descritos na Tabela 14 abaixo. Nesta tabela também estão expressos os sítios de origem dos isolados e o resumo da degradação desses isolados.

Tabela 14 – Isolados utilizados no teste de biodegradação – Placa 11.

Isolado	Descrição	Origem	N	F	D
359	<i>Burkholderia lata</i>	ADJ Mina-I	-	-	48h
360	<i>Burkholderia glumae</i>	ADJ Mina-I	-	-	72h
366	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	ADJ Mina-I	-	-	48h
379	<i>Burkholderia lata</i>	TPA Mina-I	-	-	-
393	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	TPA Mina-I	-	-	-
399	<i>Burkholderia lata</i>	TPA Mina-I	-	-	-
402	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	TPA Mina-I	-	-	72h
406	<i>Burkholderia glumae</i>	TPA Mina-I	-	-	72h
407	<i>Burkholderia lata</i>	ADJ Mina-I	-	-	48h
417	<i>Burkholderia arboris</i>	ADJ Mina-I	-	-	-
419	<i>Burkholderia tropica</i>	ADJ Mina-I	-	-	-
424	<i>Burkholderia tropica</i>	ADJ Mina-I	-	-	-
440	<i>Burkholderia caribensis</i>	ADJ Mina-I	-	-	-
447	<i>Burkholderia cepacia</i>	ADJ Mina-I	-	-	72h
448	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	ADJ Mina-I	-	-	72h

Legenda: N – naftaleno; F – fenantreno; D – diesel; (-) ausência de degradação.

A Figura 30 mostra a evolução do experimento em uma semana. A Placa 11 foi fotografada diariamente e a absorbância foi medida por espectrofotometria. Ao analisar a Placa 11, verifica-se que para todos os controles positivos (CP) houve a descoloração do indicador, confirmando que as células bactérias estavam ativas e metabolizaram a glicose. Para os controles negativos (CN) nenhum sofreu descoloração, o que mostra que a placa não estava contaminada e que o indicador DCPIP não sofre descoloração naturalmente. O padrão (P) degradou o naftaleno em 24 horas e, para o fenantreno e diesel a degradação foi em 48 horas.

Os isolados utilizados não foram capazes de degradar o naftaleno e o fenantreno. Já para o diesel, os isolados 359; 366; 407 degradaram em 48 horas, os isolados 360; 402; 406; 447 e 448 em 72 horas e os isolados 379 e 417 degradaram em 168 horas.

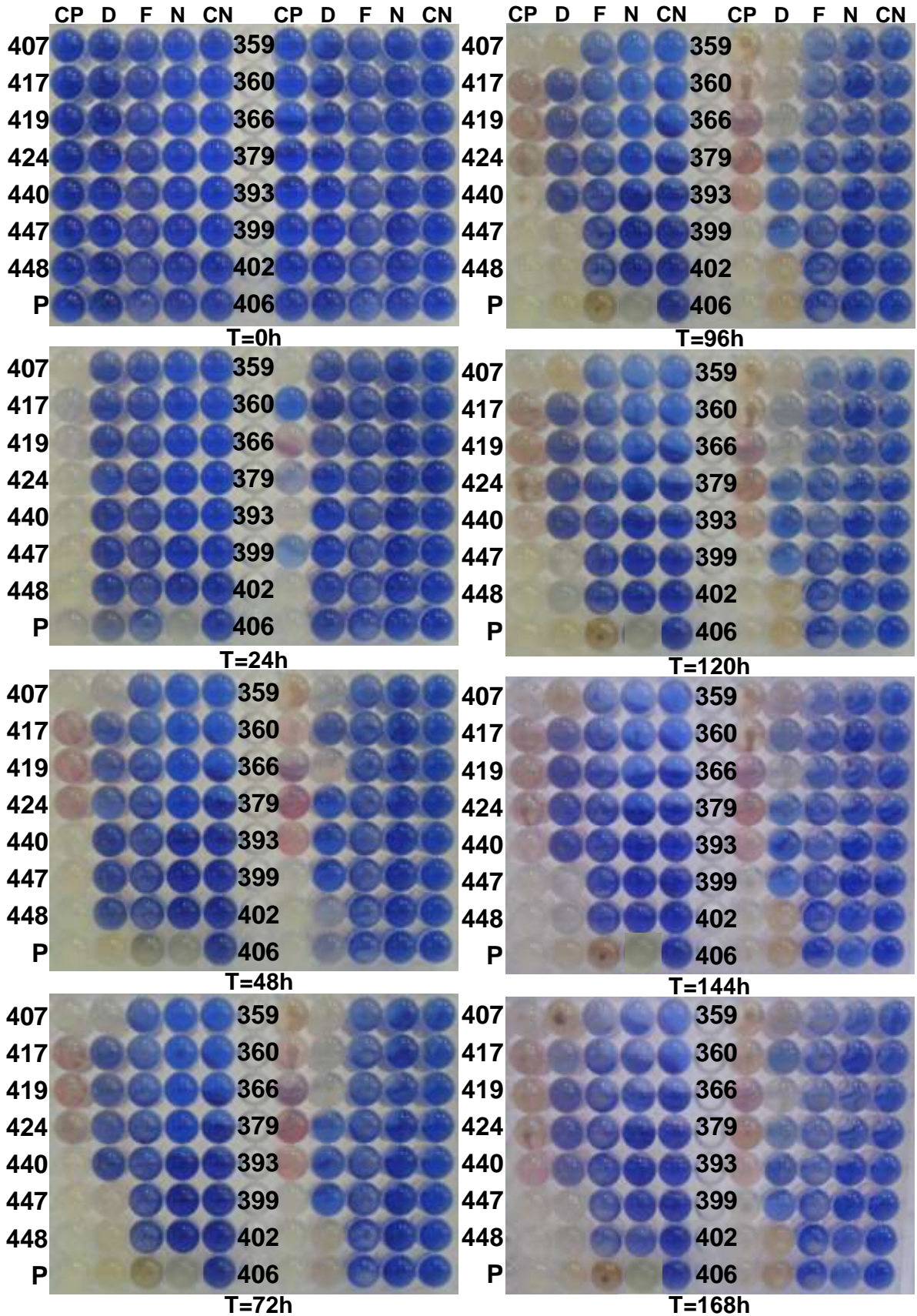


Figura 30. Teste de biodegradação referente à Placa 11 com isolados de *Burkholderia* e o padrão (P) analisados diariamente durante uma semana (168h). (CP – Controle Positivo, D - diesel, F – fenantreno, N – naftaleno, CN – Controle Negativo).

A absorbância foi medida diariamente e o Gráfico 11 expressam a variação no tempo 0 e 168 horas de experimento para cada substrato.

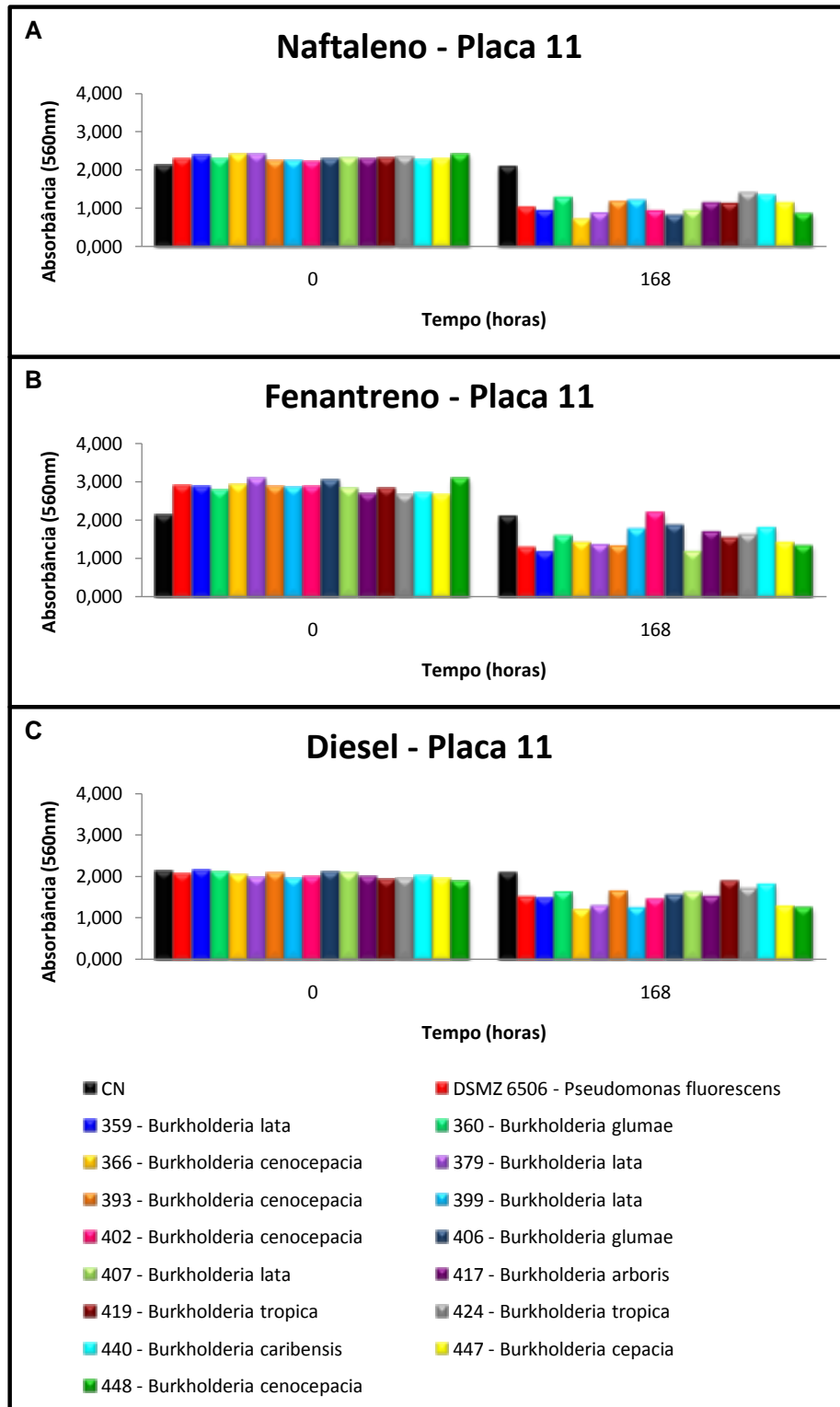


Gráfico 11. Variação da absorbância na biodegradação dos substratos no tempo 0 e 168 horas para os isolados da Placa 11.

Pela análise do Gráfico 11-A, que representa a variação da absorvância para o naftaleno, nota-se que todos os isolados tiveram o valor diminuído e somente os isolados: 359; 366; 379; 402; 406; 407 e 448 ficaram com valores abaixo do padrão.

O Gráfico 11-B expressa os valores para o fenantreno e observa-se que, para todos os isolados, o valor foi reduzido, e em relação ao padrão os isolados 379, 393 e 448 tiveram valores semelhantes e os isolados 359 e 407 ficaram com valores abaixo que o padrão.

O Gráfico 11-C representa a variação para o diesel, nota-se que os valores para todos os isolados tiveram uma redução e os isolados 359, 366, 379, 399, 402, 447 e 448, esses valores ficaram abaixo que o valor obtido pelo padrão. Já o isolado 417 teve o valor muito similar ao padrão.

A Placa 12 foi a última placa preparada para o teste de biodegradação e contou com os 9 isolados restantes, que estão descritos na Tabela 15.

Tabela 15 – Isolados utilizados no teste de biodegradação – Placa 12.

Isolado	Descrição	Origem	N	F	D
305	<i>Burkholderia tropica</i>	ADJ Mina-I	-	-	48h
404	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	TPA Mina-I	-	-	48h
405	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	TPA Mina-I	-	-	48h
418	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	ADJ Mina-I	-	-	96h
425	<i>Burkholderia tropica</i>	ADJ Mina-I	-	-	96h
433	<i>Burkholderia tropica</i>	ADJ Mina-I	-	-	96h
437	<i>Burkholderia tropica</i>	ADJ Mina-I	-	-	120h
441	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	ADJ Mina-I	-	-	168h
442	<i>Burkholderia caribensis</i>	ADJ Mina-I	-	-	168h

Legenda: N – naftaleno; F – fenantreno; D – diesel; (-) ausência de degradação.

A Placa 12 foi fotografada diariamente por uma semana e sua absorvância também foi medida neste período. A Figura 31 representa essa evolução do experimento.

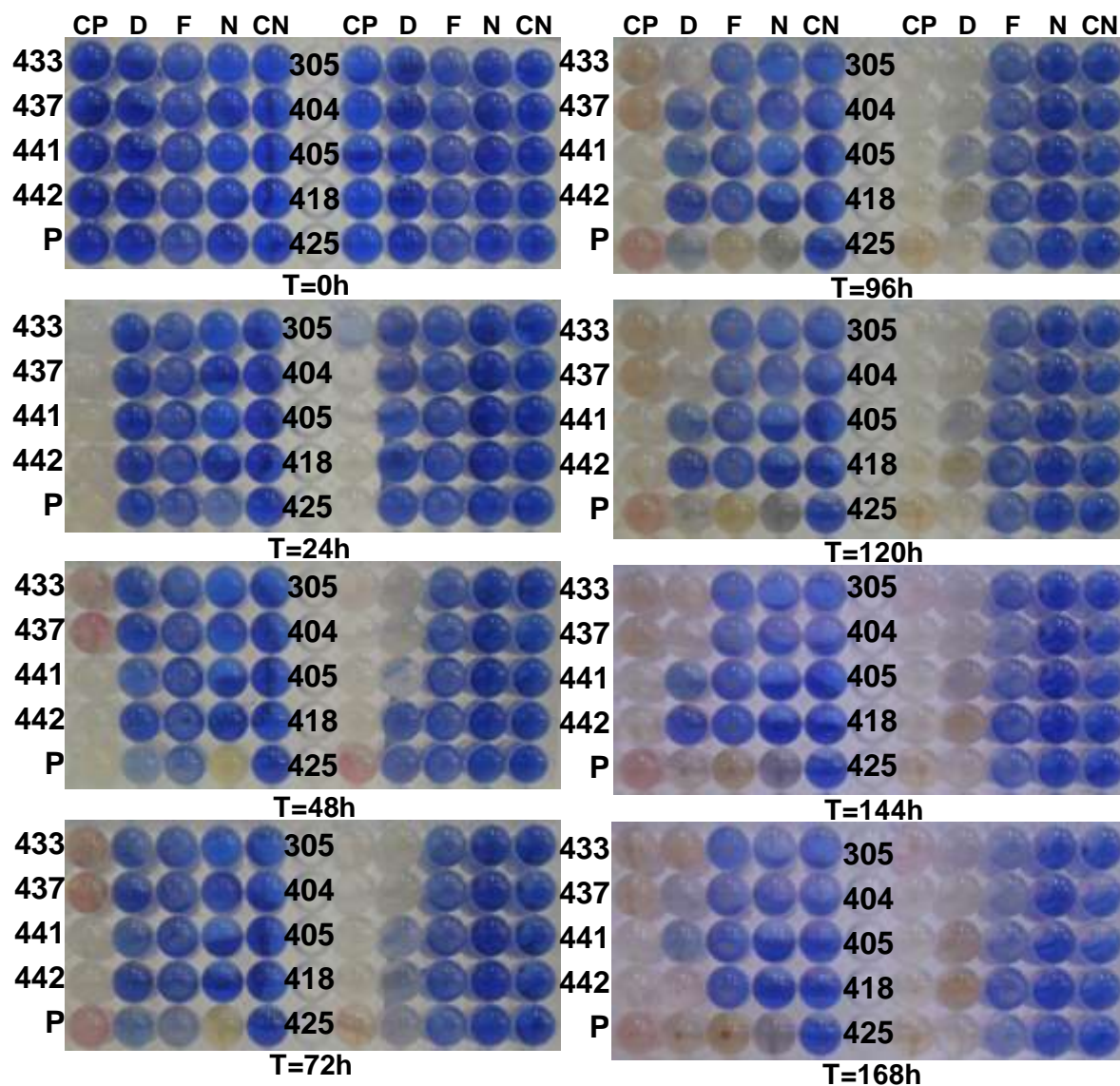


Figura 31. Teste de biodegradação referente à Placa 12 com isolados de *Burkholderia* e o padrão (P) analisados diariamente durante uma semana (168h). (CP – Controle Positivo, D - diesel, F – fenantreno, N – naftaleno, CN – Controle Negativo).

Visualmente a Placa 12, apresenta resultados indicando que todos os controles positivos sofreram a descoloração do indicador DCPIP, mostrando que as células estavam viáveis para o teste e foram capazes de metabolizar a glicose. Para os controles negativos, nenhum sofreu a descoloração de azul para incolor. O padrão (P) degradou o naftaleno (N) em 48 horas e para o fenantreno (F) e o diesel (D) essa degradação ocorreu em 96 horas de teste.

Quanto aos isolados, nenhum foi capaz de degradar o naftaleno e o fenantreno. Já para o diesel, os isolados 305; 404 e 405 degradaram o substrato em 48 horas, sendo mais eficiente que o padrão, os isolados 418; 425 e 433 em 96

horas. O isolado 437 foi o único a degradar o diesel em 120 horas e após 168 horas, os isolados 441 e 442 degradaram esse substrato.

Pelos resultados da análise da absorbância no decorrer do experimento, foi construído o Gráfico 12.

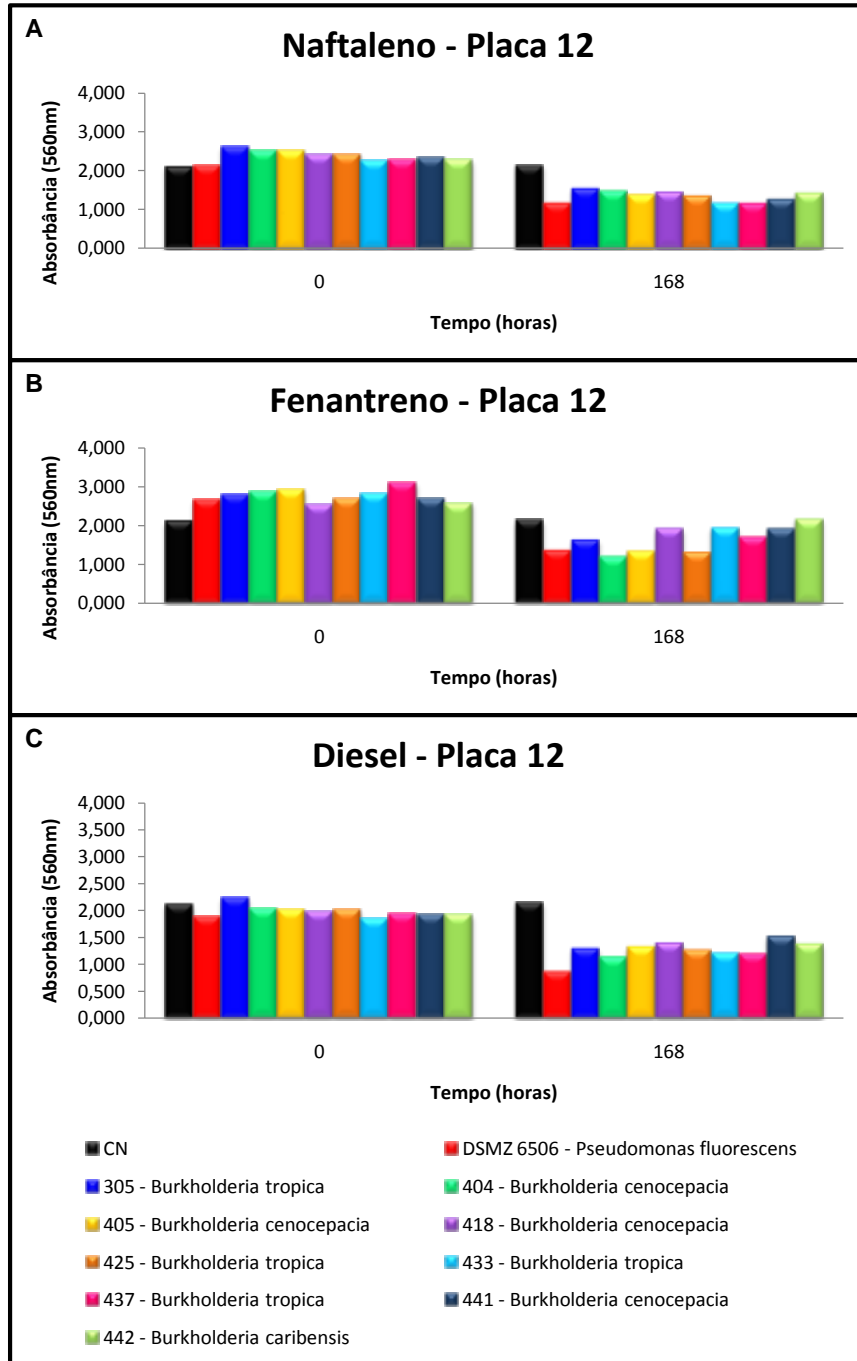


Gráfico 12. Variação da absorbância na biodegradação dos substratos no tempo 0 e 168 horas para os isolados da Placa 12.

O Gráfico 12-A representa a variação da absorbância para todos os isolados referente ao substrato naftaleno. Observa-se que, para todos os isolados os valores diminuíram após 168 horas e nenhum isolado indicou valor abaixo do padrão.

O Gráfico 12-B expressa os valores para o fenantreno e após 168 horas de teste, os valores para todos os isolados foram minimizados. E para os isolados 404, 405 e 425 esse valor ficou abaixo do valor atingido pelo padrão.

O Gráfico 12-C representa os valores da absorbância e verificou-se que para todos os isolados os valores diminuíram após 168 horas e nenhum ficou abaixo que o padrão.

Em resumo, dos 174 isolados do gênero *Burkholderia* obtidos da Terra Preta Antropogênica (TPA) e Adjacência (ADJ) nos quatro sítios: Caldeirão-Cultivado (Cal-Cult), Caldeirão-Capoeira (Cal-Cap), Hatahara e Mina-I, utilizados no teste de biodegradação dos substratos naftaleno, fenantreno e diesel, 19 isolados foram capazes de degradar o naftaleno, 16 isolados degradaram o fenantreno e 126 isolados degradaram o diesel, gerando um total de 132 isolados capazes de degradar pelo menos um dos três substratos, visto que alguns isolados foram capazes de degradar mais de um substrato. O fenantreno, por ser mais tóxico e pouco solúvel em água, foi o substrato que um número menor de isolados conseguiu metabolizar e utilizar como fonte de carbono para o crescimento celular, trata-se de uma substância que contém 3 anéis aromáticos, sendo que o isolado necessita ter um aparato enzimático disponível para clivar os anéis. Algumas bactérias apresentam potencialmente o complexo enzimático, porém este não é expresso e assim não ocorre a degradação do substrato. Para o naftaleno, o número de isolados que degradaram esse substrato também foi pequeno, justamente por ser pouco solúvel em água, como o fenantreno, contudo o naftaleno apresenta dois anéis aromáticos, o que pode tornar a biodegradação um pouco mais fácil e por ser menos tóxico para a célula. O diesel foi o substrato mais metabolizado pelos isolados, visto que é uma mistura de vários hidrocarbonetos e que possui cadeia carbônica aberta, assim, a degradação necessita de um complexo enzimático menos complexo, em relação aos outros dois substratos.

Em destaque estão os isolados que degradaram pelo menos 2 dos 3 compostos, sendo eles: 4 – TPA Cal-Cult (*Burkholderia arboris*), 6 – TPA Cald-Cult (*Burkholderia ambifaria*), 12 – TPA Cal-Cult (*Burkholderia cenocepacia*), 24 – TPA

Cal-Cap (*Burkholderia ambifaria*), 44 – ADJ Cal-Cult (*Burkholderia cepacia*), 236 – TPA Mina-I (*Burkholderia caribensis*), 257 – ADJ Hatahara (*Burkholderia lata*), 284 – TPA Mina-I (*Burkholderia cenocepacia*), 293 – TPA Mina-I (*Burkholderia pyrrocinia*), 302 – ADJ Mina-I (*Burkholderia gladioli*), 310 – ADJ Mina-I (*Burkholderia gladioli*), 352 – ADJ Mina-I (*Burkholderia ginsengisoli*), 356 – ADJ Mina-I (*Burkholderia mimosarum*), 396 – TPA Mina-I (*Burkholderia phenazinium*) e 450 – TPA Mina-I (*Burkholderia* sp.).

Os isolados descritos a seguir, foram os únicos que degradaram os três compostos no bioensaio: 48 – ADJ Cal-Cult (*Burkholderia pyrrocinia*), 49 – ADJ Cal-Cult (*Burkholderia unamae*), 59 – ADJ Cal-Cult (*Burkholderia glumae*), 67 – ADJ Cal-Cap (*Burkholderia cepacia*), 244 – TPA Mina-I (*Burkholderia glumae*), 254 – TPA Mina-I (*Burkholderia sartisoli*), 291 – TPA Mina-I (*Burkholderia gladioli*).

Com relação aos sítios de Terra Preta e adjacentes, verificou-se que para o sítio TPA Caldeirão Cultivado, 8 isolados obtidos desse sítio foram capazes de degradar pelo menos um dos substratos, sendo eles: 2 (*Burkholderia pyrrocinia*); 3 (*Burkholderia cepacia*); 4 (*Burkholderia arboris*); 6 (*Burkholderia ambifaria*); 7; 9 (ambos *Burkholderia glumae*); 12 (*Burkholderia cenocepacia*) e 14 (*Burkholderia cepacia*). Os isolados 4; 6 e 12 degradaram, ao mesmo tempo, o fenantreno e o diesel e os outros isolados foram responsáveis pela degradação somente do diesel. Para o sítio adjacente, ADJ Caldeirão Cultivado, 10 isolados foram capazes de degradar pelo menos um dos substratos, sendo eles: 41 (*Burkholderia lata*); 42 (*Burkholderia unamae*); 43 (*Burkholderia pyrrocinia*); 44 (*Burkholderia cepacia*); 45 (*Burkholderia ambifaria*); 46; 48 (ambos *Burkholderia pyrrocinia*); 49 (*Burkholderia unamae*) e 59 (*Burkholderia glumae*). Os isolados 48, 49 e 59 degradaram os três substratos; e isolados 44 foi o único a degradar o fenantreno e o diesel, o isolado 46 degradou somente o naftaleno e para os demais isolados, somente o diesel foi o substrato degradado.

Para o sítio TPA Caldeirão Capoeira, 13 isolados foram capazes de degradar pelo menos um dos substratos, sendo eles: 17 (*Burkholderia cepacia*); 20 (*Burkholderia* sp.); 21; 22 (ambos *Burkholderia pyrrocinia*); 23; 24 (*Burkholderia ambifaria*); 26 (*Burkholderia tropica*); 27 (*Burkholderia ambifaria*); 28 (*Burkholderia cepacia*); 29 (*Burkholderia arboris*); 33; 36 (*Burkholderia cepacia*) e 39 (*Burkholderia* sp.). Desses isolados, somente o isolado 24 foi capaz de degradar, ao mesmo tempo, o naftaleno e o diesel. Os isolados 23 e 36 degradaram somente o naftaleno

e os outros isolados foram capazes de degradar somente o diesel. O sítio adjacente, ADJ Caldeirão Capoeira, 5 isolados foram capazes de utilizar pelo menos um dos substratos como fonte de carbono para o crescimento celular, são eles: 67 (*Burkholderia cepacia*); 70 (*Burkholderia nodosa*); 79 (*Burkholderia tropica*); 85 (*Burkholderia unamae*) e 87 (*Burkholderia anthina*). O isolado 67 foi capaz de degradar os três compostos e os outros, degradaram somente o diesel.

Do sítio TPA Hatahara somente quatro isolados foram capazes de degradar o diesel, sendo eles: 217 (*Burkholderia cenocepacia*); 218 (*Burkholderia bryophila*); 223 (*Burkholderia seminalis*) e 256 (*Burkholderia glumae*). Para o sítio adjacente, ADJ Hatahara, dois isolados apenas foram capazes de utilizar um dos substratos aromáticos, sendo eles 257 (*Burkholderia lata*) que degradou o fenantreno e o diesel e o isolado 260 (*Burkholderia glumae*) que degradou somente o diesel.

O último sítio, TPA Mina-I foi o que apresentou o maior número de isolados, 36 no total, com a capacidade de biodegradar pelo menos um dos substratos. Os isolados são: 94 (D); 227 (D); 228 (D); 232 (D); 236 (D/ F); 237 (D); 240 (D); 244 (D/ F/ N); 252 (D); 254 (D/ F/ N); 284 (D/ F); 286 (D); 287 (D); 288 (D); 289 (D); 290 (D); 291 (D/ F/ N); 292 (D); 293 (N/ D); 296 (D); 298 (D); 299 (D); 300 (D); 351 (D); 376 (D); 379 (D); 385 (N); 395 (D); 396 (N/ D); 397 (D); 400 (D); 402 (D); 404 (D); 405 (D); 406 (D) e 450 (F/ D), as letras significam qual substrato o isolado degradou: Diesel (D), Naftaleno (N) e Fenantreno (F). O sítio adjacente, ADJ Mina-I também foi o que apresentou o maior número de isolados biodegradadores de um dos substratos, 54 no total sendo eles: 247 (D); 249 (D); 250 (D); 251 (D); 301 (D); 302 (N/ D); 304 (D); 305 (D); 306 (D); 308 (D); 309 (D); 310 (F/ D); 311 (D); 314 (D); 315 (D); 318 (D); 321 (D); 322 (D); 323 (D); 324 (D); 325 (D); 326 (D); 327 (D); 328 (D); 329 (D); 330 (D); 331 (D); 352 (N/ D); 353 (D); 354 (D); 356 (N/ D); 359 (D); 360 (D); 361 (N); 366 (D); 369 (D); 370 (D); 407 (D); 409 (D); 412 (D); 415 (D); 416 (D); 417 (D); 418 (D); 425 (D); 431 (D); 433 (D); 437 (D); 437 (D); 441 (D); 442 (D); 443 (D); 445 (D); 447 (D) e 448 (D).

Dos isolados obtidos da Terra Preta, 61 foram capazes de metabolizar pelo menos um dos substratos utilizados no teste, enquanto que para os solos adjacentes (ADJ), 71 isolados degradaram pelo menos um dos três substratos. A TPA apresenta altos teores de matéria orgânica, muito mais do que os solos adjacentes, porém esse fator não foi único para obter um maior número de isolados com a capacidade de biodegradação. Os solos adjacentes, por serem mais perturbados do

que a TPA pode ter micro-organismos mais adaptados e com atividades metabólicas mais ativas do que os isolados de TPA.

Quanto às espécies, a *Burkholderia cenocepacia* apresentou 18 isolados com a capacidade de degradar pelo menos um dos substratos. Em seguida a espécie *Burkholderia cepacia* apresentou 16 isolados; *Burkholderia lata* 15 isolados; *Burkholderia glumae* 14 isolados; *Burkholderia tropica* 11 isolados; *Burkholderia caribensis* 8 isolados; *Burkholderia arboris* e *Burkholderia pyrrocinia* foram espécies que apresentaram 7 isolados cada, com a capacidade de biodegradar; *Burkholderia seminalis* 6 isolados; *Burkholderia ambifaria* 5 isolados; *Burkholderia gladioli* 4 isolados; *Burkholderia ginsengisoli*, *Burkholderia* sp. e *Burkholderia unamae* com 3 isolados cada com a capacidade de degradar; *Burkholderia mimosarum*, *Burkholderia phenazinium* e *Burkholderia sartisoli* são espécies que apresentaram 2 isolados cada uma que degradaram pelo menos um dos substratos utilizados e as espécies *Burkholderia anthina*, *Burkholderia bryophila*, *Burkholderia heleia*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia nodosa* e *Burkholderia phymatum* apresentaram apenas um isolado cada uma que teve a capacidade de degradar um dos substratos.

5 – CONCLUSÕES

O gênero *Burkholderia* possui espécies que são muito parecidas geneticamente, ficando inviável a classificação somente pela análise do gene 16S rRNA, mesmo sendo uma região conservada do genoma. Dos 450 isolados da coleção de bactérias, 177 isolados foram classificados como *Burkholderia*, mediante da análise do gene 16S rRNA. As sequências dos 177 isolados foram comparadas com sequências presentes no banco de dado do NCBI e do RDP. Pelo RDP foram obtidas somente 23 sequências classificadas até gênero. Por outro lado, pelo NCBI, 104 sequências foram classificadas até gênero. A análise do gene *recA* foi menos eficiente, visto que das 177 sequências, 103 foram nomeadas até gênero. As únicas espécies obtidas pela análise do gene *recA* foram: *Burkholderia lata*, *Burkholderia arboris*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia seminalis* e *Burkholderia* sp. Portanto, mesmo sendo uma região polimórfica para os isolados pertencentes ao complexo *Burkholderia cepacia*, o gene *recA* foi menos eficiente que o gene 16S rRNA na classificação dos isolados, visto que os isolados de *Burkholderia* foram isolados de um ambiente tropical, submetidos a características ambientais diferentes e possuem metabolismo distinto das bactérias européias que serviram de base para o desenho dos *primers* do gene *recA*. Assim, estudos específicos são necessários visando o conhecimento e o aperfeiçoamento de técnicas para a compreensão desse ecossistema.

Pelo teste de biodegradação realizados com os isolados de TPA e ADJ foi possível identificar 19 isolados que degradaram o naftaleno, 16 que degradaram o fenantreno e 126 que degradaram o diesel, gerando um total de 132 isolados de *Burkholderia* que degradaram pelo menos um dos três substratos. Para os substratos naftaleno e fenantreno, verificou-se que poucos isolados foram capazes de degradar esses substratos, visto que são tóxicos para as células bacterianas, pouco solúveis em água, tornando o metabolismo celular mais difícil e possuem dois e três anéis aromáticos, respectivamente, o que torna mais complexa a degradação em virtude da exigência enzimática complexa para a quebra dos anéis. O diesel foi o substrato facilmente degradado por mais isolados, visto que é uma mistura de hidrocarbonetos que possuem cadeia carbônica aberta, não necessitando de um aparato enzimático complexo. Os isolados que degradaram os três substratos: naftaleno, fenantreno e o diesel foram: 48 – ADJ Cal-Cult (*Burkholderia pyrrocinia*), 49 – ADJ Cal-Cult (*Burkholderia unamae*), 59 – ADJ Cal-Cult (*Burkholderia glumae*), 67 – ADJ Cal-Cap (*Burkholderia cepacia*), 244 – TPA Mina-I (*Burkholderia glumae*), 254 – TPA Mina-I (*Burkholderia sartisoli*) e 291 – TPA Mina-I (*Burkholderia gladioli*).

Em relação aos sítios de TPA e ADJ, 61 isolados que degradaram pelo menos um dos três substratos, foram obtidos da Terra Preta, enquanto que 71 isolados foram obtidos de solos adjacentes (ADJ). A TPA apresenta altos teores de matéria orgânica, porém não é um solo muito perturbado como os solos adjacentes, assim, os isolados obtidos da ADJ podem ter uma versatilidade mais acentuada em metabolizar os substratos do meio ambiente. Os isolados de TPA podem até apresentar o maquinário enzimático capaz de degradar os substratos disponíveis, porém, pode não ser expresso.

A espécie *Burkholderia cenocepacia* foi a mais eficiente na degradação, com 18 isolados sendo capaz de degradar pelo menos um dos três substratos. Outras espécies como, *B. cepacia*; *B. lata*; *B. glumae*; *B. tropica*; *B. caribensis*; *B. arboris*; *B. pyrrocinia*; *B. seminalis*; *B. ambifaria*; *B. gladioli*; *B. ginsengisoli*; *B. unamae*; *B. mimosarum*; *B. phenazinium*; *B. sartisoli*; *B. anthina*; *B. bryophila*; *B. heleia*; *B. multivorans*; *B. nodosa*; *B. phymatum* e *Burkholderia* sp. foram as que apresentaram capacidade de degradar os substratos presentes no teste de biodegradação.

O teste de biodegradação utilizando o indicador DCPIP foi muito eficiente para selecionar espécies dentro do gênero *Burkholderia* capazes de metabolizar

substratos tóxicos e poluentes de ambientes. Este teste pode ser utilizado em outros grupos bacterianos visando a aplicação em ambientes contaminados.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 215, p. 403-410, 1990.

ALVES, B.M.G. **Biodegradação de naftaleno em solos contaminados por derivados de petróleo em Caratinga – MG**. 2007. 49 p. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Sustentabilidade) – Centro Universitário de Caratinga. Caratinga – MG.

BANFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Sussex, v.80, n.7, p.723-736, 2005.

BIODIESELBR – O portal do biodiesel. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/definicao/o-que-e-biodiesel.htm>>. Acessado em 03/ 02/ 2011.

BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: Atriz-less, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, New York, v. 36, p. 214-216, 2004.

COENYE, T.; MAHENTHIRALINGAM, E.; HENRY, D.; LIPUMA, J. J.; LAEVENS, S.; GILLIS, M. SPEERT, D. P.; VANDAMME, P. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1481-1490, 2001.

COMPANT, S.; NOWAK, J.; COENYE, T.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, p. 607-626, Abr. 2008.

DALMASTRI, C.; BALDWIN, A.; TABACCHIONI, S.; BEVIVINO, A.; MAHENTHIRALINGAM, E.; CHIARINI, L.; DOWSON, C. Investigating *Burkholderia cepacia* complex populations recovered from Italian maize rhizosphere by multilocus sequence typing. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 1632-1639, Jul. 2007.

DIFCO MANUAL, 10 ed. Detroit: Difco Laboratories, 1984.

DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N.; JOHRI, A. K. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 59, p. 143-152, Jun. 2002.

ELLIOTT, G. N.; CHEN, W. M.; CHOU, J. H.; WANG, H. C.; SHEU, S. Y.; PERIN, L.; REIS, V. M.; MOULIN, L.; SIMON, M. F.; BONTEMPS, C.; SUTHERLAND, J. M.; BESSI, R.; de FARIA, S. M.; TRINICK, M. J.; PRESCOTT, A. R.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. **New Phytologist**, v. 173, n. 1, p. 168-180, 2007.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biociência & Desenvolvimento**, n. 34, p. 36-43, 2005.

GILLIS, M.; VAN, T. V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M. P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 2, p.274-289, Abr. 1995.

GOYAL, A. K.; ZYLSTRA, G. J. Genetics of naphthalene and phenanthrene degradation by *Comamonas testosteroni*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 19, n. 5-6, p. 401-407, 1997.

GREEN, D. M.; McDOUGAL, K. E.; BLACKMAN, S. M.; SOSNAY, P. R.; HENDERSON, L. B.; NAUGHTON, K. M.; COLLACO, J. M.; CUTTING, G. R. Mutations that permit residual CFTR function delay acquisition of multiple respiratory pathogens in CF patients. **Respiratory Research**, v. 11:140, n. 1, p. 1-9, 2010.

HANSON, K. G.; DESAI, J. D.; DESAI, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v. 7, p. 745-748, 1993.

HOLMES, D. E.; NEVIN K. P.; LOVLEY, D. R. Comparison of 16S rRNA, *nifD*, *recA*, *gyrB*, *rpoB* and *fusA* genes within the family *Geobacteraceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1591-1599, 2004.

JACQUES, R. J. S. **Biorremediação de antraceno, fenantreno e pireno em um argissolo**. 2005. 172 p. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Setembro/2005.

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

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O. Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência e natureza**, v. 29, n. 1, p. 7-24, 2007b.

JOHNSEN, A. R.; KARLSON, U. Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 63, n. 3, p. 452-459, 2004.

KÄMPF, N.; WOODS, W. I.; KERN, D. C.; CUNHA, T. J. Classificação das Terras Pretas de Índio. 2007. In **As Terras Pretas de Índio: Caracterização e manejo para formação de novas áreas**, edited by Wenceslau G. Teixeira, Beata E. Madari, Vinícius M. Benites, Dirse C. Kern, and Newton P. S.Falcão. Embrapa, Brasília. (In press).

LEE, Y. H.; CHEN, Y.; OUYANG, X.; GAN, Y. H. Identification of tomato plant as a novel host model for *Burkholderia pseudomallei*. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 28, p. 1-13, 2010.

LEHMANN, J.; da SILVA, J. P. Jr.; STEINER, C.; NEHLS, T.; ZECH, W.; GLASER, B. Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer, manure and charcoal amendments. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 249, p. 343-357, 2002.

LELLIOTT, R. A.; STEAD, D. E. Methods for the Diagnosis of Bacterial Plant Disease, **Blakwell Scientific Publications**, Oxford. 216 p., 1987.

MACRAE, A. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 77-82, 2000.

MAHENTHIRALINGAM, E.; BISCHOF, J.; BYRNE, S.K.; RADOMSKI, C. DAVIES, J.E.; AV-GAY, Y.; VANDAMME, P. DNA-Based Diagnostic Approaches for Identification of *Burkholderia cepacia* Complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* Genomovars I and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3165-3173, 2000.

MAHENTHIRALINGAM, E.; BALDWIN, A.; DOWSON, C. G. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1539-1551, 2008.

MILLER, R. V.; KOKJOHN, T. A. General microbiology of *recA*: environmental and evolutionary significance. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 365-394, Oct. 1990.

MISHRA, V.; LAL, R.; SRINIVASAN. Enzymes and operons mediating xenobiotic degradation in bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 27, n. 2, p. 133-166, 2001.

O'SULLIVAN, L. A.; MAHENTHIRALINGAM, E. Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 8-11, Mai. 2005.

O'SULLIVAN, L. A.; WEIGHTMAN, A. J.; JONES, T. H.; MARCHBANK, A. M.; TIEDJE, J. M.; MAHENTHIRALINGAM, E. Identifying the genetic basis of ecologically and biotechnologically useful functions of the bacterium *Burkholderia vietnamiensis*. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 1017-1034, Abr. 2007.

PALLERONI, N. J.; HOLMES, B. *Pseudomonas cepacia* sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Londron, v. 31, n. 4 p. 479-481, Out. 1981.

PAYNE, G. W.; VANDAMME, P.; MORGAN, S. H.; LIPUMA, J. J.; COENYE, T.; WEIGHTMAN, A. J.; JONES, T. H.; MAHENTHIRALINGAM, E. Development of a *recA* Gene-Based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 3917-3927, Jul. 2005.

POTIN, O.; RAFIN, C.; VEIGNIE, E. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Oxford, v.54, n.1, p.45-52, 2004.

RAMETTE, A.; LIPUMA, J. J.; TIEDJE, J. M. Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1193-1201, Mar. 2005.

REIS, F. B. Jr.; MENDES, I. C.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo. **Embrapa Cerrados**, v. 51, p.1-33, Dez. 2002.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3 p. 1501-1506, Mar. 2005.

SEO, J. S.; KEUM, Y. S.; LI, Q. X. Bacterial degradation of aromatic compounds. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Honolulu, v. 6, p. 278-309, Jan 2009.

SOMBROEK, W.; RUIVO, M. L.; FEARNSIDE, P. M.; GLASER, B.; LEHMANN, J. Amazonian dark earths as carbon stores and sinks. In: LEHMANN, J. KERN, D. C.; GLASER, B.; WOODS, W. I. (Ed.). **Amazonian dark earths: origin, properties & management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publ., p. 125-139, 2003.

SOUZA, F. A. S. D. **Biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* em água do mar**. 2009. 158 p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento em Processos Ambientais - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 15/04/2009.

STIRLING, D. **DNA extraction from fungi, yeast and bacteria**. In: J. M. S. Bartlett and D. Stirling, *Methods in Molecular Biology: PCR Protocols, second edition*, © Humana Press Inc., Totowa, NJ, cap.13, p. 53-54, 2003.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLAWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, A. G. The CLUSTAL_W windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, Out. 1997.

TSAI, S.M.; CANNAVAN, F.S.; SILVA Jr. J.P.; CHAVES, M.G.; PASSIANOTO, C.C.; BORGES, C.P. Diversidade bacteriana em terra preta de índio baseada em sequenciamento do gene 16S rRNA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DO SOLO, 29; 2003, Ribeirão Preto. **Resumos ... Ribeirão Preto: SBCS, 2003. 1 CD-ROM.**

VANDAMME, P.; HOLMES, B.; VANCANNEYT, M.; COENYE, T.; HOSTE, B.; COOPMAN, R.; REVETS, H.; LAUWERS, S.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; GOVAN, J. R. W. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4 p. 1188-1200, Out. 1997.

VANDAMME, P.; MAHENTHIRALINGAM, E.; HOLMES, B.; COENYE, T.; HOSTE, B.; DE VOS, P.; HENRY, D.; SPEERT, D. P. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p.1042-1047, Mar. 2000.

VANDAMME, P.; HENRY, D.; COENYE, T.; NZULA, S.; VANCANNEYT, M.; LIPUMA, J. J.; SPEERT, D. P.; GOVAN, J. R.W.; MAHENTHIRALINGAM, E. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 33, p.143-149, Abr. 2002.

VANDAMME, P.; HOLMES, B.; COENYE, T.; GORIS, J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; LIPUMA, J. J.; GOVAN, J. R. W. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov. - a new twist to an old story. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 2, p. 91-96, Mar. 2003.

VERMIS, K.; COENYE, T.; MAHENTHIRALINGAM, E.; NELIS, H. J.; VANDAMME, P. Evaluation of species-specific *recA* based PCR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, p. 937-940, Abr. 2002.

VERMIS, K.; COENYE, T.; LIPUMA, J. J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; NELIS, H. J.; VANDAMME, P. Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 689-691, 2004.

VIAL, L.; GROLEAU, M. C.; DEKIMPE, V.; DÉZIEL, E. *Burkholderia* diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Quebec, v. 17, n. 9, p. 1407-1429, Jul. 2007.

VIEIRA, P. A.; VIEIRA, R. B.; FRANÇA, F. P.; CARDOSO, V. L. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. **Journal of Hazardous Materials**, v. 140, n. 1-2, p. 52-59, Fev. 2007.

WEISBURG, W. B.; BARNES, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, Jan. 1991.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 36, p. 1251-1275, 1992.