

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS DE *LANDFARM*
CAPAZES DE METABOLIZAR O DIBENZOTIOFENO

FERNANDA MARIA OLIVEIRA SOUSA

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Março de 2010

FERNANDA MARIA OLIVEIRA SOUSA

PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS DE *LANDFARM* CAPAZES DE
METABOLIZAR O DIBENZOTIOFENO

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Março de 2010

FERNANDA MARIA OLIVEIRA SOUSA

PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS DE *LANDFARM* CAPAZES DE
METABOLIZAR DIBENZOTIOFENO

Defesa: 25 de março de 2010

Dr. Henrique Maia Valério
UNIMONTES

Dr^a Carla Cristina Romano
UESC

Dr. Leandro Lopes Loguércio
UESC

Dr^a Rachel Passos Rezende
UESC
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

*Às pessoas mais importantes da minha vida, Fernando, meu pai, Carmen,
minha mãe e Camila, minha irmã.*

AGRADECIMENTOS

São tantos os que merecem os meus agradecimentos e desde já peço desculpas se esquecer de alguém.

Agradeço a Deus pela capacitação e força para vencer os obstáculos.

A minha orientadora Rachel, por todo apoio, toda compreensão, por acreditar em mim e me ajudar não só nas questões laboratoriais, mas por ajudar no meu crescimento pessoal e por fazer parte da minha vida.

Ao meu co-orientador João Dias por todas as dicas, pela disponibilização de meios para a realização do projeto e pela grande ajuda na realização deste trabalho.

A Capes pela concessão da bolsa.

Ao programa pela oportunidade concedida.

Aos professores do programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular por todo conhecimento passado durante estes dois anos de curso.

A minha mãe Carmen, pelas orações, pela dedicação, pelo carinho, pelo apoio emocional e incentivo em todos os momentos da minha vida.

A meu pai Fernando (*in memoriam*) por todos os ensinamento, por ser meu exemplo de vida.

A minha irmã Camila, pela amizade, pelo apoio, cumplicidade e por tornar sempre tudo mais fácil.

A Salatiel pela ajuda com os experimentos no GC.

Aos amigos do mestrado, em especial Helen, Gustavo, Gislaine e Juliano, por serem tão companheiros e tão amáveis. Pessoas que se fazem presentes mesmo estando longe e que me deram muita força nessa caminhada.

Aos amigos de sempre Thalís, Juliana, Fernanda, Wane e Késsija por tornar minha vida mais feliz.

Enfim, agradeço imensamente a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, a todos que me apoiaram e torceram por mim. Muito obrigada!

ÍNDICE

EXTRATO	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. O Petróleo.....	4
2.2. Tratamento dos compostos sulfurados.....	6
2.3. Hidrodessulfurização (HDS).....	7
2.4. Dessulfurização por líquidos iônicos.....	7
2.5. Remoção biológica do enxofre.....	8
2.6. Biorremediação microbiana.....	9
2.7. Vias metabólicas degradativas do DBT.....	11
2.7.1. Via de Kodama.....	11
2.7.2. Via 4 S.....	12
2.7.3. Via de mineralização.....	12
2.8. Enzimas responsáveis pela remoção do enxofre.....	17
2.9. Análise dos genes que codificam o rRNA no estudo da identificação microbiana.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. Procedência dos Microrganismos.....	20
3.2. Manutenção.....	20
3.3. Preparo do substrato.....	20
3.4. Meio de cultura e condições de cultivo.....	21
3.5. Seleção de microrganismos capazes de utilizar o dibenzotiofeno.....	21

3.6.	Extração do DNA de isolados bacterianos.....	22
3.7.	Amplificação por PCR.....	22
3.8.	Determinação da curva de crescimento.....	23
3.9.	Quantificação da degradação através de cromatografia.....	24
3.10.	Ensaio com células íntegras.....	25
3.11.	Seleção de microrganismos capazes de utilizar BTX (Benzeno, tolueno e xileno).....	25
3.12.	Determinação da via de clivagem do catecol.....	25
3.13.	Screening de biblioteca metagenômica em DBT.....	26
4.	RESULTADOS.....	27
4.1.	Seleção de bactérias capazes de crescer em meio contendo DBT.....	27
4.2.	Amplificação dos genes dsz.....	28
4.3.	Cinética de crescimento e degradação.....	28
4.4.	Ensaio com células íntegras.....	31
4.5.	Avaliação de isolados que apresentaram produção de HBP.....	32
4.6.	Degradação de hidrocarbonetos monoaromáticos.....	33
4.7.	<i>Screening</i> Funcional de Biblioteca Metagenômica.....	35
5.	DISCUSSÃO.....	36
6.	CONCLUSÃO.....	44
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

EXTRATO

SOUSA, Fernanda Maria Oliveira, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, março de 2010. **Prospecção de microrganismos capazes de metabolizar o dibenzotiofeno.** Orientadora: Dr^a Rachel Passos Rezende. Co-orientador: Dr João Carlos Teixeira Dias.

O dibenzotiofeno (DBT) é um hidrocarboneto aromático policíclico (PAH) recalcitrante que contém enxofre em sua estrutura. É utilizado como modelo em estudos de biodessulfurização que englobam processos de retirada de enxofre extremamente importantes para o meio ambiente. A metabolização do DBT por microrganismos pode ocorrer por três vias distintas. A via de Kodama, também chamada de via destrutiva de fragmentos do anel de benzeno, consegue clivar o DBT, porém o enxofre não é removido e gera subprodutos solúveis em água que inibem o crescimento dos microrganismos. A via de van Afferden que proporciona a remoção do enxofre, com degradação da estrutura de carbono formando ácido benzóico que pode vir a ser mineralizado. E a via 4S onde esqueleto de carbono permanece intacto e o enxofre é retirado através de enzimas monoxigenases. Algumas enzimas dszA, dszB, e dszC (dsz de dessulfurização) são utilizadas nas vias de remoção do enxofre que por sua vez serve como fonte nutritiva para os microrganismos. O potencial microbiano de bactérias isoladas de *landfarm* é aqui investigado com o objetivo de selecionar microrganismos capazes de realizar o processo de dessulfurização ou por biorremediação ou por meio da remoção do enxofre pela via 4S. Para isso sessenta linhagens bacterianas e uma levedura foram testadas quanto à capacidade de utilização de DBT como única fonte de enxofre. Foram então determinados o crescimento por densidade ótica, o consumo de DBT e a formação de produtos por cromatografia, a amplificação para os genes que codificam as monoxigenases e também a via de clivagem do catecol. Embora inicialmente, 39 linhagens bacterianas tenham apresentado crescimento positivo foi realizada uma segunda passagem desses microrganismos para o mesmo meio com o objetivo de se esgotar as reservas endógenas. Vinte e cinco linhagens foram consideradas positivas em relação ao crescimento, nove produziram como produto de via 4S um composto chamado de hidroxibifenilo (HBP) e 11 amplificaram para a enzima dszB que codifica uma desulfinase responsável pela conversão de 2'-hidroxibifenilo-2-sulfinato a 2-hidroxibifenilo com produção de sulfato característico da via 4S. O mesmo foi observado com a levedura. As linhagens 48 e 59 apresentaram um crescimento com DO maior do que 1.0 e foram escolhidas para estudos mais detalhados. As duas linhagens amplificaram para o gene dszB, mas não apresentaram formação de HBP durante o crescimento ou o mesmo não foi detectado. A curva de crescimento foi determinada juntamente com o consumo de DBT e medida de pH. As análises quantitativas foram feitas por cromatografia líquida em HPLC e cromatografia gasosa. O ensaio com células íntegras demonstrou a pronta degradação de DBT pelas duas linhagens confirmando assim um grande potencial degradador. A via de Kodama foi descartada uma vez que o crescimento não foi inibido e nenhum intermediário desta via foi detectado. As duas linhagens também foram capazes de metabolizar BTX e ácido benzóico via catecol. A linhagem 59 apresentou por teste colorimétrico ortoclivagem do anel de catecol e a linhagem 48 apresentou metaclivagem do anel de catecol. Em estudo anterior as duas foram classificadas como proteobactérias não cultiváveis. No entanto a linhagem 59 classificada como *Achromatium* faz parte das g proteobactérias e esta intimamente relacionada a grupo de bactérias que oxidam enxofre. Todos estes achados tornam estes microrganismos ferramentas biotecnológicas promissoras, sendo de especial interesse científico e acadêmico. Alternativamente quinhentos clones obtidos a partir de biblioteca metagenômica construída a partir de vetores do tipo fosmídeo com DNA de *landfarm* foram submetidos à *screening* em meio contendo DBT para

verificação da expressão enzimática. A obtenção do crescimento de 20 clones foi considerada como expressão das enzimas oxidativas necessitando prosseguir ao sequenciamento. Sendo assim, pôde-se verificar a grande importância e facilidade em se trabalhar com microrganismos isolados mostrando sua atuação na resposta da degradação aromática no ambiente.

Palavras-chave: dibenzotiofeno, desulfurização, biorremediação, microrganismos, *Landfarm*

ABSTRACT

SOUSA, Fernanda Maria Oliveira, MS, Universidade Estadual de Santa Cruz, March 2010. Exploration of microorganisms able to metabolize dibenzothiophene. Advisor: Dr. Rachel Passos Rezende. Co-supervisor: Dr João Carlos Teixeira Dias.

Dibenzothiophene (DBT) is a polycyclic aromatic hydrocarbon compound containing the sulfur element. Its degradation used as a model in studies on bioremediation procedures that include removal of sulfur, which is a process extremely important to the environment. The microbial metabolism of DBT can occur in 3 distinct pathways. The Kodama route, also called destructive way occurs when fragments of benzene ring are used but the sulfur is not removed, this pathway generates water-soluble products that inhibit growth. The route of van Afferden provides removal of sulfur, with degradation of the carbon structure forming acid that can be mineralized. In the 4s pathway, the carbon skeleton remains intact and the sulfur is removed by monooxygenases. Some of these enzymes, dszA, dszB and dszC (dsz from desulfurization) are used in the process of removal of sulfur, which, in turn, serves as a source of nutrient to microorganisms. The potential of bacteria isolated from landfarm is investigated here with the aim of desulfurization of DBT, either by bioremediation or removal of sulfur through 4s. Sixty bacterial strains and 1 yeast were tested on the in ability to use DBT as the sole source of carbon and sulfur. Growth was determined by optical density, consumption of DBT and formation of products assessed by chromatography. The amplification of genes that encode monooxygenases and catechol cleavage where also investigated. Although initially 39 bacteria had positive growth, was considered growth in cultivate of the second passage in order to exhaust the endogenous reserve. Twenty-five strains were positive for growth, nine produced a compound called Hydroxybiphenyl (HBP) as a product of 4s route and 11 were amplified by the enzyme dszB that encodes a desulfinase responsible for the conversion of 2'-hydroxybiphenyl-2-sulfinate into 2 – Hydroxybiphenyl, with release of sulphate. The same was observed with the yeast. The strains 48 and 59 showed growth with OD greater than 1.0 and were chosen for more detailed studies. The two strains DNA were positively amplified for dszB gene, but have failed to produce HBP during growth. The growth curve was determined with the consumption of DBT and the pH was measured. Quantitative analysis was performed by gas liquid chromatography and HPLC. The experiment with intact cells demonstrated the ready degradation of DBT by the two strains with great degrading potential. The route of Kodama was discarded because the growth was not inhibited and no intermediate of this pathway was detected. The two strains were also able to metabolize BTX and benzoic acid via catechol. By colorimetric assay, the strain 59 presented ortocleavage of catechol ring and strain 48 showed metacleavage. In a previous study both were classified as uncultured proteobacterias. However, the strain 59, which was classified as *Achromatium*, belongs to the group g proteobacteria is closely related to sulfur-oxidizing bacteria. All these findings make these organisms promising as biotechnology tools. Alternatively, five hundred clones obtained from metagenomic library constructed from vector type Fosmid with DNA from landfarm were screened in a medium containing DBT to check the enzyme expression. Growth was obtained in 20 clones. Here we emphasize the importance of working with isolate microorganisms showing its role in the response of aromatic degradation in the environment.

KEY WORDS: dibenzothiophene, desulfurization, bioremediation, microorganism, *Land*

1. INTRODUÇÃO

Microrganismos de solo degradadores do petróleo e suas frações são encontrados não só em áreas poluídas como também estão presentes, em concentrações menores, na maioria dos solos e sedimentos. No entanto, mesmo não sendo surpresa que bactérias oxidantes de hidrocarbonetos sejam encontradas nas mais diversas áreas naturais, ambientes contaminados como os *landfarms* ou biopilhas de borras oleosas são fontes de microrganismos altamente especializados (MACIEL et al. 2007). Microrganismos com atributos desejáveis, seja para biorremediação, seja para utilização e transformação de compostos aromáticos policíclicos (PAH) são de interesse ambiental, científico e biotecnológico.

O enxofre é o terceiro elemento mais abundante nos combustíveis fósseis (petróleo e carvão), depois do carbono e do hidrogênio, chegando até 5% nos óleos crus. Os compostos sulfurosos, quando não removidos, reduzem a eficiência de agentes aditivos na gasolina e diminuem a octanagem do combustível. Além disso, a presença do enxofre no petróleo contribui para a corrosão do material metálico utilizado na produção e no refino do óleo, e a combustão direta desses compostos ricos em enxofre contribui para a acidificação das chuvas, pela emissão de óxidos sulfurosos na atmosfera.

A remoção do enxofre presente no petróleo é uma prática usual nas refinarias. Normalmente, essa remoção é feita através de processos químicos como a redução catalítica dos átomos de enxofre em sulfato hidrogenado (hidrodessulfurização) ou por processos físicos como a aglomeração seletiva, flotação, separação magnética, agitação e lixiviação (KILBANE, 1990).

Entretanto, esta remoção em óleos pesados com grandes quantidades de enxofre é extremamente dispendiosa, devido à necessidade de grandes quantidades de hidrogênio e ao

acúmulo de metais pesados resultantes do processo de degradação, que necessitam ser removidos (SPEIGHT, 1981).

Além disso, esses processos são bem sucedidos apenas com relação à remoção do enxofre inorgânico, sendo os métodos físicos e químicos ineficientes para a remoção do enxofre orgânico do petróleo (CONSTANTI, et al., 1994).

A aplicação de processos biotecnológicos, como a biodessulfurização, vem sendo cada vez mais utilizada nos últimos anos (KARGI, 1986). Esses métodos biológicos oferecem vantagens econômicas quando comparados com os métodos físicos e químicos, devido à diminuição de custos com equipamentos e baixo custo de energia, não sendo necessários rigorosos controles de pressão e temperatura. Além disso, uma vez que alguns compostos de enxofre orgânicos encontrados no petróleo são também comumente encontrados em moléculas biológicas, mecanismos para metabolizar estes resíduos são esperados, o que torna possível a remoção orgânica por microrganismos (WANG & KRAWIEC, 1994).

No processo, os microrganismos devem atacar especificamente os compostos sulfurados presentes no óleo cru, sem alterar outros componentes economicamente importantes. Esse ataque deve alterar os compostos sulfurados para que eles sejam posteriormente removidos pela água (MALIK & CLAUS, 1976) ou deve promover a liberação do átomo de enxofre sem alterar o esqueleto de carbono (KILBANE & BIELAGA, 1991).

Quando se trata de biorremediação essa preocupação em se manter a estrutura carbonada não existe, o importante é o que os microrganismos sejam capazes de retirar o enxofre de maneira que o produto final dessa degradação seja menos tóxico e passível de mineralização.

Tendo em vista o que foi apresentado, fica evidente a necessidade de estudos que busquem novas propostas para aprimorar o processo de dessulfurização, tanto para a produção

de um combustível mais limpo, como para processos que visem a biorremediação de ambientes contaminados.

Sendo assim, o presente trabalho objetivou a prospecção de microrganismos com capacidade de dessulfurização, quer seja através de biorremediação, utilizando assim uma via de mineralização do composto, ou através de dessulfurização por meio da via 4S, onde o elemento enxofre é removido e o esqueleto de carbono permanece intacto.

Além disso, este trabalho visou a realização de um *screening* funcional de uma biblioteca metagenômica de solo de *landfarm*, na busca por clones que apresentassem tolerância ao crescimento com o DBT. Esses dados servirão de base para a realização de novos trabalhos que tenham como interesse a avaliação do perfil genético dessas amostras obtidas e superexpressão das enzimas de interesse.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Petróleo

O petróleo é um combustível fóssil de composição complexa, formado principalmente por quatro famílias de compostos: hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos, aromáticos e moléculas contendo oxigênio, nitrogênio ou enxofre em sua estrutura (Figura 1) (ALVES et al, 1999).

É uma substância oleosa, inflamável e insolúvel em água, com coloração variando entre castanho escuro e negro. Pode ser encontrado sob a forma gasosa, líquida ou sólida. Acredita-se que o petróleo tenha se formado há milhões de anos em razão da decomposição dos seres que compõem o plâncton, decomposição esta causada pela pouca oxigenação e pela ação de bactérias. Assim, esses seres decompostos teriam se acumulado no fundo dos mares e lagos, sendo pressionados pelos movimentos da crosta terrestre, transformando-se no petróleo. Este se desloca, saindo da rocha matriz, chegando a terrenos denominados bacias sedimentares, onde se concentra. Estas bacias são formadas por camadas ou lençóis porosos de areia, arenitos ou calcários. O petróleo aloja-se ali, ocupando os poros rochosos formando "lagos", onde se acumula, formando jazidas, nas quais são encontrados o gás natural, na parte mais alta, e petróleo e água nas partes mais baixas. (<http://www.cepetro.unicamp.br/petroleo>).

Depois de extraído, o petróleo é submetido a um processo de refino. O refino é constituído por uma série de operações de beneficiamento, nas quais o petróleo bruto é utilizado para a obtenção de produtos específicos. Refinar petróleo, portanto, é separar do mesmo as frações desejadas, processá-las e industrializá-las em produtos vendáveis.

A primeira etapa do processo de refino de petróleo é a destilação primária, através da qual são extraídas do petróleo as principais frações que dão origem à gasolina e ao óleo diesel, toda a nafta, os solventes e querosenes, além de parte do GLP (gás de cozinha). Em seguida, o resíduo da destilação primária é processado na destilação a vácuo, onde é extraída do petróleo mais uma parcela de diesel, além de frações de um produto pesado chamado de gasóleo, que pode ser destinado à produção de lubrificantes ou a processos mais sofisticados, como o

craquelamento catalítico, onde é transformado em GLP, gasolina e óleo diesel; o resíduo da destilação a vácuo pode ser usado como asfalto ou destinado à produção de óleo combustível. Uma série de outras unidades de processo destinam-se a transformar frações pesadas do petróleo em produtos mais leves e ao tratamento de todas as frações destiladas, de forma a colocar esses produtos de acordo com as especificações recomendadas para o consumo.

(<http://cepa.if.usp.br/energia/energia1999/Grupo1A/refino.html>)

O processo de refino produz uma série de resíduos industriais, dentre eles os compostos que apresentam enxofre em sua estrutura, genericamente denominados compostos organossulfurados (ALVES et al., 1999). Os compostos organossulfurados constituem uma pequena, mas importante fração desses combustíveis e devido à sua difícil biodegradabilidade são considerados compostos recalcitrantes. Geralmente, um aumento no número de anéis fusionados aumenta a estabilidade química e hidrofobicidade da molécula de um hidrocarboneto policíclico aromático, tornando-o menos susceptível à biodegradação (YU et al., 2005).

Embora em quantidades consideradas pequenas, os organossulfurados são extremamente nocivos ao homem e ao ambiente, uma vez que sua presença pode causar irritação e dilatação das mucosas e espasmos dos músculos brônquicos, além de provocar corrosão nos equipamentos de refinarias e chuva ácida (DENOME et al., 1993, ALVES et al., 1999).

Em vista disso, regulamentações cada vez mais rigorosas têm sido elaboradas, visando à produção de um combustível com baixas concentrações desses compostos.






ALIFÁTICOS	n-Hexadecano	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{14} - \text{CH}_3$
	2-metiltetradecano	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{11} - \text{CH}_3$
CICLICOS	1 – metilciclopentano	
	Ciclohexano	
AROMATICOS	Tolueno	
	Fenantreno	
“NSO” *	Piridina	 

Figura 1. Compostos representativos de hidrocarbonetos presentes em combustíveis fósseis (Reproduzido de: ALVES, et al., 1999).

2.2. Tratamento dos compostos sulfurados

Existem vários métodos de dessulfurização para remover o enxofre de combustíveis fósseis. Dentre eles, a hidrodessulfurização é o método mais utilizado atualmente (SOLEIMANI et al., 2007). Entretanto, este processo exige condições extremas de temperatura e pressão, sendo, portanto, um método custoso e, mesmo assim, não se consegue remover efetivamente os compostos sulfurados policíclicos.

Outros processos como a dessulfurização por líquidos iônicos e métodos biológicos ainda são pouco empregados, mas apresentam um grande potencial para contribuir com o processo de hidrodessulfurização ou até mesmo substituí-lo em sistemas de refino futuros (SOLEIMANI et al., 2007).

2.3. Hidrodessulfurização (HDS)

A hidrodessulfurização (HDS) é um processo catalítico que converte enxofre orgânico em sulfeto de hidrogênio na presença de catalisadores inorgânicos (MOHEBALI & BALL, 2008). A depender do tipo de hidrocarboneto a ser tratado, a HDS pode ocorrer de 200 a 425°C e 150 a 250 psi H₂O. Dessa forma, é um processo extremamente caro. Além disso, não consegue remover grande parte do enxofre contido no petróleo, devido a presença de muitos compostos recalcitrantes de difícil acesso. Essas condições extremas de temperatura e pressão também não são desejáveis, pois, podem ocorrer reações como a saturação de olefinas, o que pode resultar na redução de octanos da gasolina (HUANG et al., 2004).

2.4. Dessulfurização por líquidos iônicos

Líquidos iônicos são sais compostos de cátions orgânicos grandes e ânions inorgânicos relativamente pequenos, que são líquidos a temperaturas inferiores a 100°C. Têm recebido atenção por serem solventes não agressivos ao meio ambiente, principalmente por causa da ausência de emissões voláteis (OLIVEIRA & AZNAR, 2007).

Os íons orgânicos em líquidos iônicos podem ser desenhados em grande variedade e as combinações podem gerar um número ilimitado de líquidos iônicos (FREEMANTLE, 2004).

O processo de dessulfurização utilizando esta metodologia tem se desenvolvido e apresenta vantagens em relação ao processo de hidrodessulfurização, uma vez que, é um processo que requer menos energia e uma baixa produção de CO₂. Entretanto, os problemas encontrados para implantá-lo estão no fato da dificuldade em reciclar os líquidos iônicos, que são perdidos a cada reação (EARLE et al., 2006).

2.5. Remoção biológica do enxofre

Outra opção para remover o enxofre de combustíveis fósseis é através de métodos biológicos. Os microrganismos requerem enxofre para seu crescimento e atividades biológicas, como a síntese de proteínas e cofatores essenciais.

Os microrganismos podem assimilar o enxofre de diferentes fontes. Alguns podem consumir o enxofre de compostos tiofênicos tais como o DBT e desta forma, reduzir o conteúdo de enxofre do combustível. A dessulfurização através de microrganismos é vantajosa por ser um processo que atua em condições ambientes de temperatura e pressão, gastando então, menos energia do que o processo de hidrodessulfurização. Outra característica é o fato de ser um processo altamente seletivo, o que é uma vantagem sobre o processo de dessulfurização por líquidos iônicos (SOLEIMANI et al., 2007).

Além da importância no processo de tratamento do combustível, pode-se citar também a importância destes processos de dessulfurização em nível de descontaminação de ambientes. Uma vez que, existem classes de microrganismos capazes de mineralizar compostos sulfurados.

Muitos trabalhos têm sido realizados visando à procura de microrganismos que possam retirar enzimaticamente o enxofre ligado covalentemente ao petróleo. O DBT (Figura 2) tem sido utilizado rotineiramente como modelo da degradação heterocíclica do enxofre e da dessulfurização. Vários pesquisadores têm isolado microrganismos com a capacidade de utilizar o DBT como única fonte de enxofre para seu crescimento (GILBERT et al., 1998; KIRIMURA et al., 2002; KONISHI et al., 2000; MATSUI et al., 2000; TANAKA et al., 2002).

Apesar de ser uma metodologia bastante interessante e eficiente na remoção de enxofre do petróleo, a biodessulfurização ainda não foi aplicada em escala industrial. Entretanto, se houver uma melhoria nas condições bioquímicas e genéticas da via de dessulfurização, esta metodologia poderá ser utilizada. (KILBANE, 2006).

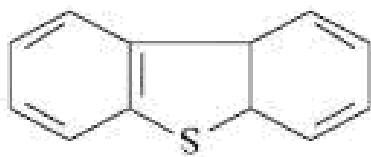


Figura 2: Dibenzotiofeno (Reproduzido de: ALVES et al., 1999)

2.6. Biorremediação microbiana

A utilização de microrganismos como agentes degradadores de compostos químicos é uma técnica bastante promissora para reduzir o impacto ambiental causado pelo derramamento de petróleo. Existem trabalhos focados nessa área que demonstram o grande potencial de comunidades microbianas indígenas para remediar áreas contaminadas por petróleo (YU et al., 2005).

Existem diversos microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos do petróleo. Alguns são degradadores de somente um tipo de hidrocarboneto, outros têm uma maior abrangência e, dessa forma, apresentam um maior potencial para as atividades de biorremediação. Moléculas com estruturas mais complexas, contendo ramificações e anéis aromáticos, são degradadas por um número menor de microrganismos e com uma taxa de degradação menor, quando comparadas com moléculas de estruturas mais simples (CURY, 2002).

O processo de biorremediação pode ser limitado por uma série de fatores como: disponibilidade de nutrientes, composição e abundância das comunidades microbianas, salinidade, temperatura, concentração de oxigênio, distribuição e composição do óleo derramado. A biorremediação age como um acelerador do processo de descontaminação por meio da adição de microrganismos específicos (bioaugmentação), nutrientes ou outras substâncias que intensifiquem a reprodução de tais microrganismos (bioestimulação) (RYTKONEN *et al.* 1997).

Logo, para a escolha da técnica a ser empregada é necessário averiguar as condições específicas do espaço contaminado, o tipo e quantidade do contaminante, visto que diferentes microrganismos degradam diferentes compostos.

Além de diferentes técnicas existentes pode-se ainda optar por duas formas de tratamento com os microrganismos. O tratamento *in situ*, o qual é realizado no próprio local de contaminação e o tratamento *ex situ*, onde o material contaminado é transportado para uma unidade de tratamento.

Dentre as tecnologias *ex situ* uma tecnologia bastante empregada é o *landfarm*, que consiste em um sistema de tratamento onde os microrganismos indígenas do solo são utilizados como ferramentas biotecnológicas para a redução do impacto causado pelos rejeitos de refinaria e também pelos rejeitos oleosos de difícil degradação.

O *landfarm* da Refinaria Landulpho Alves localizada em São Francisco do Conde é um sistema onde grandes extensões de solo são utilizadas para redução microbiana das borras oleosas. O solo de *landfarm* geralmente não entra em contato com o subsolo, sendo separado do mesmo por barreiras como lajes e lonas, tudo para evitar a contaminação do lençol freático, ou de outros ecossistemas.

O sistema de *landfarm* é dividido em grandes células. As células contendo os solos são também subdivididas e classificadas de acordo com o estado em que se encontram. Se estiverem em equilíbrio as células apresentam-se aparentemente como um solo normal, mas que já esteve em recuperação ou em choque. O choque significa que este solo recebeu rejeitos recentemente. No entanto, do ponto de vista microbiológico, uma célula de *land* que recebeu rejeitos é uma célula enriquecida e os microrganismos ali presentes desempenharão as funções de remoção parcial ou total das borras oleosas. Sendo os microrganismos aeróbios os principais degradadores.

Neste sistema o solo é aerado por revolvimento e também enriquecido constantemente com NPK e umidificado. O *landfarm* tem que ser constantemente monitorado e demanda grande espaço e custo relativamente elevado.

Em relação aos sistemas de biorremediação *in situ* pode-se destacar algumas vantagens frente a outras metodologias, como: baixo custo e baixo consumo de energia. Por ser realizada no próprio local contaminado causa uma perturbação mínima a área tratada, elimina custos de transporte do material a ser tratado e pode ser acoplada a outras tecnologias (BAKER et al, 1994).

2.7. Vias metabólicas degradativas do DBT

2.7.1. Via de Kodama (1973)

Nos estudos iniciais de biodessulfurização, encontraram-se algumas linhagens bacterianas capazes de consumir DBT como fonte de energia. Esse achado foi feito por Kodama e seus colaboradores quando trabalhavam com duas espécies do gênero *Pseudomonas*.

Nesse caminho metabólico, ocorreria a dioxigenação de um dos anéis aromáticos do DBT, levando à liberação do anel sem a liberação do enxofre, gerando o produto final 3-hidroxi-2-formil benzotiofeno (Figura 3) (KODAMA et al. 1973).

Várias bactérias e alguns fungos que degradam parcialmente o DBT por este caminho metabólico já foram isolados, incluindo *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Beijerinckiae* e *Rhizobium* (KRAWIEC, 1990). Apesar dessa via carbono-degradativa ser útil para a biodegradação do DBT no ambiente, ela não é interessante na dessulfurização de combustíveis, uma vez que a degradação do esqueleto de carbono leva à redução do conteúdo de energia ou valor calórico do combustível (GALLANGHER et al. 1993).

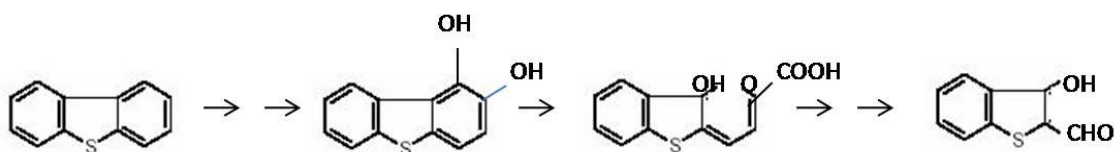


Figura 3. Via de Kodama- o átomo de enxofre não é removido havendo ruptura das ligações C-C.

2.7.2. Via “4S”

Uma terceira via metabólica descrita é a via sulfóxido-sulfona-sulfonato- sulfato, normalmente denominada via “4S” (Figura 4). Esta é uma via específica para a remoção do átomo de enxofre presente no DBT. Nesta via o grupo tiofênico sofre um ataque oxidativo progressivo o que resulta na remoção do átomo de enxofre sem danos a estrutura carbonada. Dessa forma, o valor calorífico do combustível permanece intacto e o enxofre é liberado sob a forma de um composto tratável, o sulfato. (GRAY *et al*, 1996).

Sendo assim, as estirpes que utilizam a via “4S” poderão constituir uma ferramenta biológica fundamental no tratamento em larga escala dos combustíveis fósseis, caso se consiga obter biocatalisadores de elevada estabilidade em ambiente industrial (WANG & KRAWIEC, 1994).

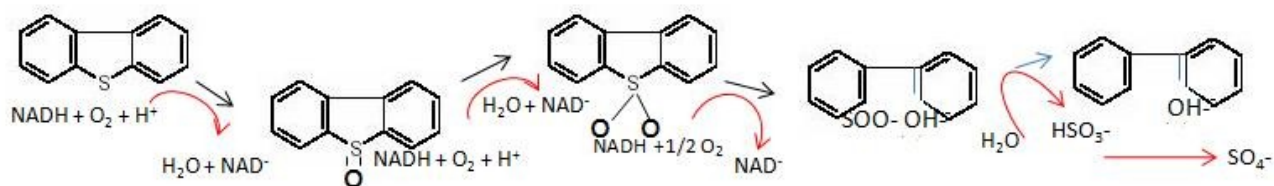


Figura 4 – Via “4S”: o enxofre é removido e o esqueleto de carbono permanece intacto.

2.7.3. Via de Mineralização

Os hidrocarbonetos têm sido amplamente produzidos no ambiente, resultantes da decomposição de vegetais e do lançamento de petróleo a partir dos depósitos geológicos. Apresentam diversas estruturas e estão amplamente distribuídos na biosfera, como

componentes da superfície cerácea das folhas, óleos vegetais, cutículas de insetos e lipídios de microrganismos (LINCH & HOBBIE, 1988; MILLERO & SOHN, 1991). A bioquímica da degradação de hidrocarbonetos é muito complexa, entretanto, microrganismos com capacidade de degradação destes compostos, estão amplamente, distribuídos no ambiente. Segundo Morgan & Watkinson (1994), a biodegradação de petróleo oferece alguns desafios aos microrganismos, pois são misturas complexas de hidrocarbonetos. Os compostos de baixo peso molecular podem apresentar toxicidade, devido a seus efeitos solventes nas membranas celulares e, principalmente, devido às implicações das propriedades físicas destes componentes no óleo. Alguns microrganismos são degradadores de alcanos, outros de aromáticos, e alguns conseguem metabolizar ambos (CURY, 2002). Alcanos C₁₀ a C₂₆ são mais facilmente degradados.

Em 1990, Van Afferden propõe uma via metabólica diferente em *Brevibacterium* sp., na qual o DBT é convertido em quantidades estequiométricas a benzoato e sulfito, que por sua vez é oxidado a sulfato, por oxidação abiótica (Figura 5) (VAN AFFERDEN et al., 1993). O benzoato é, por sua vez, totalmente mineralizado a CO₂ e H₂O. Deste modo, o DBT é usado como nutriente pela bactéria no papel duplo de fonte de carbono e enxofre. Esta via de degradação do DBT não tem grande interesse em termos de processos de biodessulfurização de combustíveis fósseis, já que a mineralização completa da estrutura carbonada implicará necessariamente uma diminuição na energia química potencial dos combustíveis. Porém, as bactérias utilizadoras desta via metabólica são potencialmente úteis na formulação de inóculos microbianos mistos para processos de biorremediação de hidrocarbonetos poliaromáticos contendo enxofre liberados no ambiente. (ALVES, et al. 1999).

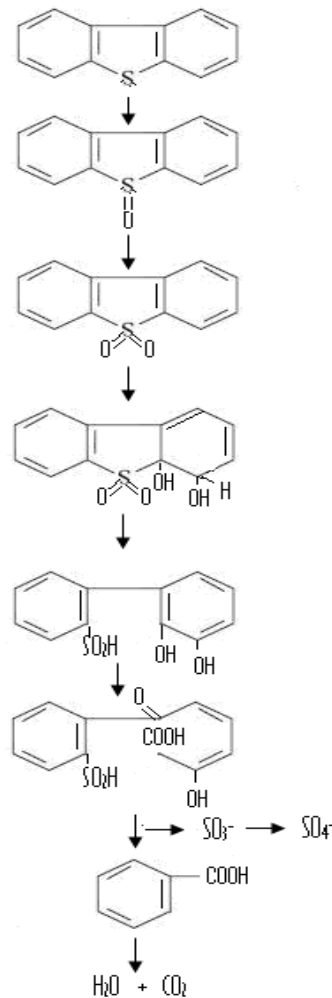


Figura 5. Via de Van Afferden; o enxofre é removido na forma de íon sulfito ocorrendo ruptura da estrutura carbonada.

O anel aromático resultante pode ser clivado por microrganismos e seu esqueleto carbônico mineralizado. Nos últimos trinta anos, elucidaram-se as vias metabólicas utilizadas neste processo, identificaram-se os metabólitos intermediários e os sistemas enzimáticos foram caracterizados (SMITH, 1994). O catabolismo do anel benzênico requer hidroxilação com consumo de energia e estas reações são catalizadas por oxigenases que inserem oxigênio molecular no anel benzênico. Os compostos intermediários di e/ou tri-hidroxilados são, por sua vez, transformados por dioxigenases sem consumo de energia. As duas vias metabólicas empregadas, ambas apresentando o mesmo modo inicial de ataque, resultam na formação de

catecol, o qual é posteriormente catabolizado pela enzima 1,2-dioxigenase (via ortoclivagem) ou pela via β -cetoadipato ou catecol 2,3-dioxigenase (via metaclivagem).

Muitos componentes aromáticos simples, como o benzeno, tolueno, xilenos, ácido benzóico, ácido fenilacético e ácido fenilpropionico, são degradados por bactérias aeróbias do solo, como *Pseudomonas*, *Acinetobacter* (Gram negativas) e *Rhodococcus* (Gram positiva) (DAGLEY, 1975). Os últimos dois componentes são também degradados por *Escherichia coli* (Gram negativa). As vias catabólicas usadas por estas bactérias são oxidativas, pela hidroxilação do anel para gerar o catecol, que é o intermediário das vias subsequentes (BUGG & WINFIELD, 1998).

Em geral, as vias metabólicas bacterianas de degradação aeróbia de hidrocarbonetos aromáticos podem ser divididas em três partes. Primeiro, o substrato aromático é transformado em um metabólito di-hidroxiaromático (tipicamente um catecol) através da introdução de grupos hidroxila por mono ou dioxigenases (SCRAMIN et al., 2003; KANALY & HARAYAMA, 2000; BUGG & WINFIELD, 1998). A segunda fase consiste na abertura do anel do catecol por di-oxigenases, que catalisam a adição de oxigênio molecular ao anel, quebrando assim uma das ligações carbono-carbono. A quebra do anel pode ocorrer em duas posições distintas (Figura 6): entre os grupos hidroxila (clivagem intradiol ou orto), ou adjacente a um dos grupos hidroxila (clivagem extradiol ou meta) (SCRAMIN et al., 2003; KANALY & HARAYAMA, 2000; BUGG & WINFIELD, 1998). As dioxigenases que fazem a ortoclivagem (adição intradiol), como a catecol 1,2-dioxigenase, são enzimas cujo cofator é o Fe^{3+} e produzem o ácido cis-cis-mucônico. Enquanto as dioxigenases que fazem a metaclivagem (adição extradiol), são enzimas dependentes do Fe^{2+} e produzem o semialdeído 2-hidroximucônico, podem ser subdivididas em extradiol dioxigenases proximais e distais, para caracterizar a posição da clivagem do anel em relação ao radical. A catecol 2,3-di-oxigenase é

um exemplo de enzima que atua na metaclivagem do catecol (SCRAMIN et al., 2003; KANALY & HARAYAMA, 2000; BUGG & WINFIELD, 1998).

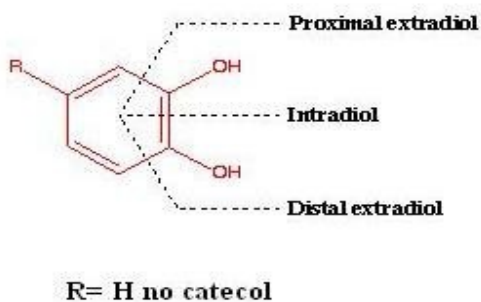


Figura 6: Clivagem extradiol proximal e distal, e intradiol do anel do catecol por dioxigenases. (Reproduzido de: <http://www.cbs.umn.ed>)

Na última fase do catabolismo dos hidrocarbonetos aromáticos, o produto resultante da abertura do anel é convertido em intermediários do metabolismo central (acetil-Co-A, oxalacetato e piruvato, por exemplo) (KANALY & HARAYAMA, 2000; SCRAMIN et al., 2003). A segunda e a terceira fases podem ser observadas na figura 7.

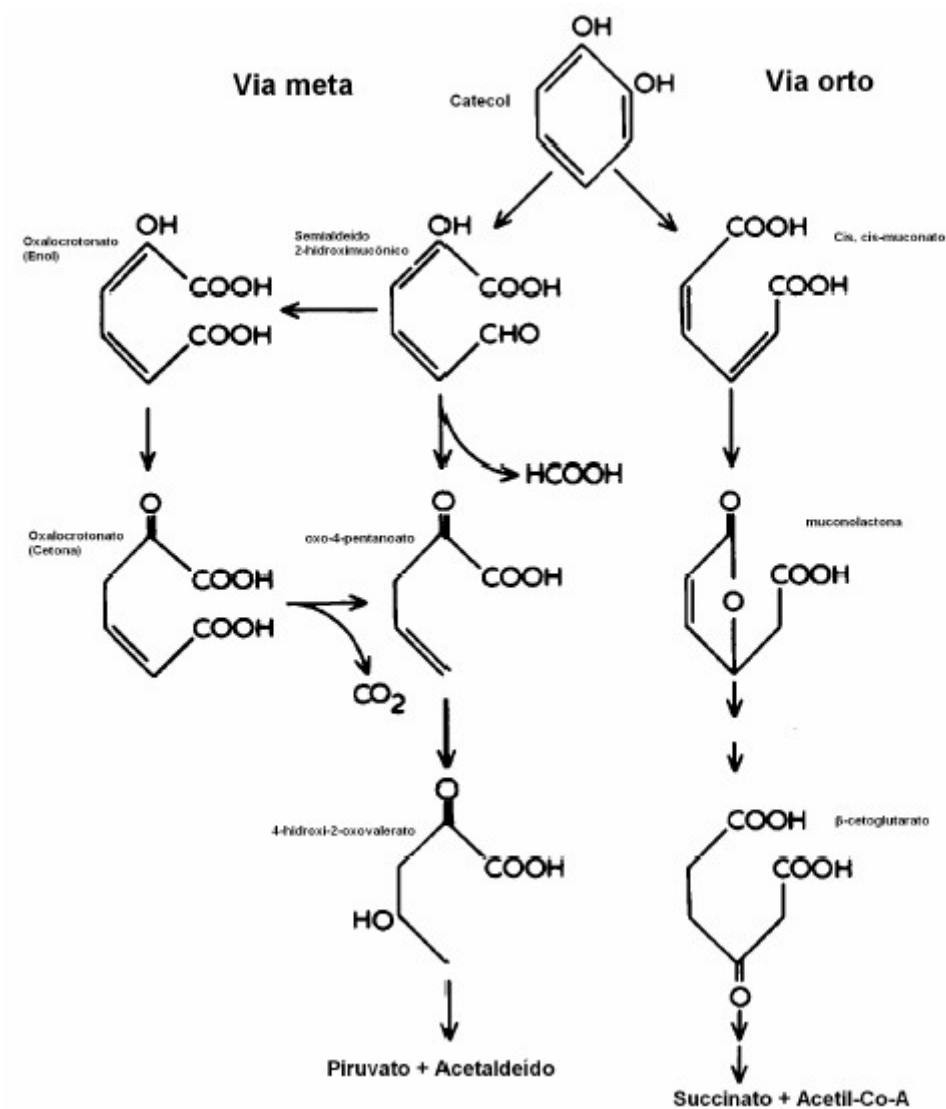


Figura 7: Representação da degradação do catecol pelas vias meta e orto. (Reproduzido de: MURRAY & WILLIAMS, 1974).

2.8. Enzimas responsáveis pela remoção do enxofre

Três enzimas participam do processo de dessulfurização. A primeira enzima, codificada pelo gene *dszC* (*dsz* de dessulfurização), é uma monoxigenase, que oxida o DBT a 5,5'-dióxido de DBT em dois passos. A segunda enzima codificada pelo gene *dszA* é igualmente uma monoxigenase que converte o 5,5'-dióxido de DBT a 2'-hidroxibifenilo-2-

sulfinato. A terceira enzima codificada pelo gene *dszB* age de forma a catalisar a quebra da ligação C-S transformando o 2'-hidroxibifenilo-2-sulfinato em dois produtos finais, 2-hidroxibifenilo (HBP) e sulfato.

As duas primeiras enzimas da via requerem oxigênio molecular, NADH e FMN como cofatores. Uma quarta enzima foi recentemente descrita em *Rhodococcus* sp., uma reductase de FMN endógena responsável pelo fornecimento da flavina reduzida às monooxigenases (GRAY *et al.*, 1996). Este novo sistema multienzimático pressupõe a existência de monooxigenases que utilizem flavina livre como substrato e a consequente existência de um complexo enzimático entre as oxigenases e a reductase de flavina.

2.9. Análise dos genes que codificam o rRNA no estudo da identificação microbiana

As árvores filogenéticas baseadas na análise das sequências dos genes do rRNA dividiram os seres vivos em três grandes domínios: *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*; porém, um mesmo ancestral é comum a todos os três domínios (HUGENHOLTZ, et al., 1998).

Os rRNAs são moléculas bastante conservadas e encontradas em todos os organismos vivos. As análises comparativas das sequências podem fornecer a genealogia molecular para a formação de árvores filogenéticas, mostrando a posição evolutiva dos organismos e determinando inter-relações entre eles (MACIEL 2004).

O gene para o rRNA 16S é uma excelente molécula marcadora para análise filogenética, uma vez que (i) está presente em todas as bactérias; (ii) apresenta região conservada assim como região variável (região ITS flanqueadora dos genes 16S e 23S), tornando possível o desenvolvimento de *primers* e sondas com diferentes níveis de especificidade; (iii) tem informação de sequência suficiente para inferência filogenética; e (iv) está presente em grande número e células, o que facilita sua detecção (MUYZER; SMALLA, 1998). Além disso, muitas sequências estão disponíveis em bases de dados de

livre acesso, tais como *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e RDP – *Ribosomal Database Project II* (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>). As regiões ITS, tanto em eucariotos quanto em procariotos, evoluem rapidamente e são apropriadas para discriminar espécies relacionadas, ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. O fato das regiões ITS, flanqueadoras de segmentos conservados, serem relativamente curtas (300 a 500 pb em procariotos e 500 a 800 pb em eucariotos) e aparecerem em grande número de cópias no genoma de eucariotos, permite que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade (FUNGARO, 2000).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Procedência dos Microrganismos

As bactérias utilizadas foram previamente isoladas por Maciel et al 2007, a partir de amostras de solo de *landfarm* da Refinaria Landulfo Alves. A levedura utilizada foi isolada por Rezende et al. 2004. As bactérias foram inicialmente selecionadas por sua capacidade de crescimento em meio contendo petróleo como única fonte de energia. A levedura foi isolada de efluente contendo cianeto e escolhida pelo seu potencial biotecnológico de transformação de compostos orgânicos.

3.2. Manutenção das bactérias e levedura

As bactérias foram mantidas em meio sólido inclinado Lignieres (8 g de caldo nutriente, 5 g de gelatina e 7 g de ágar por litro de água destilada) sob uma camada de óleo mineral estéril em geladeira a 4°C ou em meio líquido adicionado de 10% de glicerol estéril em freezer a -20°C. A levedura foi mantida em meio GYMP (2% glicose, 0.5% extrato de levedura, 1% extrato de carne, 0.2% NaH₂PO₄ por litro de água destilada) em geladeira a 4°C sob uma camada de óleo mineral estéril.

3.3. Preparo do substrato

Para todos os ensaios foi utilizada uma solução de DBT (99% de pureza, Acros Organics) a 100 mM diluído em acetona (FMAIA[®]). Para os ensaios de cromatografia foi feita a extração do DBT em hexano (FMAIA[®])

3.4. Meio de cultura e condições de cultivo

Para o *screening* das linhagens com capacidade de crescer em dibenzotiofeno como única fonte de enxofre foi utilizado o meio descrito por Izumi et al 1994 com modificações (0.5 g de KH_2PO_4 , 4 g de K_2HPO_4 , 1 g de NH_4Cl , 0.02 g de CaCl_2 , 0.01 g de NaCl , 0.2 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mL de solução de elementos traço contendo 0.5 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g de ZnCl_2 , 0.5 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g de CuCl_2 , 0.05 g de $\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 1000 mL de Água destilada). As amostras foram mantidas a temperatura ambiente (28°C), sob agitação constante de 150 rpm e pH 7,0.

3.5. Seleção de microrganismos capazes de utilizar o dibenzotiofeno

Os microrganismos foram transferidos para placas contendo meio BSM suplementado com 0.5 mM de DBT. A partir do crescimento foi preparado um inóculo em solução salina estéril 0.9% com absorvância de 0.5 em densidade óptica de 480 nm.

No processo de seleção 0.5 mL de cada uma das 60 linhagens bacterianas foram transferidos para Erlenmeyers com capacidade de 125 mL contendo 10 mL de meio BSM suplementado com 0.5 mM de dibenzotiofeno (adicionado de uma solução estoque de 100mM em acetona). Essas amostras foram incubadas sob agitação constante em um agitador ICELL a 150 rpm, a temperatura ambiente por 72 horas. As amostras positivas para o crescimento, observado pela turvação do meio, foram novamente incubadas sob as mesmas condições para eliminar a hipótese de influência do meio de manutenção no crescimento na primeira seleção. Nos dois ensaios, o crescimento foi medido em um espectrofotômetro em densidade óptica de 480 nm e o pH foi aferido utilizando-se um pHmetro calibrado com soluções de pH 4.0 e pH 7.0. Todos os experimentos foram realizados com materiais previamente esterilizados e em triplicata, além da utilização de dois padrões de controle negativo, um sem o DBT como fonte de enxofre e outro sem o microrganismo.

Os isolados positivos para o crescimento foram subsequentemente analisados.

3.6. Extração do DNA de isolados bacterianos

As células crescidas em meio BSM foram concentradas em tubos Eppendorffs de 1.5 mL através de centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a essas células foi adicionado 400 µL de tampão de extração (Tris-HCL 200 mM pH7.5, EDTA 250 mM, NaCl 250 mM, SDS 0.5%), e a amostra foi então homogeneizada. Foi adicionado 200 µL de acetato de potássio 3M, em seguida esta solução foi suavemente homogeneizada por 30 segundos e posteriormente centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual foi adicionado igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). A amostra foi homogeneizada e novamente centrifugada por 15 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo onde foram adicionados 70% de isopropanol e 10 % de acetato de sódio 3M. Essa amostra foi incubada a -20°C por 1h. Passado este tempo, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o tubo foi lavado com etanol a 70% gelado. Deixou-se secar, e o DNA foi ressuscitado em 50 µL de água mili-Q. Para a visualização do DNA extraído, foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1%.

3.7. Amplificação dos genes dsz por PCR

Os *primers* utilizados estão especificados na tabela 1. Os *primers* foram específicos para amplificação dos genes sob estudo, de acordo com Duarte et al. (2001):

Tabela 1: *Primers* específicos para amplificação dos genes dsz

<i>dszA forward</i>	5' - TCGATCAGTTGTCAGGGG - 3'
<i>dszA reverse</i>	5' - GGATGGACCAGACTGTTGAG - 3'
<i>dszB forward</i>	5' ATCGAACTCGACGTCCTCAG3'
<i>dszB reverse</i>	5'GGAACATCGACACCAGGACT-3'
<i>dszC forward</i>	5'-CTGTTCCGGATACCACCTCAC-3'
<i>dszC reverse</i>	5'-ACGTTGTGGAAGTCCGTG-3'

A reação de PCR foi preparada com 1µL de DNA (20 ng), tampão 1x (Invitrogen) 200 µM de DNTP, 0.2 µM dos *primers forward* e *reverse*, 3.7 mM MgCl₂, 0.4 mg/ml de BSA e 1.5 U Taq DNA polimerase (Invitrogen). As condições de amplificação para os *primers dszB* e *dszC* foram 94°C por 1 minuto, 55°C por 1,5 minutos, 72°C por 2 minutos, por 35 ciclos. Para a detecção de *dszA* a temperatura de anelamento foi diminuída 1°C a partir do segundo ciclo, variando de 65 para 55°C, com 15 ciclos adicionais a 55°C e um temperatura de extensão de 72°C por 10 minutos.

3.8. Determinação da Curva de Crescimento

Das amostras positivas para o crescimento duas foram selecionadas por apresentar densidade óptica maior do que 1.0 no comprimento de onda de 480 nm. Para a determinação da curva de crescimento 0.5 mL do inóculo (0.5 Å a 480 nm) foi transferido para Erlenmeyers de 125 mL contendo 9.5 mL de meio BSM suplementado com 0.5 mM de DBT. A densidade óptica foi determinada pela leitura do crescimento a cada 24 horas em espectrofotômetro (ICELL). O pH foi determinado em um pHmetro de bancada modelo pH21 (Hanna Instruments) e foi calibrado com soluções tampão de pH 7.0 e 4.0.

3.9. Quantificação da degradação através de cromatografia

As análises envolvendo o estudo da degradação do dibenzotiofeno foram desenvolvidas em um cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) modelo UFLC Proeminence Degasser (Shimadzu) com software de aquisição e tratamento de dados (LC

Solution). As amostras foram injetadas manualmente; com volume de injeção de 20 μ L e fluxo de fase móvel 1.5 mL/min. Foi utilizado o método isocrático, tendo como fase móvel uma solução de acetonitrila (VETEC, padrão HPLC) e água mili-Q na proporção de 4:1. As medidas de absorção foram feitas em um detector de UV-visível com duplo feixe (modelo SPD – 20A Shimadzu). Os dados foram obtidos em dois comprimentos de onda, 232 e 248 nm. Como coluna cromatográfica foi utilizada uma Gemini C18 de dimensões 150 mm x 4.6 mm e tamanho das partículas 5 μ m (Phenomenex). Para a quantificação do consumo do substrato e formação de produto foi feita uma curva de calibração de 0 a 1 mM do DBT. Na análise o meio foi extraído com hexano, para tanto foi adicionado 1.0 mL do meio de cultura e 1 mL de hexano em tubos Eppendorffs de 2 mL. A amostra foi agitada por 1 minuto e em seguida centrifugada a 10.000 rpm por 7 min. O sobrenadante foi coletado e partiu-se então para a análise deste produto no HPLC. Todos os pontos da curva de crescimento foram analisados, e os ensaios realizados em triplicata.

A cromatografia gasosa foi utilizada para verificação da degradação do dibenzotiofeno nas culturas após ensaio com células integras. O CG-FID é constituído de um cromatógrafo a gás modelo Shimadzu GC 2010. Operado com detector fotométrico de (FPD) e detector de ionização de chama (FID), coluna RTX@-5 com as seguintes programações do forno: temperatura inicial 85°C, tempo inicial 2 minutos, rampa 11°C/minuto, temperatura final 260°C e tempo final 7 minutos. Foi construída uma curva de calibração de 0 a 3 mM utilizando DBT extraído em hexano.

3.10. Ensaio com células íntegras

O ensaio foi realizado com as células íntegras das linhagens 48 e 59 após crescimento em meio BSM suplementado com 0.5 mM de DBT. As células foram obtidas por centrifugação a 5.000 rpm após 72 horas de crescimento sob agitação constante de 150 rpm a

temperatura ambiente. As células foram lavadas 3x com tampão fosfato de sódio a 50 mM, pH 7. O sobrenadante foi descartado e o ensaio foi realizado em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 10 ml de tampão fosfato (0.1M pH7.0) com 3 mM de DBT e 3 g de células (peso úmido). Em intervalos de uma hora até 8 horas, as amostras foram retiradas, extraídas com hexano (1:1) e submetidas à análise por cromatografia líquida e gasosa.

3.11. Seleção de microrganismos capazes de utilizar BTX (Benzeno, tolueno e xileno).

Foram transferidos 10 µL dos inóculos para placas de Petri contendo meio mínimo mineral com BTX (30 mM) em triplicata. O controle negativo foi feito utilizando placas contendo meio mínimo mineral sem fonte de carbono com 1,5% de ágar bacteriológico como agente solidificante e, para o controle positivo, utilizou-se meio mínimo mineral sólido e 1% de glicose. Foram considerados positivos para crescimento em BTX os microrganismos que não cresceram no controle negativo, e apresentaram crescimento nas placas com BTX.

3.12. Determinação da via de clivagem do catecol

Para a determinação da via de clivagem do catecol, 1 mL dos inóculos bacterianos capazes de mineralizar BTX foram colocados em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 10 mL de meio mínimo mineral e 5 µL de benzeno. Os frascos foram incubados sob agitação a 120 rpm por 24 h à temperatura ambiente ($\pm 28^\circ \text{C}$). As células foram sedimentadas por centrifugação, lavadas três vezes com tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8.0). A seguir, as células foram colocadas em tubos de ensaio com 1,5 mL de tampão Tris-HCl (0.50 mM, pH 8.0), 0.3 mL de tolueno e 1.5 mL de catecol a 9 mM, os quais foram agitados vigorosamente e incubados a 28°C. No caso de meta clivagem do substrato, uma cor amarela seria formada após 15 a 60 minutos devido ao acúmulo de semialdeído 2-hidroxiacético. Quando a cor amarela

não foi observada, os tubos foram incubados por 12 horas e então testados quanto à presença de β -cetoadipato pela reação de Rothera, que consiste na adição aos tubos de ensaio de 1 g de uma mistura seca, composta por 60 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,6 g de nitroprussiato de sódio e 0.5 mL de solução de amônia (33%). A formação da coloração roxa indica a quebra do catecol pela via orto.

3.13. *Screening* de biblioteca metagenômica em DBT

Quinhentos clones de uma biblioteca de fosmídeo construída a partir de DNA total de solo de *landfarm* foram testados quanto à capacidade de degradação de DBT. Para isso os clones foram crescidos em meio LB contendo DBT e em meio BSM contendo DBT como única fonte de enxofre. Foram inoculados em placas de Elisa e incubados a 37°C por 72 horas. Após esse período o crescimento foi verificado visualmente. Os clones com crescimento positivo foram crescidos em meio LB e BSM suplementados com DBT a 0.5 mM por 72 horas a 37°C para armazenamento.

4. RESULTADOS

4.1. Seleção de bactérias capazes de crescer em meio contendo DBT

Sessenta linhagens de bactérias e uma levedura foram testadas quanto à capacidade de degradar o DBT. Das linhagens bacterianas, 39 mostraram-se positivas para o crescimento em meio mínimo contendo DBT como única fonte de carbono e enxofre.

Para a confirmação desta seleção os indivíduos positivos foram transferidos para o mesmo meio e submetidos as mesmas condições de cultivo anteriormente utilizadas, e desses 39, apenas 25 apresentaram crescimento. (Tabela 2).

Tabela 2: Indicação de indivíduos positivos para o crescimento em meio BSM com DBT, para a acidificação do meio, para a produção de HBP e para amplificação dos genes dsz.

Ensaio		Positivos (total)
Crescimento em meio BSM com DBT como única fonte de carbono e enxofre		25 (60)
Acidificação do meio		11 (25) Linhagens: 03, 14B, 19, 25 A, 31 B, 33, 43, 48, 49, 52, 59
Produção de HBP		10 (60) Linhagens: 03, 14B, 19, 25A, 31B, 33, 43, 49, 52 e levedura
Amplificação	dszA	0 (11)
	dszB	11 (11)
	dszC	9 (11)

Dentre essas 25 linhagens positivas para o crescimento, duas se destacaram por apresentar um melhor crescimento no meio, com uma leitura de densidade óptica maior do que 1,0. Dessa forma, foram selecionadas para os estudos de cinética de crescimento, assim como avaliação da utilização do DBT.

4.2. Amplificação dos genes dsz

Foi efetuada a extração de DNA dos isolados capazes de utilizar o DBT como única fonte de enxofre e a partir de então foi realizado o PCR para determinação da presença dos

genes responsáveis pelo processo de dessulfurização (Tabela 2). As amostras amplificadas foram visualizadas em gel de agarose 1%. A figura 8 ilustra a amplificação do gene dszB pelas linhagens 48 e 59.

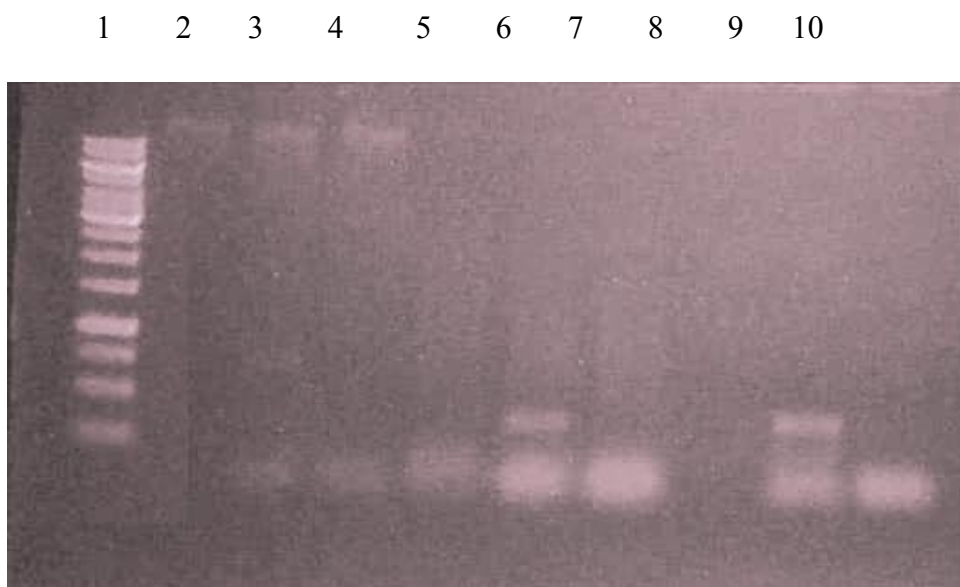


Figura 8: Gel de agarose 1% mostrando a amplificação dos genes dszB. Na primeira canaleta foi aplicado o marcador de 1Kb, nas canaletas 6 e 9 encontra-se o produto do PCR das linhagens 48 e 59 amplificadas com o primer para o gene dszB.

4.3. Cinética de crescimento e degradação

Com o objetivo de estabelecer se a via de degradação do DBT gerava como produto o metabólito HBP, as linhagens foram cultivadas em meio BSM e a levedura em YNB acrescidos de DBT sendo que após 72 horas foi avaliada a presença ou não de HBP (Tabela 2).

No estudo de cinética de crescimento foi observado que a linhagem 59 apresentou uma fase “lag” de aproximadamente 48 horas, o que corresponde ao período de adaptação bioquímica e fisiológica do microrganismo as condições do meio. A partir de então começou a fase exponencial do crescimento, onde o microrganismo utiliza os nutrientes presentes no

meio para a sua multiplicação. Em torno de 72 h foi observada uma estabilidade no crescimento que perdurou até o fim do ensaio (Figura 9). A linhagem 48 se adaptou mais rápido ao meio, em um período de 12 horas, quando então começou sua fase exponencial de crescimento que durou até o período de 24 horas. A partir de então pôde-se observar um leve crescimento até a estabilização (Figura 10).

Em relação a degradação do DBT foi observado que a linhagem 48 iniciou a degradação durante as primeiras horas de crescimento (Figura 10). Ela reduziu 80% do DBT em cerca de 20 horas e no período de 72 horas a degradação foi total. Esse período intenso de degradação coincidiu com a fase exponencial de crescimento celular. Já a linhagem 59 apresentou um ritmo mais lento, a degradação foi iniciada no período de 24 horas. Em torno de 72 horas pôde-se observar uma degradação quase total do composto, que não é mais visualizado em 96 horas de crescimento (Figura 9). Em ambos os casos o pH inicial do meio foi de 7 apresentando uma discreta alteração no decorrer do experimento. A linhagem 48 apresentou um pH final de 5,42 (Figura 10). Já a linhagem 59 apresentou uma acidificação ligeiramente maior, apresentando um pH final de 5,2 (Figura 9).

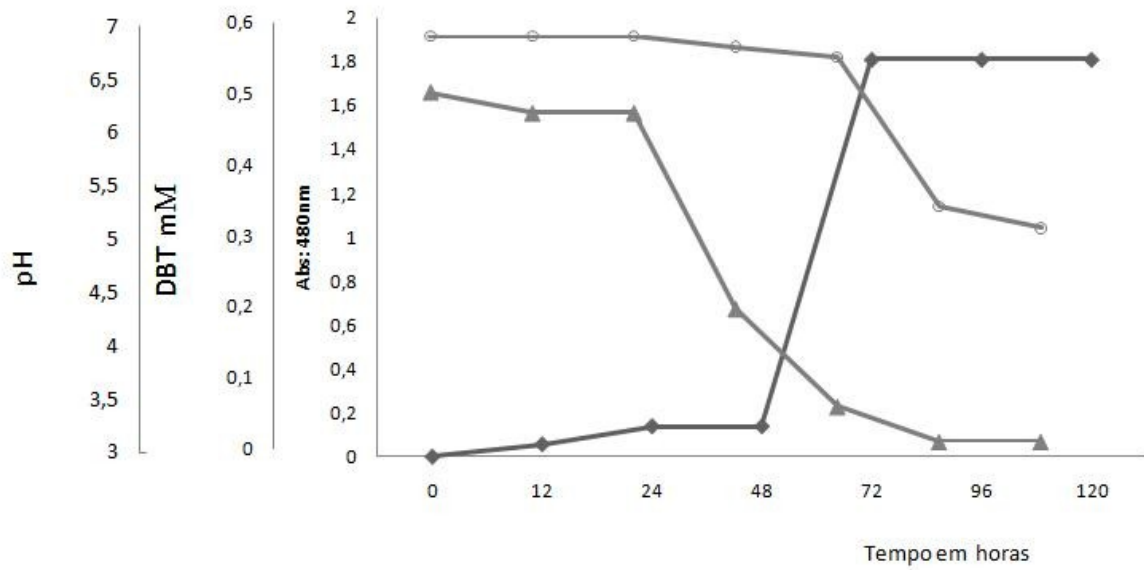


Figura 9: Medida do crescimento da linhagem 59 (◆) por densidade óptica a 480nm mostrando consumo de DBT (▲) durante o crescimento por cromatografia líquida em coluna c18 utilizando um comprimento de onda UV de 248 nm e medida de pH (o).

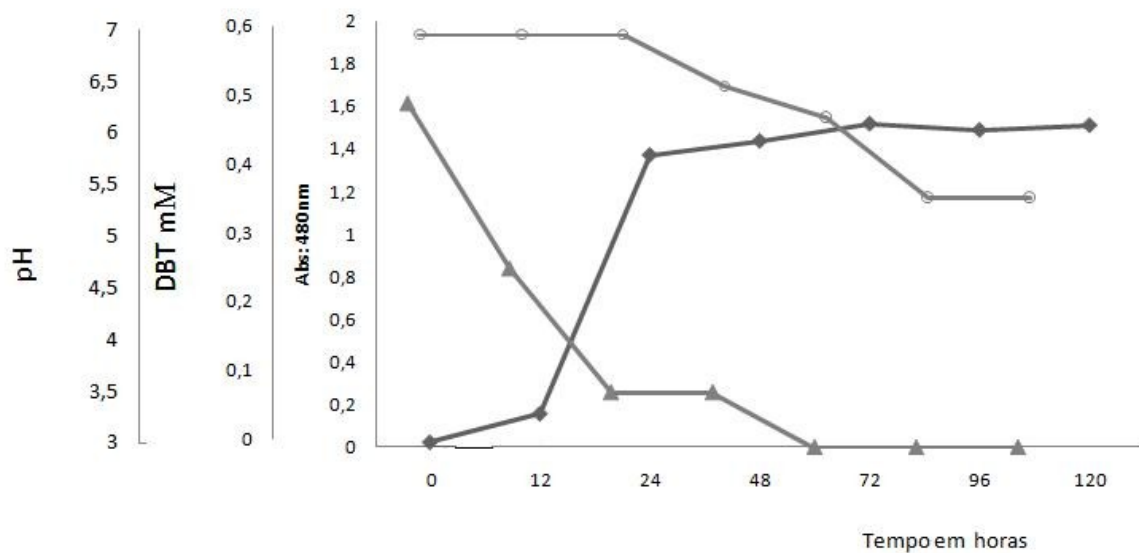


Figura 10: Medida do crescimento da linhagem 48 (♦) por densidade óptica a 480nm mostrando consumo de DBT (▲) durante o crescimento por cromatografia líquida em coluna c18 utilizando um comprimento de onda UV de 248 nm e medida de pH (o).

4.4. Ensaio com células íntegras

Os ensaios com as células íntegras mostraram que ambos os microrganismos apresentam grande habilidade na degradação do dibenzotiofeno em um curto período de tempo. A linhagem 48 degradou aproximadamente 60% do DBT (Figura 11) e a linhagem 59 cerca de 30% (Figura 11) sob as mesmas condições de cultivo por um período de 8 horas.

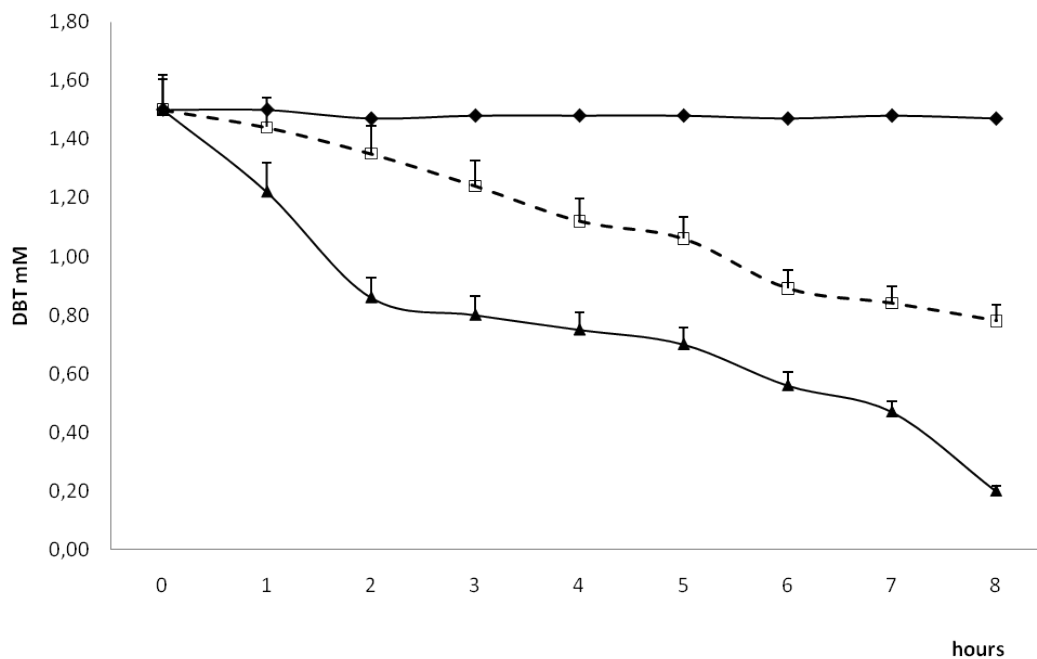


Figura 11: Consumo de DBT durante 8 horas de crescimento em meio BSM pelos isolados 48 (▲) e 59 (□) através de células íntegras. E como controle foi utilizado um meio livre de células (♦).

A partir da análise dos cromatogramas apresentados na figura 12 é possível visualizar a intensidade do processo de degradação da linhagem 48 e na figura 13 tem-se a representação deste processo de degradação através da linhagem 59.

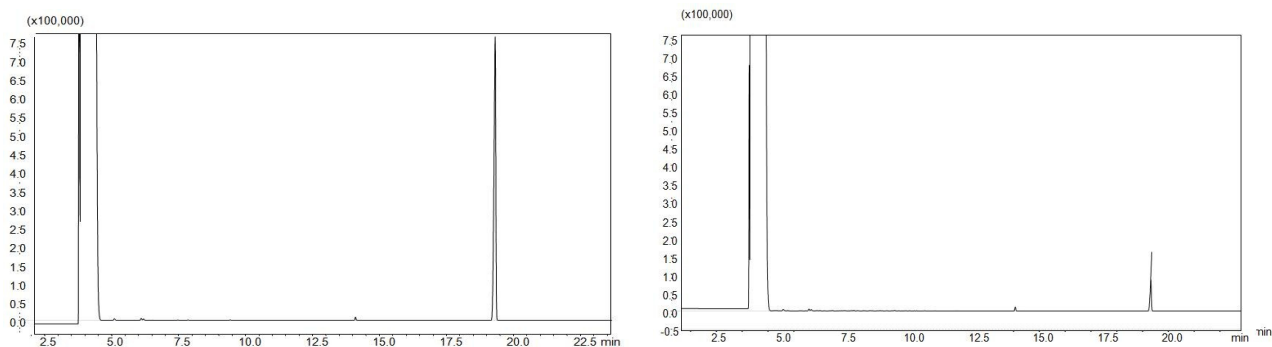


Figura12: Consumo de DBT em ensaio com células íntegras da linhagem 48 medidas em cromatógrafo gasoso, durante o período de 8 h de crescimento. O pico presente no tempo 19 min representa o DBT.

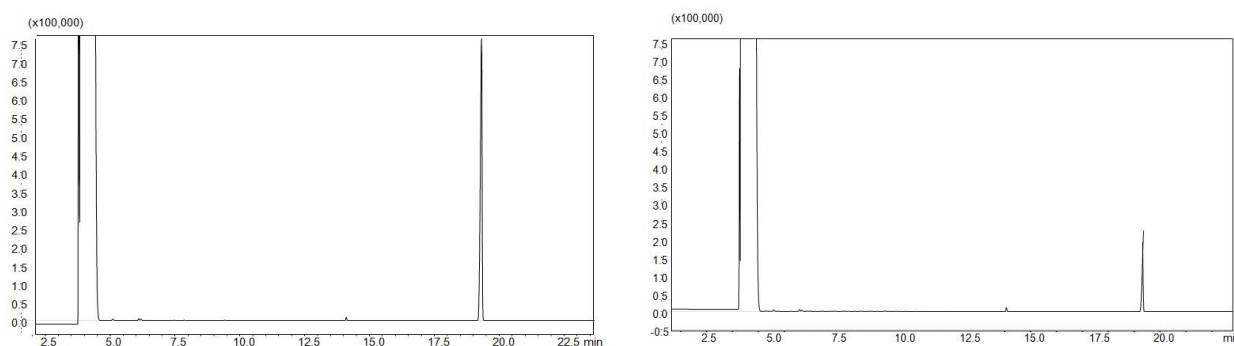


Figura 13: Consumo de DBT em ensaio com células íntegras da linhagem 59 medidas em cromatógrafo gasoso, durante o período de 8 h de crescimento. O pico presente no tempo 19 min representa o DBT.

4.5. Avaliação de isolados que apresentaram produção de HBP

Os ensaios com a cromatografia apresentaram um comportamento diferente de algumas linhagens bacterianas assim como da levedura quando comparado com os dados apresentados pelas linhagens 48 e 59, alvo principal deste estudo. Além da degradação do

DBT foi observada produção de hidroxibifenil (HBP), o metabólito final da via 4S de dessulfurização do DBT pela levedura (Figura 14).

Além da levedura outros nove isolados bacterianos apresentaram a produção de HBP, são eles: 03, 14B, 19, 25A, 31B, 33, 43, 49, 52.

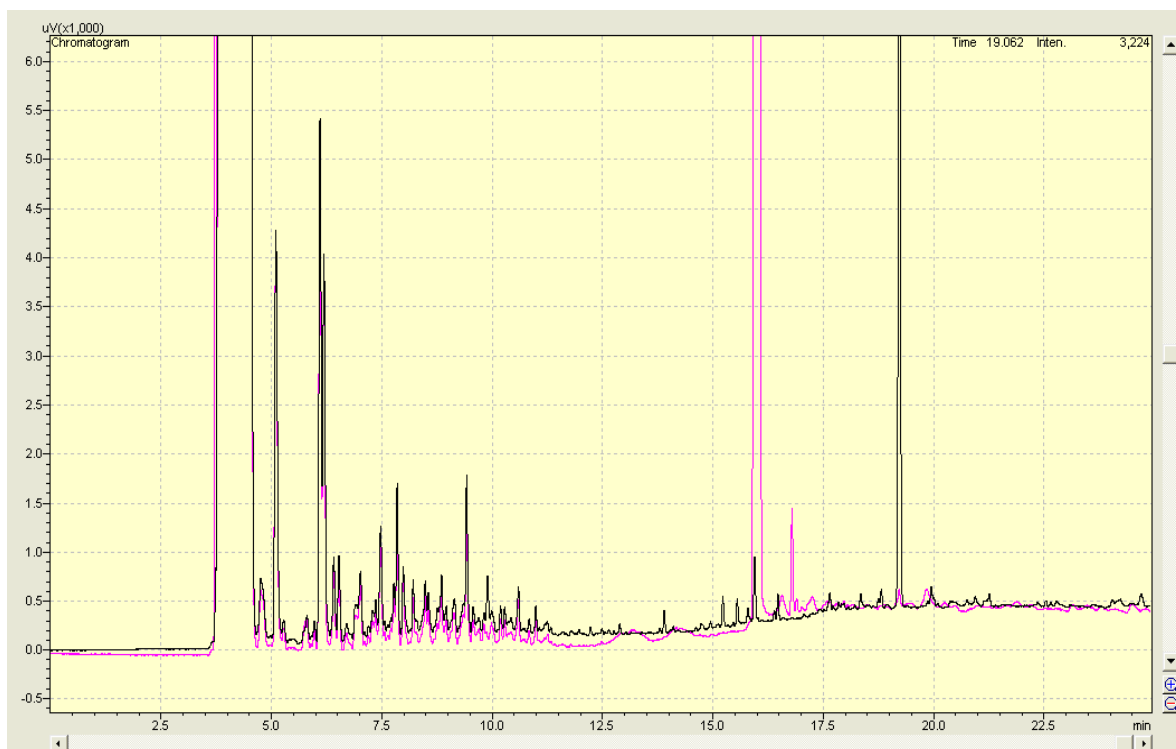


Figura 14: Cromatograma representando a degradação do DBT pela levedura. Em rosa padrão HBP 100 mM, apresentando o pico do HBP no tempo 16 min e em preto o cromatograma da levedura cultivada em meio YNB acrescido de DBT durante 72 horas de crescimento.

4.6. Degradação de hidrocarbonetos monoaromáticos

Além da verificação da capacidade de degradação de dibenzotiofeno, as linhagens 48 e 59 foram submetidas à *screening* em meio BTX, e ácido benzóico para averiguar a habilidade dessas linhagens para degradar hidrocarbonetos monoaromáticos. As linhagens 48 e 59 mostraram ser capazes de crescer em meio contendo BTX, evidenciando também seu potencial na biodegradação desses hidrocarbonetos.

Nos testes para identificação da via de degradação do catecol, foi observado que a linhagem 48 degrada o catecol pela via orto, e a linhagem 59 pela via meta. A clivagem do catecol via orto se caracteriza por uma coloração roxa após a reação de Rothera, a qual determina a presença de β -cetoadipado (Figura 15).



Figura 15: Orto clivagem do catecol

Já a via de clivagem meta caracteriza-se pela obtenção de coloração amarela devido ao acúmulo de semialdeído 2 – hidroximucônico. (Figura 16).



Figura 16: Meta clivagem do catecol

Na via orto, os hidrocarbonetos aromáticos são oxidados pelas dioxigenases a cis,cis-dihidrodiol, e o produto desta oxidação é convertido para catecol. Por outro lado na via meta o catecol é aberto através da enzima catecol 2,3- hidroxilase, transformando-se em semialdeído 2-hidroximucônico.

4.7. *Screening* Funcional de Biblioteca Metagenômica

Além dos ensaios com os isolados foi realizado também o *screening* de uma biblioteca metagenômica. Dos 500 clones analisados 375 foram positivos em meio LB com DBT. Já no meio BSM somente 20 foram positivos para o crescimento em meio BSM apresentando a capacidade de degradar o dibenzotiofeno.

5. DISCUSSÃO

Os microrganismos, ao longo da evolução, adquiriram uma incrível diversidade metabólica, sendo capazes de transformar vários compostos de origem natural ou xenobiótica. Levando-se em consideração que a quebra de compostos orgânicos naturais como a celulose e a lignina são exclusividades microbianas, fica claro a significância global da biodegradação aromática. Os microrganismos capazes de quebrar compostos orgânicos são naturalmente ferramentas biotecnológicas que atuam no ambiente, reduzindo a quantidade de compostos poluentes ou também formando novos compostos que podem ser utilizados por outros microrganismos durante a oxidação biológica. Apesar da grande diversidade, são os microrganismos aeróbios que proporcionam a maior parte da degradação de compostos orgânicos (BUGG e WINFIELD, 1996). As enzimas utilizadas na oxidação biológica de compostos naturais podem ser as mesmas utilizadas para degradação de xenobióticos (BUGG e WINFIELD, 1996). Seguindo esta linha de raciocínio, algumas indústrias, dentre elas as que trabalham com óleo bruto e seu refino, geralmente utilizam sistemas de tratamento denominados de *landfarm* e, mais recentemente, as “biopilhas”. Em ambos os sistemas, os resíduos oleosos são depositados sobre o solo que rotineiramente é enriquecido com NPK e aerado, favorecendo o metabolismo microbiano aeróbio. Nestes dois sistemas de tratamento, os microrganismos indígenas são altamente especializados e, em consórcio ou não, degradam uma variedade de compostos orgânicos presentes nas borras oleosas. Em 2007 Maciel et al. publicaram um estudo a respeito da potencialidade de microrganismos de *landfarm*, que possuem a capacidade de produzir substâncias biossurfactantes, sendo responsáveis pela solubilização e emulsificação do óleo, facilitando deste modo o ataque microbiano. Sabendo-se do enorme potencial biotecnológico das linhagens isoladas, este estudo procurou atender a uma das necessidades da indústria, a de estudos de remoção ou de transformação biológica de

compostos policíclicos aromáticos (PAHs) contendo enxofre. Isto porque tais compostos são tóxicos, de difícil degradação, e reduzem economicamente o valor dos combustíveis se estiverem presentes. Do ponto de vista ambiental, o enxofre quando liberado para atmosfera causa um dos piores danos – a chamada chuva ácida e conseqüentemente a corrosão.

Neste estudo o dibenzotiofeno foi utilizado como substrato para averiguação do potencial das bactérias isoladas por Maciel et al. 2007 e também de uma levedura isolada por Rezende et al. 2004. Inicialmente, todos os microrganismos mostraram crescimento. No entanto, como os microrganismos carregam reservas endógenas e para evitar falsos positivos, foi feita uma segunda passagem dos microrganismos para o mesmo meio contendo DBT. Nesta etapa provavelmente, os microrganismos tiveram menos reserva proveniente do meio de manutenção e tiveram disponíveis apenas os nutrientes provenientes do meio de crescimento contendo o DBT como única fonte de enxofre. Deste modo, foram consideradas positivas as bactérias oriundas da segunda passagem. Além disso, através da medida do pH durante o crescimento, foi observada acidificação do meio ao longo do tempo. O pH do meio tende a se acidificar devido a presença de compostos fenólicos gerados pela utilização do dibenzotiofeno pelo microrganismo. Os resultados sugerem que houve a quebra das ligações entre o elemento de enxofre e os demais compostos (KONISHI et al., 2000). Duas das linhagens bacterianas, 48 e 59 apresentaram forte crescimento com densidade ótica maior que 1.0. É provável que durante a oxidação do DBT, embora haja grande gasto energético, foram geradas substâncias ou subprodutos tais como carbono e outros constituintes celulares suficientes e aproveitados para formação de biomassa. No entanto, foi necessário determinar a via de degradação uma vez que pode estar ocorrendo a mineralização ou não do DBT. Isto porque na degradação do DBT muitas vezes ocorre o ataque específico aos compostos sulfurados sem alterar outros componentes, mantendo o esqueleto carbonado intacto (MALIK & CLAUS, 1976, KILBANE & BIELAGA, 1991). No caso da biorremediação o que se

sugere ter ocorrido com as linhagens 48 e 59, é que os microrganismos foram capazes de retirar o enxofre de maneira que o produto final dessa degradação fosse passível de mineralização. Esta sugestão é bastante fortalecida pelo fato de que durante o crescimento das duas linhagens em meio contendo DBT como única fonte de carbono e de enxofre não foi detectada, em nenhum momento, o composto intermediário da via 4S e o DBT foi completamente consumido. No meio de crescimento das linhagens 3, 14b, 19, 25A, 31B, 33, 43, 49 e 52 foi detectado um composto conhecido como HBP (hidroxibifenilo). Estas linhagens muito provavelmente apresentam a via 4s específica para a remoção do átomo de enxofre presente no DBT mantendo a estrutura de carbono intacta. Biotecnologicamente, estas linhagens que utilizam tal via assim como as linhagens descritas por GILBERT et al., 1998; KIRIMURA et al., 2002; KONISHI et al, 2000; MATSUI et al, 2000; TANAKA et al., 2002, são de grande interesse uma vez que podem ser utilizadas no tratamento dos combustíveis fósseis para a remoção apenas do enxofre e manutenção da força combustível. A presença de HBP foi também detectada nos ensaios com a levedura, que já havia sido alvo de estudo anterior, apresentando o potencial para conversão de nitrilas aromáticas em ácidos de alto interesse industrial (REZENDE et al. 2004.). Esse processo de remoção de enxofre sem alteração da estrutura carbonada, identificado principalmente pela produção do HBP, pode ser definido como dessulfurização propriamente dita. E apresenta uma grande importância econômica, sendo alvo de pesquisas detalhadas com vários gêneros de bactérias (GILBERT et al., 1998; KIMURA et al., 2002; KONISHI et al, 2000; MATSUI et al, 2000; TANAKA et al., 2002).

Apesar dos ciclos de compostos sulfurosos serem bem documentados estudos que enfoquem a biodegradação são muito limitados e escassos. As linhagens 48 e 59 produtoras de grande biomassa, observada após crescimento em DBT como única fonte de enxofre não produziram HBP durante o crescimento ou o mesmo não foi detectado. Ambas as curvas de

crescimento mostram a necessidade de adaptação com fase “lag” bem característica, sendo que a fase lag para a linhagem 59 foi bem mais longa do que para a linhagem 48 demonstrando alta necessidade de adaptação ao meio e ao substrato. Em ambas, o consumo de DBT só inicia e cessa praticamente quando as linhagens estão em fase logarítmica, demonstrando que as enzimas oxidativas estão atuando nesta fase. Já que a biodegradação é o melhor mecanismo de remoção de poluentes orgânicos, foi necessário determinar se estas linhagens estariam utilizando uma via destrutiva ou uma via mineralizadora e conseqüentemente biorremediadora. Uma via de metabolismo do DBT foi descrita por Kodama et al. em 1970. Nesta o DBT é convertido através de oxidação em vários compostos solúveis em água, o que inibe significativamente o crescimento microbiano e a oxidação do DBT. Acredita-se que esta via não ocorra nestas duas linhagens uma vez que foi observado bom crescimento das linhagens 48 e 59. Nesta via são atacados fragmentos do anel benzênico não ocorrendo à remoção do enxofre. Após estes achados foi realizado ensaio com células íntegras previamente crescidas em dibenzotiofeno, na intenção de verificar se ocorre a formação de HBP e também para observar se durante o ensaio o DBT seria consumido. De fato, durante este ensaio com as células das duas linhagens 48 e 59 foi detectado o pronto consumo do DBT e nenhuma formação de HBP, com rápido consumo de DBT em ensaio com células íntegras, sem produção de HBP por via 4s e sem inibição de crescimento pela via de Kodama. Desta forma, sugere-se fortemente a ocorrência de uma via de mineralização do composto pelas duas linhagens. As duas linhagens apresentaram uma taxa de degradação elevada quando comparada com *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 (GALLANGHER et al. 1993) o qual apresentou 10% de degradação do dibenzotiofeno. Pode-se ressaltar também a velocidade com que essas duas linhagens degradaram o composto. Seo et al (2006) apresentaram que *Arthrobacter* sp degrada 82% do DBT em 14 dias. Aliado a estes achados foi realizada uma triagem com três *primers* para os genes *dszA*, *dszB* e *dszC* descritos por

Duarte et al. (2001). Os DNAs das linhagens 48 e 59 só amplificaram para o gene *dszB* que codifica uma desulfinaase responsável pela conversão de 2'-hidroxibifenilo-2-sulfinato a 2-hidroxibifenilo com produção de sulfato característico da via 4 S. Um fato interessante é que o DNA da levedura foi amplificado para os genes *dszB* e *dszC* que é uma monoxigenase que participa da conversão de DBT a DBT sulfóxido e posteriormente a DBT sulfona, descartando definitivamente a linhagem 48 e a levedura da via destrutiva de Kodama. As linhagens 48 e 59 metabolizaram benzeno, tolueno, xileno e ácido benzóico via formação de catecol. O ácido benzóico é o produto final de uma via de dessulfurização do DBT, embora não detectado em cromatografia. Esta via foi descrita pela primeira vez por Van Afferdern em 1990, onde o DBT é convertido a benzoato e sulfito e o benzoato é mineralizado a CO₂ e H₂O. Na clivagem do catecol após crescimento em benzoato, benzeno, tolueno ou xileno a linhagem 48 apresenta ortoclivagem. Nesta os hidrocarbonetos aromáticos são oxidados pelas dioxigenases a *cis,cis*-dihidrodiol, e este é convertido para catecol. O anel aromático dihidroxilado é, então, aberto por uma orto-clivagem oxidativa através da enzima catecol 1,2- hidroxilase, resultando em ácido *cis, cis*-mucônico (SMITH, 1990). Este é metabolizado por meio da enzima lactonizante do muconato a muconolactona, e esta, oxidativamente a ácido *b*-ceto adipato, o qual é aberto oxidativamente para o ciclo tricarboxílico intermediário comum, a ácido succínico, e Acetil-CoA. Alternativamente, a linhagem 59 apresenta a via de metaclivagem do anel de catecol caracterizada pela coloração amarela devido ao acúmulo de semialdeído 2-hidroximucônico. Na ortoclivagem o catecol é aberto através da enzima catecol 2,3- hidroxilase, transformando-se em semialdeído 2-hidroximucônico. Pela enzima semialdeído 2-hidroximucônico hidrolase este pode ser convertido a 2-oxo-4-pentanoato, ou pela semialdeído 2-hidroximucônico desidrogenase a 4-oxalocrotonato (enol), o qual é modificado a oxalocrotonato (cetona) pela oxalocrotonato tautomerase. Este composto é transformado pela enzima oxalocrotonato descarboxilase em 2-oxo-4 pentanoato. A enzima 2-

oxo-4- pentenoato hidratase converte o 2-oxo-4-pentanoato em 4-hidroxi-2-oxovalerato, a qual chega a piruvato e acetaldeído pela ação da enzima 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolase. PAUL et al. (2004) descreveram a utilização da via orto por duas linhagens de bactérias *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 e *Burkholderia cepacia* RKJ200 na degradação de um pesticida. Arenghi et al. (2001) registraram o mecanismo de regulação da meta clivagem por *Pseudomonas stutzeri* OX1. KUKOR & OLSEN (1991) também descreveram a regulação da meta clivagem do catecol por *Pseudomonas pickettii* PKO1. Em contrapartida, Murray & Williams (1974) registraram que *Pseudomonas putida* NCIB 10015 metaboliza fenóis e cresóis pela via meta, e o benzoato pela via orto, mostrando que uma mesma linhagem bacteriana é capaz de realizar as duas vias metabólicas. O destino dos hidrocarbonetos, além da produção de CO₂ na degradação total, pode também oferecer caminhos alternativos. Os hidrocarbonetos podem ser armazenados, transformados em biomassa (BERTRAND et al., 1983; DUMENIL et al. 1988), ou convertidos em outros subprodutos. Em longo prazo, a maioria dos hidrocarbonetos é convertida a CO₂; entretanto, os produtos parcialmente oxidados podem ser mais tóxicos e mutagênicos que o hidrocarboneto e, portanto, existe a preocupação de que ocorra um aumento temporário na toxicidade e mutagenicidade durante o processo de biodegradação (WANG et al., 1990).

Tomando-se estes achados em conjunto pode-se sugerir fortemente que as duas linhagens testadas fazem a dessulfurização e mineralização do DBT pela mesma via descrita por Van Afferdern seguido da oxidação do benzoato a CO₂ e H₂O via ortoclivagem do anel de catecol, 48, e metaclivagem do anel de catecol pela linhagem 59.

Em 2007, Maciel et al. classificaram a linhagem 48 como Uncultured soil bacterium AY326600.1 e a linhagem 59 como *Achromatium oxaliferum* L79967, via amplificação com primer Universal para o rDNA 16S e posteriormente sequenciadas. As duas linhagens são boas produtoras de biossurfactantes e agora sabe-se que promovem biodessulfirização através

da mineralização do DBT. Provavelmente a linhagem 48 pode se tratar de uma nova espécie e deverá passar por outros processos de identificação. No caso de *Achromatium oxaliferum* foram encontrados relatos que a presença de inclusões de enxofre sugere seu envolvimento no ciclo do enxofre de sedimentos (LA RIVIE`RE, et al 1992). Outros achados têm mencionado que esta espécie é capaz de mediar a oxidação de enxofre a sulfato o que consiste com estudos filogenéticos que colocam esta bactéria na subdivisão g da classe Proteobactéria, intimamente relacionada a bactérias oxidadoras de enxofre. (GLOCKNER et al 1999, GRAY, et al 1997, GRAY, et al 1999, HEAD et al, 1996)

Quinhentos clones obtidos a partir de biblioteca metagenômica construída a partir de vetores do tipo fosmídeo com DNA de *landfarm* foram submetidos à *screening* em meio contendo DBT para verificação da expressão enzimática. A princípio os clones crescidos em meio LB contendo DBT foram considerados falsos positivos uma vez que o meio LB possui enxofre em sua composição e os microrganismos podem estar utilizando o enxofre do meio e não do DBT. Então, se optou por repique dos clones em placas de Elisa contendo meio BSM acrescido de DBT como única fonte de carbono e de enxofre. A obtenção do crescimento em 20 clones foi considerada como expressão das enzimas oxidativas necessitando prosseguir ao sequenciamento. A intenção foi de acessar o potencial biotecnológico de populações microbianas em busca da expressão da atividade biológica de interesse na linhagem hospedeira de *Escherichia coli* (SINGH et al., 2009). Esta estratégia é denominada como triagem funcional, oferece as vantagens de poder acessar sequências gênicas ainda totalmente desconhecidas e de detectar apenas enzimas que estão ativas. O método de triagem de bibliotecas metagenômicas baseado em sequência é mais conservador, uma vez que os oligonucleotídeos necessários para identificar os genes-alvo, utilizando PCR ou métodos de hibridização, são desenhados com base em regiões conservadas das sequências de aminoácidos, de forma a garantir uma alta probabilidade de pareamento com sequências

gênicas desconhecidas presentes no ambiente. Esta estratégia é atraente, pois qualquer gene que apresente homologia com a sequência de DNA utilizada será detectado, independente da sua expressão na célula hospedeira (LORENZ et al., 2002, SINGH et al., 2009). Portanto, a estratégia funcional de triagem de bibliotecas metagenômicas permite o estudo de consórcios de clones (combinação de múltiplos clones) na busca da atividade catalítica desejada.

Neste estudo, fica evidenciado a importância e aplicabilidade de microrganismos isolados por método convencional e suas potencialidades.

6. CONCLUSÃO

Através dos estudos realizados ficou claro o grande potencial para a degradação do DBT pelas linhagens 48 e 59. Estas linhagens mostraram-se ferramentas importantes para aplicação em processos de biorremediação de ambientes contaminados por enxofre e hidrocarbonetos monoaromáticos (BTX). Uma vez que, retiraram por completo o conteúdo de enxofre no meio em um período máximo de 96 horas e se mostraram capazes de mineralizar hidrocarbonetos monoaromáticos.

Além dessas duas linhagens com potencial para biorremediação foram encontradas nove linhagens bacterianas e uma levedura, que não só consumiram o DBT como também produziram por meio da metabolização do DBT o HBP, que é o produto final da via 4 “S”. Isto as torna linhagens promissoras para estudos que permitam um melhor detalhamento da forma de degradação, uma vez que este processo apresenta grande interesse por parte da indústria petroquímica.

O *screening* funcional da biblioteca metagenômica de solo de *landfarm* revelou a presença de clones capazes de utilizar o dibenzotiofeno como fonte de carbono e enxofre. O que serve de base para a realização de outros trabalhos que visem um maior detalhamento das enzimas envolvidas nesse processo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, L.; MESQUITA, E.; GÍRIO, F. M. Dessulfurização bacteriana de combustíveis fósseis. *Bol. de Biotec.*, v. 62, p. 3-7, 1999.

ARENGHI, F. L. G.; BERLANDA, D.; GALLI, E.; SELLO, G.; BARBIERI, P. Organization and Regulation of *meta* Cleavage Pathway Genes for Toluene and *o*- Xylene Derivative Degradation in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, nº 7, p. 3304–3308, 2001.

BAKER, K. H.; HERSON, D.S. Bioremediation. New York: McGraw-Hill, Inc. 1994. 375p.

BUGG, T. D. H. & WINFIELD, C. J. Enzymatic cleavage of aromatic rings: mechanistic aspects of the catechol dioxygenases and later enzymes of bacterial oxidative cleavage pathways. *Natural Product Reports*, 1998.

CHANG, B.V.; SHIUNG, L.C.; YUAN, S.Y. Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. *Chem*, v. 42, p. 356-365, 2002

CONSTANTI, M.; GIRALT, J. & BORDONS, A. Desulphurization of dibenzothiophene by bacteria. *Word J. Microbiol. Biothechnol.* V. 10, p. 510-516. 1994

CORSEUIL, H. X.; HUNT, C. S.; SANTOS, R. C. F.; ALVAREZ, P. J.J. The Influence of the Gasoline Oxygenate Ethanol on Aerobic and Anaerobic BTX Biodegradation. *Water Research*, Londres - Reino Unido, v.32, n.7, p. 2065-2072, 1998.

CURY, J. C. Atividade microbiana e diversidade metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo. *Dissertação de mestrado*, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP. 95p, 2002

DAGLEY S. A biochemical approach to some problems of environmental pollution. *Assays Biochem.* v. 11, p. 81-138. 1975

DENOME, S.A; OLSON, E.S.; YOUNG, K.D. Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. Strain IGTS8. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 837-2843, 1993.

DUARTE, G.F.; ROSADO, A.S.; SELDIN, L.; ARAUJO, W.; ELSAS, J.D. Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species crying dibenzothiophene desulfurization (dsz) genes. *App. Environ. Microbiol*, v. 67, n. 3, p. 1052-1062, 2001.

EARLE, M.J.; ESPERANÇA, J.M.S.S; GILEA, M.A.; LOPES, J.N.C.; REBELO, L.P.N.; MAGEE, J.W., et al. The distillation and volatility of ionic liquids. *Nature*; v. 4, p. 39:831. 2006.

FREEMANTLE M. Designer liquids in polymer systems. *Chem Eng News*. v. 9, p. 18:26. 2004.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. *Biotechnologia: Ciência & Desenvolvimento*. v. 3, p. 12-16. 2000.

GALLANGHER, J.R.; OLSON, E.S.; STANLEY, D.C. Microbial desulfurization of dibenzothiophene: a sulfur-specific pathway. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.107, p. 31-36, 1993.

GILBERT, S. C.; MORTON, J.; BUCHANAN, S.; OLDFIELD, C.; MCROBERTS, A. Isolation of a unique benzothiophene-desulphurizing bacterium, *Gordonia* sp. strain 213E (NCIMB 40816), and characterization of the desulphurization pathway. *Microbiology*, v.144, p. 2545–2553, 1998.

GLÖCKNER, F. R., H.-D. BABENZIEN, J. WULF, and R. AMANN. Phylogeny and diversity of *Achromatium oxaliferum*. *Syst. Appl. Microbiol.* v.22, p. 28–38, 1999.

GRAY, K.A.; POGREBINSKY, O; MRACHKO, G.T.; SQUIRES, C.H. Biochemical characterization of the biodesulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. Strain IGTS8 - potential role in fossil fuel desulfurization In: (conference abstract). *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc., 212 Meet., Pt.1*, p. BIOL 054, 1996.

GRAY, N. D., PICKUP R. W., JONES J. G. and HEAD, I. M. Ecophysiological evidence that *Achromatium oxaliferum* is responsible for the oxidation of reduced sulfur species to sulfate in a freshwater sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 63, p.1905–1910. 1997.

GRAY, N. D., R. HOWARTH, R. W. PICKUP, J. G. JONES, AND I. M. HEAD. Substrate uptake by uncultured bacteria from the genus *Achromatium* determined by microautoradiography. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 65, p. 5100–5106. 1999.

HEAD, I. M., N. D. GRAY, K. J. CLARKE, R. W. PICKUP, AND J. G. JONES. The phylogenetic position and ultrastructure of the uncultured bacterium *Achromatium oxaliferum*. *Microbiology.* v. 142, p. 2341–2354. 1996.

HUANG, C.; CHEN, B.; ZHANG, J.; LIU, Z.; LI, Y. Desulfurization of Gasoline by Extraction with New Ionic Liquids. *Energy Fuels*, v 18, n 6, 1862-1864. 2004.

HUGENHOLTZ, P., GOEBEL, B. M. & PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* v. 180, p. 4765–4774. 1998.

IZUMI, Y., OHSHIRO, T., OGINO, H., HINE, Y., SHIMAO, M. Selective desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1. *Appl. Environ. Microbiol.* v.60, p.223–226. 1994.

KANALY, R. A. & HARAYAMA, S. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *Journal of Bacteriology*, v. 182, n° 8, p. 2059–2067, 2000.

KILBANE, J.J.II Microbial biocatalyst developments to upgrade fossil fuels. *Current Opinion in Microbiology*, v. 17, p. 305-314. 2006.

KILBANE, J. J.; BIELAGA, B.A. Genetic study of biodesulfurization p.2/15-2/32. In S. Yunker (ed), Proceedings: 1990 First International Symposium on Biological Processing of Coal and coal-derived Substances. Electric Power Research Institute, Inc., Palo Alto, Calif. 1991.

KILBANE, J. J.; MAKI, AKIN, C.; SRIVASTAVA, V. J. Microbial coal desulfurization, solubilization and gasification research at IGT, p.2/87-2/105. In s. Yunker (ed), Proceedings: 1989 Symposium on Biological Processing of Coal and coal-derived Substances. Electric Power Research Institute, Inc., Palo Alto, Calif. 1990.

KIRIMURA, K.; FURUYA, T.; SATO, R.; ISHII, Y.; KINO, K.; USAMI, S. Biodesulfurization of naphthothiophene and benzothiophene through selective cleavage of carbon-sulfur bonds by *Rhodococcus* sp. strain WU-K2R. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 68, p. 3867–3872. 2002.

KODAMA, K.; UMEHARA, K.; SHIMAZU, K.; NAKATANI, S.; MINODA, Y.; YAMADA, K. Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 37, p. 45-50, 1973.

KONISHI, J.; ONAKA, T.; ISHII, Y.; SUZUKI, M. Demonstration of the carbon-sulfur bond targeted desulfurization of benzothiophene by thermophilic *Paenibacillus* sp. strain A11-2 capable of desulfurization of dibenzothiophene. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 187, p. 151–215, 2000.

KRAWIEC, S. Bacterial desulfurization of thiophenes: screening techniques and some speculations regarding the biochemical and genetic bases. *Dev. Ind. Microbiol.*, v. 31, p. 103-114, 1990.

LA RIVIE`RE, J. W. M.; K. SCHMIDT. Morphologically conspicuous sulfur-oxidizing eubacteria, p. 3934–3947. *In* A. Balows, H. G. Tru`per, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.) *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria; ecophysiology, isolation, identification, applications*, 2nd ed., v. 4. Springer-Verlag, New York, 1992.

LYNCH, J.M. and HOBBIES, J.E. *Microorganism in action: concepts and application in microbial ecology*, *Blackwell Scientific Publication*, London. (1978)

MACIEL, B. M. Estudos prospectivos de microrganismos de solo de *landfarm* com potenciais aplicações em estratégias de biorremediação de áreas contaminadas por petróleo. *Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular*, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - BA, 2004.

MACIEL, B.M.; DIAS, J.C.; DOS SANTOS, A.C.; FILHO, R.C.; FONTANA, R.; LOGUERCIO, L.L.; REZENDE, R.P. Microbial surfactant activities from a petrochemical landfarm in a humid tropical region of Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*. V. 53, n. 8, p. 937-43, 2007

MALIK, K. A.; D. CLAUS. Microbial degradation of dibenzothiophene, abstr. 23.03, p. 421. In H. Dellweg, (ed.), Abstracts of the Fifth International Fermentation Symposium. Berlin, Germany. 1976.

MATSUI, T.; TOSHIMITSU, O.; YASUHIRO, T.; TOSHIYUKI, T.; MASANORI, S.; RYUICHIRO, K.. Alkylated benzothiophene desulfurization by *Rhodococcus* sp. strain T09. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 64, p. 596–599, 2000.

MOHEBALI G, BALL AS, RASEKH B, KAYTASH A. Biodesulfurization potential of a newly isolated bacterium *Gordonia alkanivorans* RIPI90A. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 578-584, 2008.

MORGAN, P. & WATKINSON, R.J. Biodegradation of components of petroleum. In: *Biochemistry of Microbial Degradation* (C. Ratledge, ed.), Kluwer Academic Publishers. p. 1 – 31. 1994

MURRAY, K. & WILLIAMS P. A. Role of Catechol and the Methylcatechols as Inducers of Aromatic Metabolism in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, v. 117, n. 3, p. 1153-1157, 1974.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Leeuwenhoek*. v. 73, p. 127-141.1998.

REZENDE, R.P.; DIAS, J.C.T.; MONTEIRO, A.S.; CARRAZA, F.; LINARDI, V.R. The use of acetonitrile as the sole nitrogen and carbon source by *Geotrichum* sp. *JRI. Braz. J. Microbiol.* v. 35, 2004

RYTKONEN J., ITAVAARA M., PAULSEN J. E. The Improvement of oil biodegradation on the shoreline. *In: Proceedings of the 7th International Offshore and Polar Engineering Conference, Honolulu, USA, 2(1):25-30, 1997.*

SCRAMIN, S.; DENTZIEN, A. F. M.; MELO, I. S. Indução da enzima pirocatecase por *Acinetobacter baumannii* envolvida na biodegradação do herbicida Diuron. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 13, pp. 113 – 118, 2003.

SEO, J.S.; KEUM, Y.S.; CHO, I.K.; LI, Q.X. 2006. Degradation of dibenzothiophene and carbazole by *Arthrobacter* sp. P1-1. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol 58, p 36-43.

SOLEIMANI, M.; BASSI, A.; MARGARITIS, A. Biodesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels. *Biotechnology Advances*. V. 25, p. 570 – 596. 2007.

SPEIGHT, J. G. The desulfurization of heavy oils and residua. Marcel Dekker, Inc., New York. 1981.

TANAKA, Y.; MATSUI, T.; KONISHI, J.; MARUHASHI, K.. Biodesulfurization of benzothiophene and dibenzothiophene by a newly isolated *Rhodococcus* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 59, p. 325–328. 2002.

VAN AFFERDEN, M.; TAPPE, D.; BEYER, M.; TRÜPER, H.G.; KLEIN, J. Biochemical mechanisms for the desulfurization of coal-relevant organic sulfur compounds. *Fuel*, v. 72, p. 1635-1643. 1993.

WANG P, KRAWIEC S. Desulfurization of dibenzothiophene to 2 hydroxybiphenyl by some newly isolated bacterial strains. *Archives Microbiology*, v. 161, p. 266-271. 1994.

WANG, X.; YU, W.; BARTHA, R., Effect of Bioremediation on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Residues in Soil. *Environmental & Science Technology*, v. 24, p. 1086 – 1089. 1990.

YU, S. H.; KE, L.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Y. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environment International*, v. 31, p. 149-154. 2005.

Composição do petróleo, Disponível em:
<<http://www.cepa.if.usp.br/energia/energia1999/Grupo1A/composicao.html>>. Acesso em: 12 dez. 2009.

Centro de estudos de petróleo – UNICAMP. Disponível em:
<http://www.cepetro.unicamp.br/petroleo/index_petroleo.html>. Acesso em: 12 dez. 2009.