



**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR RAPD  
DE BACTÉRIAS PROVENIENTES DE SOLO E LODO  
CONTAMINADO COM PETRÓLEO**

**Ramon Gomes da Silva**

**Rio de Janeiro  
2010**

**RAMON GOMES DA SILVA**

Aluno do curso de Biotecnologia  
Matrícula 0623800121

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR RAPD  
DE BACTÉRIAS PROVENIENTES DE SOLO E LODO  
CONTAMINADO COM PETRÓLEO**

Trabalho de conclusão de curso II, TCC II, apresentado ao curso de graduação em Tecnologia da Biotecnologia, da UEZO como parte dos requisitos para grau de Tecnólogo em Biotecnologia, sob a orientação de Fernanda Romanholi Pinhati.

**Rio de Janeiro  
Janeiro de 2010**

Silva, Ramon Gomes

Análise da variabilidade genética por rapd de bactérias provenientes de solo e lodo contaminado com petróleo/ Ramon Gomes da Silva. – Rio de Janeiro, 2010.

42f.

Monografia (Graduação em tecnologia da Biotecnologia) – Centro Universitário Estadual da Zona Oeste – UEZO, 2010.

Orientador: Fernanda Romanholi Pinhati

1. Análise da variabilidade genética 2. RAPD 3. Comunidade bacteriana de solo 4. Comunidade bacteriana de lodo 5. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 5. Petróleo. I. Pinhati, Fernanda Romanoli (Orient.). II. Universidade Estadual da Zona Oeste. III. Título.

# **ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR RAPD DE BACTÉRIAS PROVENIENTES DE SOLO E LODO CONTAMINADO COM PETRÓLEO**

Este trabalho de Graduação foi analisado e aprovado com  
Grau: 10 (DEZ)

Elaborado por Ramon Gomes da Silva  
Aluno do curso de Tecnologia em Biotecnologia da UEZO

Rio de Janeiro, 14 de Janeiro de 2010

Judith Liliana Solórzano Lemos  
Membro, Doutora

Alexander Machado Cardoso  
Membro, Doutor

Fernanda Romanholi Pinhati  
Presidente, Mestre

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL  
JANEIRO DE 2010

## DEDICATÓRIA

Dedico esta obra à minha família, em especial à minha mãe, meu pai, minha irmã, minha avó e meus amigos que para mim são como irmãos. A todas as pessoas que acreditaram em mim, mesmo em momentos de dificuldades em que nem eu acreditei e que contribuíram de alguma forma me dando força e coragem quando eu mais precisei. À minha estrela que sempre esteve comigo e minha orientadora que nunca desistiu de mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado, me auxiliando, consolando e me dando forças para seguir em frente, sei que foi com sua ajuda que consegui tudo o que tenho e por sua ajuda cheguei onde estou.

Agradeço à minha mãe, Lêda, por me ensinar a viver e me acolher sempre, por ser minha amiga e acreditar em mim, por me ensinar à bondade e o amor que tanto faltam nesse mundo, por ter me dado a esperança e a determinação necessárias e por estar sempre ao meu lado, sei que nada seria e nada teria feito, se não à tivesse como modelo, serei o homem mais feliz se conseguir ser metade do que ela é. Só consigo sorrir hoje porque ela me ensinou a ser feliz e a sempre seguir em frente, mesmo quando a tarefa parece ser impossível.

Agradeço ao meu pai, Marcos, por todos os momentos de risadas e por todo o ensinamento, mesmo que às vezes de forma indireta, que me ofereceu. Por acreditar em mim e por me ensinar que a coragem e a determinação de um homem podem levá-lo a qualquer lugar que desejar. E mesmo com todas as dificuldades que passamos, ele se mostrou firme como um pai deve ser e carinhoso algumas vezes que precisei. Obtive minha coragem e determinação dele e sei que tenho muito que aprender ainda.

Agradeço à minha irmã, Rafaella, por todos os momentos sejam eles tristes ou felizes, das risadas e por sempre estar comigo, por me fazer feliz e ser amável como irmã, por me suportar quando estava mal e por me proporcionar momentos ótimos e incomparáveis. Tenho muito orgulho dela e quero sempre estar ao seu lado, pois sei que ela vai sempre estar ao meu.

Agradeço à minha avó, Nilsa, que como ela mesmo diz, é minha mãe duas vezes, por me dar todo o carinho e ensinamentos que hoje faço uso. Por todos os quindins e todos os cafunés e por sempre estar lá quando precisei, tenho muito orgulho em ser seu neto, e sou muito feliz por poder morar tão

perto e vê-la sempre que posso. Sei que ela tem tanto orgulho de mim quanto eu tenho dela. Esta obra é uma pequena dedicatória a todo o esforço e tudo o que ela acreditou que sou.

Agradeço aos meus amigos que considero como parte de minha família, meus irmãos, agradeço toda compreensão nos momentos que estive longe e por sempre me receberam de braços abertos, mesmo quando passávamos por momentos ruins, por sempre poder contar com eles em qualquer momento, sejam eles bons ou ruins. Meus amigos são minha maior riqueza e um dos meus maiores orgulhos. Obrigado a todos!

Agradeço à minha namorada, Bianca, por me acolher e por me acalmar, por acreditar em mim, por sofrer e por sorrir comigo, por me ajudar sempre que eu precisei lendo e relendo, sendo sempre crítica e procurando melhorar meu trabalho. Agradeço aos momentos de paz e a todo amor que eu fui proporcionado, pela compreensão nos momentos que não pude estar presente e por todos os sorrisos que me fazem tão feliz. Obrigado Estrela.

Agradeço a cada um da minha turma de biotecnologia, conhecida também como “biotec de elite”, por sempre suportar minhas neuroses com provas e com a monografia, pois só eles sabem de verdade o que nós precisamos passar para chegar até aqui, pelos momentos felizes de amizade, pelas pizzas da parmê e pelas idas ao shopping, por me ensinar a ser um homem melhor, pelas brigas e pelas alegrias, pelas amizades eternas formadas e pelos colegas que carregarei para sempre em meu coração.

Agradeço à minha orientadora, Fernanda, mesmo não tendo palavras para expressar o quão grato eu sou. Ela me ensinou muito nesses anos que passamos trabalhando juntos, foram momentos muito felizes, assim como tristes, que passamos superando todos os obstáculos e dando a volta por cima. Sou um profissional muito melhor graças a seus esforços, espero que consigamos trabalhar mais uma vez juntos. Ela se tornou uma irmã mais velha para mim. Obrigado “Chefe”.

Agradeço a todos os meus professores por todo conhecimento ensinado, por todo o tempo compartilhado e por toda a ajuda que me foi dada, em especial à professora Liliana e ao professor Alex por terem aceitado meu convite e assim disponibilizado seu tempo para a avaliação e enriquecimento do meu trabalho.

Agradeço a todos os integrantes do laboratório 545, de biologia molecular e bioquímica do fundão, que me acolheram e me ensinaram tudo o que eu sei hoje. Agradeço ao professor Joab Trajano Silva e a professora Vânia Margaret Flosi Paschoalin por terem me dado essa oportunidade única de trabalhar em seu laboratório. Agradeço ao amigo Eduardo Mere, por ter me ajudado no início e sempre em toda a fase em que eu trabalhei dentro do laboratório.



## Lista de tabelas e figuras

Tabela 1: Seqüência e conteúdo de GC dos oligonucleotídeos iniciadores marcadores RAPD.....	13
Tabela 2: Análise da viabilidade dos isolados nas diferentes fontes de carbono adicionados individualmente ao meio.....	23
Figura 1: Esquema da reação de RAPD gerando diferentes produtos.....	7
Figura 2: Otimização da Reação de RAPD em função da concentração de DNA.	
Linhas M) marcador de peso molecular de 100pb DNA Ladder (Promega); 1) 10ng DNA 1A; 2) 20ng DNA; 1A 3) 30ng DNA 1A; 4) 10ng DNA N; 5) 20ng DNA N; 6) 30ng DNA N.....	16
Figura 3: Amplificação de DNA de isolado de solo (4A) com o primer OPA-02, para verificar a condição ótima de reação, em função da concentração de íons $Mg^{++}$ e <i>Taq</i> .....	17
Figura 4: Perfil de RAPD dos isolados de solo com os <i>iniciadores</i> OPA-2 M) marcador de peso molecular de 100pb DNA Ladder (Promega); 1) A; 2) F; 3) N; 4) 1A; 5) 1B; 6) 4A; 7) 4B; 8) 9B; 9) 9C; 10) 6V; 11) 1C; 12) 2C; 13) 3C; 14) 4B; 15) 5B; 16) 6V; 17) 5B; 18) 7B.....	18
Figura 5: Dendrograma obtido através da matriz de similaridade genética entre as bactérias provenientes de solo e lodo contaminado com petróleo a partir de dados obtidos pela técnica de RAPD utilizando o método UPGMA.....	19
Figura 6: Crescimento de colônias e contagem de UFC dos diferentes isolados selecionados para avaliação da viabilidade celular com diferentes fontes de carbono. A – Isolado A em antraceno; B – Isolado F em antraceno; C – Isolado N em fenantreno; D – Isolado 1C em tolueno.....	22
Figura 7: Gráfico referente à análise da viabilidade do isolado 5T, demonstrando sua versatilidade metabólica nas diferentes fontes de carbono adicionadas individualmente ao meio no tempo de 14 dias.....	24

## Lista de abreviaturas e siglas

<i>bp</i>	Pares de bases
<i>DNA</i>	Ácido desoxirribonucléico
<i>dNTP</i>	Didesoxiribonucleotideo tri-fosfato
<i>EDTA</i>	Etileno-diamino-tetracetato
<i>g</i>	Grama
<i>HPAs</i>	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
<i>LB</i>	Luria Bertani
<i>ml</i>	mililitro
<i>mM</i>	milimolar
<i>OPA e OPD</i>	Operon Technologies Kit A e D
<i>PCR</i>	Polimerase Chain Reaction
<i>p/v</i>	Peso por volume
<i>RAPD</i>	Amplificação Polimórfica do DNA de forma aleatória
<i>REGAP</i>	Refinaria de Petróleo Gabriel Passos

## Resumo

O petróleo é uma mistura de substâncias provenientes de matéria orgânica que apresenta em sua maioria compostos formados por carbono e hidrogênio. Esses compostos são utilizados por microrganismos que tem a capacidade de utilizá-los como fonte de alimento, realizando concomitantemente a restauração de áreas impactadas. Dentre as diversas ferramentas utilizadas para análise e comparações entre os microrganismos presentes em um ambiente, o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), apresenta grande destaque por sua praticidade e baixo custo. Nesse trabalho 15 bactérias provenientes de solo impactado com petróleo e 3 de efluente de refinaria de petróleo, foram analisadas buscando relações de similaridade genética, por meio do RAPD, avaliando também a capacidade desses microrganismos em degradar diferentes compostos presentes no petróleo.

**Palavras-chave:** Petróleo, comunidade bacteriana de lodo, comunidade bacteriana de solo, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, RAPD.

## **Abstract**

The oil is a mixture of substances from organic matter that has mostly composed formed by carbon and hydrogen. These compounds are used by microorganisms that have the ability to use it as a source of food, making concomitant restoration of impacted areas. Among the various tools used to identify and carry comparisons between the microorganisms present in the environment, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), presents great emphasis on its practicality and low cost. In this study 15 bacteria from soil impacted with oil and 3 from effluent of refinery oil, were analyzed seeking relations of genetic similarity by means of RAPD, also evaluating the ability of these microorganisms to degrade different compounds in petroleum.

**Keywords:** Oil, sludge bacterial community, bacterial community of soil, polycyclic aromatic hydrocarbons, RAPD.

## SUMÁRIO

Lista de tabelas e figuras .....	vii
Lista de abreviaturas e siglas .....	viii
Resumo .....	ix
Abstract.....	x
Introdução .....	1
1.1    Diversidade microbiana em solo e lodo.....	2
1.2    Análise da variabilidade genética por técnica de RAPD ( <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> ).....	5
1.3    Bioinformática .....	8
2 Objetivo Geral.....	10
2.1    Objetivos Específicos .....	10
3 Materiais e Métodos.....	11
3.1    Origem dos microrganismos estudados .....	11
3.2    Cultivo de bactérias e extração de DNA .....	11
3.3    Otimização das reações de RAPD.....	12
3.4    Análise da variabilidade por RAPD .....	12
3.5    Análise de similaridade.....	13
3.6    Crescimento dos isolados em hidrocarbonetos.....	13
4 Resultados e Discussões .....	15
4.1.    Padronização da técnica de RAPD e seleção de oligonucleotídeos.....	15
4.2    Variabilidade genética dos isolados por marcadores de RAPD .....	17
5 Conclusões .....	25
Referências Bibliográficas .....	26

## **Introdução**

O petróleo é uma mistura de compostos orgânicos diferentes formados a partir de uma variedade de matéria orgânica convertida quimicamente sob condições geológicas apropriadas em períodos de tempo longos (WANG, 1999). O petróleo é composto essencialmente de carbono e hidrogênio, além de conter quantidades pequenas de outros compostos orgânicos sulfurados, nitrogenados, oxigenados e organometálicos. Os combustíveis fósseis são uma das principais fontes de obtenção de energia para a civilização atual (SOARES-GOMES, e PEREIRA, 2002). Segundo o estudo do “Panorama do Petróleo e Gás 2002”, realizado pela empresa italiana ENI, o Brasil foi, entre os anos de 2001 a 2005, o 15º maior produtor de petróleo no mundo e o primeiro na América Latina. A PETROBRÁS S/A, é a maior indústria petrolífera no Brasil, contribui para estes números através da operação de suas 16 refinarias e das 112 plataformas de produção, assim como através dos seus 25.197 km de óleo-gasodutos e dos mais de 5.998 postos de serviço (PETROBRÁS, 2008). Porém, o largo desenvolvimento obtido nesses anos por meio do petróleo, trouxe como consequência problemas de nível ecológico, relacionadas à produção, purificação, transporte, armazenamento e destinação do petróleo e seus derivados, como acidentes e vazamentos, responsáveis pela contaminação dos solos e águas.

Áreas contaminadas apresentam quatro problemas principais: riscos à segurança das pessoas e das propriedades, riscos à saúde pública e dos ecossistemas, restrições ao desenvolvimento urbano e redução do valor imobiliário das propriedades (SÁNCHEZ, 1998). Contaminações de solo com hidrocarbonetos de petróleo tornaram-se um problema mundial na metade dos anos 80, como observado por Yeung *et al.*, (1997), além disso, Zhou & Crawford (1995) observaram que a contaminação de solos com gasolina, diesel, óleos em geral e outros produtos de petróleo através de vazamentos, derrames e por outras fontes tem se tornado importante foco de pesquisa. Como forma de minimizar o problema, Yeung *et al.*, (1997), salienta a importância dos processos biológicos que estão ganhando mundialmente cada vez mais importância no tratamento de solos, especialmente aqueles contaminados com compostos orgânicos. Estes métodos são favorecidos por

serem mais limpos, com custos baixos e de aplicação relativamente simples em grande escala.

Jorgensen *et al.*, (2000), citam que as técnicas de biorremediação são amplamente reconhecidas para o tratamento de áreas quimicamente contaminadas e vários processos são aplicados em escala industrial na Europa, Canadá e EUA. A biorremediação segundo Alexander (1994), objetiva a degradação de poluentes orgânicos, a concentrações que não sejam detectáveis ou, se detectáveis, a concentrações abaixo dos limites estabelecidos como seguros ou aceitáveis pelos órgãos reguladores. Aliado a isso, Hoffmann & Viedt (1998), afirmam que o objetivo da biorremediação não é primeiramente a diminuição da concentração abaixo dos valores limites, mas sim a redução do potencial de risco de maneira eficaz e com custos economicamente viáveis.

Uma grande diversidade de técnicas pode ser aplicada a biorremediação como a atenuação natural, bioestimulo, “bioventing”, “bioaumento”, “*landfarming*”, compostagem e fitorremediação, vistos em diversas publicações (OLSON *et al.*, 1999; RICHARD & VOGEL, 1999; SOLANO-SERENA *et al.*, 1999; CUNHA & LEITE, 2000; BENTO & GAYLARDE, 2001; GALLEGO *et al.*, 2001; PASSMAN *et al.*, 2001; BENTO *et al.*, 2004). O princípio básico da biorremediação é a utilização pelos microrganismos dos hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia para o seu crescimento e proliferação nos solos. Ao final, a degradação completa dos hidrocarbonetos pela população microbiana resulta na formação de produtos inócuos como dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), água (H<sub>2</sub>O) e biomassa celular como produtos finais (FRANKENBERGER, 1992; ALEXANDER, 1994; PAUL e CLARK, 1996).

### **1.1 Diversidade microbiana em solo e lodo**

Diversos autores como Withman, Coleman e Wiebe (1998), afirmam que os microrganismos representam a forma de vida mais abundante e diversificada de todo o planeta. Com relação a microbiota do solo, esta é composta por representantes dos domínios *Bactéria*, *Archaea* e *Eucarya*. Com relação a maior parte dessa microbiota,

os procariotos, pertencentes aos domínios *Bactéria* e *Archaea*, são os mais expressivos.

Uma importante consideração sobre a diversidade microbiana é descrita por Ward (1998) e Hunter-Cervera (1998), pelo fato de sua longa história evolutiva e da necessidade de adaptação dos mais distintos ambientes, os microrganismos acumularam vasta diversidade genética, que excede em grande número, a diversidade dos organismos superiores. Em síntese, os microrganismos representam o repertório mais rico em diversidade química e molecular na natureza, construindo a base de processos ecológicos, como o ciclo biogeoquímico e a cadeia trófica (HUNTER-CERVERA, 1998).

A comunidade microbiana do solo apresenta diversidade genética e funcional muito grandes, caracterizada através de estudos realizados com base no cultivo de microrganismos e estudos do seu DNA. Roesch *et al.* (2007), realizou a estimativa de que um grama de solo, pode conter 52.000 espécies, utilizando para isso, o seqüenciamento em massa do rRNA 16S para avaliar a diversidade bacteriana dos solos. A densidade desses diferentes grupos de microrganismos sofre variação em função das características edáficas assim como das climáticas, específicas de cada ambiente. Por fatores como a natureza dinâmica, complexa e heterogênea dos solos, a avaliação da diversidade microbiana nesse ambiente se torna limitada.

Ainda não existe uma metodologia universal capaz de cultivar e caracterizar a maioria das bactérias presentes nos ecossistemas naturais (RONDON *et al.*, 1999).

Apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 1 % dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos. É importante ressaltar que grande parte dos avanços da biotecnologia moderna e agricultura são atribuídas a descobertas recentes na área da biologia molecular de microrganismos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

O processo de lodos ativados convencional (LAC), atualmente, é a tecnologia mais difundida para o tratamento de águas residuárias, pois apresenta alta eficiência e baixo custo (VON SPERLING, 1997). Durante o processo de refino do petróleo, são utilizados em média 246 a 340 litros de água por barril de óleo cru (ALVA-ARGÁEZ; KOKOSSIS; SMITH, 2007), gerando uma quantidade de água residuária em torno de



0,4 a 1,6 vezes o volume de óleo processado (FICA-PIRAS, 2000). O lodo ativado pode ser definido como o floco produzido, num esgoto bruto ou decantado, e/ou outros organismos, na presença de oxigênio dissolvido, e acumulado em concentração suficiente, graças ao retorno de outros flocos previamente formados (JORDÃO & PESSÔA, 1995).

Os flocos são formados por fragmentos orgânicos não digeridos, por uma fração inorgânica (por exemplo grãos de areia), por células mortas e, principalmente, uma grande variedade de bactérias, podendo-se citar alguns gêneros já identificados: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Citromonas*, *Zooglea*.

Dentre os microrganismos utilizados, bactérias do tipo *Pseudomonas sp.*, são encontradas em alta frequência nos solos contaminados, e são objeto de estudo para aplicação na biorremediação. *Pseudomonas sp.* são bactérias gram-negativas, em forma de bacilo, aeróbias que tem como habitat água, solos úmidos e plantas, sendo muitas espécies deste gênero quase exclusivamente saprófitas. Pertencentes a família das *Pseudomonaceae*, de gênero incluído nas  $\gamma$ -proteobactérias. Sua taxonomia foi redefinida por recentes análises do rRNA 16S, ocorrendo assim a inclusão no gênero *Pseudomonas* dos gêneros formalmente classificados como *Chryseomonas* e *Flavimonas* (ANZAI *et al.*, 2000). Outras linhagens do gênero são classificadas recentemente como *Burkholderia* e *Ralstonia* (ANZAI *et al.*, 1997).

Segundo Aagot *et al.*, (2001), por ter diversas espécies isoladas de diferentes habitats, e devido sua ampla distribuição no ambiente e facilidade de cultivo, o gênero *Pseudomonas*, constitui-se em um dos mais bem estudados grupos bacterianos, tendo como principais papéis no ambiente, a biodegradação de compostos naturais e xenobióticos como hidrocarbonetos do petróleo, principalmente n-alcanos, hexadecano, hexano, decano, querosene, hidrocarbonetos aromáticos como o naftaleno e fenantreno, óleos vegetais e óleo cru, promotores do crescimento de plantas (SCHROTH *et al.*, 1991; O'SULLIVAN & O'GARA, 1992; GALLI *et al.*, 1996 RIDGWAY *et al.*, 1990; LATOUR, LEMANCEAU, 1997; SCHMID *et al.*, 1998; HUY *et al.*, 1999; HOLMBERG, 2001; BARATHI *et al.* 2001; ABOUSEOUD *et al.*, 2008). As espécies de *Pseudomonas* são por muito tempo conhecidas como abrigo de uma variedade de plasmídeos. Os plasmídeos catabólicos que são freqüentemente encontrados em *Pseudomonas spp.*, controlam a utilização de

diferentes hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) como por exemplo o naftaleno (YEN & SERDAN, 1988).

Sabe-se hoje que um dos maiores problemas relacionados a infecções no ambiente hospitalar em paciente imunocomprometidos, é causado por bactérias do gênero *Pseudomonas*, especificamente a *Pseudomonas aureoginosa*, que segundo Pelczar *et al.*, (1993), é um patógeno humano oportunista que pode causar sérias infecções.

Várias técnicas têm sido empregadas para análise de variabilidade em microrganismos. As metodologias clássicas utilizam a caracterização de fenótipos a partir de características morfológicas ou bioquímicas, principalmente por auxotrofia. Nas últimas décadas, várias técnicas baseadas em análise de proteínas e DNA, têm sido desenvolvidas.

## **1.2 Análise da variabilidade genética por técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)**

A técnica de PCR permite a possibilidade de gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma, porém com a limitação na obtenção de marcadores moleculares distribuídos pelo genoma, com exceção de alguns genes de sequência conhecida, sendo a construção dos iniciadores dependentes do conhecimento prévio das seqüências que flanqueiam a seqüência de DNA de interesse. Em 1990, Williams *et al.*, nos Estados Unidos, patentearam a tecnologia com o nome mais comumente utilizado, RAPD (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente) ou Random Amplified Polymorphic DNA, utilizando uma análise mendeliana, demonstrando a identificação de marcadores genéticos para mapeamento, o que causou um grande avanço nos estudos moleculares baseados em PCR. Segundo Ruiz *et al.*, (2004), o uso de marcadores moleculares por RAPD também tem sido aplicado na comparação entre isolados ambientais e clínicos, permitindo identificar e caracterizar espécie específica como *Pseudomonas aeruginosa*, como causador de bacteremia e pneumonia.

A RAPD, parte da idéia de se utilizar iniciadores mais curtos e de seqüência arbitrária para direcionar a reação de amplificação, não se fazendo necessário o conhecimento

prévio da sequência. Assim se baseando na amplificação de fragmentos não específicos de DNA, onde a estratégia é utilizar um oligonucleotídeo de 10-15 bases de sequência arbitrária como iniciador para amplificar o DNA genômico por PCR (WILLIAMS *et al.*, 1990), gerando a amplificação de várias sequências desconhecidas. Assume-se com isso que diferentes indivíduos produzem distintos padrões de fragmentos amplificados com base nas diferentes localizações dos sítios de anelamento dos iniciadores ao longo da fita de DNA. Os produtos da amplificação são separados em gel de agarose, onde cada banda de DNA amplificado é o resultado da interação entre o oligonucleotídeo e o DNA molde. O polimorfismo é reconhecido pela presença de um fragmento amplificado em um dos genótipos em relação à ausência deste mesmo fragmento no outro genótipo, os quais são devido a diversos fatores como deleção, duplicação, ou mutação no sítio de anelamento do primer (WILLIAMS *et al.*, 1990).

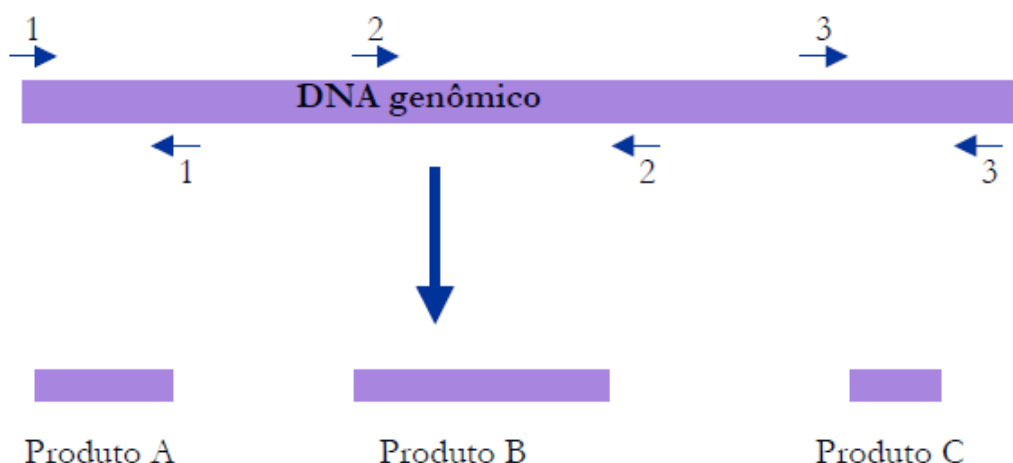
Um exemplo do como a técnica de RAPD ocorre, é demonstrado na Figura 1, onde 1, 2 e 3 são representações do primer em diferentes sítios de anelamento. Ao se anelarem nesses sítios nas duas direções, os primers 1, 2 e 3 geram os produtos A, B e C respectivamente.

Segundo Fungaro (2000), a adoção de marcadores moleculares do tipo RAPD na detecção, no diagnóstico e na determinação da diversidade genética deve-se, principalmente, à sua simplicidade de uso, rapidez, segurança e amplitude dos resultados gerados. Esta técnica tem se mostrado extremamente útil para medir e caracterizar a variabilidade genética e também para uma rápida identificação de diversidades entre microrganismos. Tendo a vantagem de ser sensível a diferenças de até um único nucleotídeo entre o oligonucleotídeo e o DNA molde.

A técnica de RAPD necessita de alto grau de padronização e controle interno, para que se torne possível à obtenção de perfis reprodutíveis de DNA. Conseqüentemente, mudanças nos parâmetros geram mudanças nos perfis, sendo necessário que esses parâmetros se encontrem dentro dos limites ótimos para reprodutibilidade, isto é, concentrações adequadas de DNA, iniciador e enzima, bem como a condição da reação de RAPD (SILVEIRA *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 2004).

A técnica de RAPD tem sido aplicada com resultados satisfatórios para vários microrganismos, embora seja recente e apresente suas limitações (SILVEIRA *et al.*, 2000).

Apresentadas todas as vantagens da técnica de RAPD, esta foi tomada como método de análise principal para este projeto, sendo aplicada na análise da comunidade bacteriana de solos contaminados com petróleo e de efluente de refinaria de petróleo.



**Figura 1:** Esquema da reação de RAPD gerando diferentes produtos.

O Laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica de Microrganismos, obteve quinze cepas bacterianas (1C, 2C, 3C, 9B, 9C, 6V, 7T, 5T, 1A, 1B, 4A, 4B, 5N, 6N, 4N) provenientes de solo contaminado com petróleo, de um consórcio extraído de uma região petrolífera de Rosário, localizada na Argentina, que acredita-se terem a capacidade de degradar compostos carcinogênicos tóxicos encontrados no petróleo e seus derivados. Testes bioquímicos foram realizados, permitindo classificá-las apenas quanto ao gênero *Pseudomonas*. Com isso o uso de métodos mais específicos, com maior nível de discriminação e confiabilidade se fazem necessários, a fim de se obter o grau de variabilidade e conseqüentemente a similaridade entre tais microrganismos. Assim métodos de biologia molecular, como o RAPD, baseados em características genéticas como presença ou ausência de sítios específicos de ligação no DNA, são utilizados. Além das amostras de bactérias de solo, três amostras de bactérias provenientes de lodo de efluente de refinaria de petróleo, previamente isoladas, degradadoras de hidrocarbonetos poliaromáticos, foram utilizadas para a análise e comparação, sendo estas nomeadas de acordo com seu potencial de degradação de determinados Hidrocarbonetos Poli Aromáticos (HPA) como: REGAP1 (A),

REGAP2 (F) e REGAP3 (N), que utilizam como fonte de carbono o antraceno, fenantreno e naftaleno, respectivamente.

### 1.3 Bioinformática

A necessidade de se obter padrões de comparação e métodos mais específicos sempre foi alvo de pesquisas e esforços no meio da biologia molecular, assim como em outras ciências que objetivam tais fins. Nos dias atuais, ferramentas desenvolvidas pela parceria com outras ciências, como a informática, são utilizadas. Assim, a bioinformática busca sanar essas dificuldades, automatizando o processo e refinando padrões de análise. Existem hoje inúmeros *softwares* no mercado, tanto gratuitos quanto pagos, com a finalidade de realizar análises de padrões de bandas e *fingerprints*, utilizando para isso, uma série de algoritmos e cálculos matemáticos.

O *software* GelCompar (Applied Maths, Belgium) tem sido considerado desde seu lançamento, em 1991, como um dos grandes nomes em termos de análises comparativas de padrões eletroforéticos no mercado. Com base nas constantes mudanças e atualizações desenvolvidas, o *software* hoje se encontra intitulado, GelCompar II, na versão 6.0, onde foi totalmente redesenhado, afim de compartilhar todas as suas funcionalidades e conceitos, com renomado *software* da BioNumerics, apresentando diversos *add-ons* tanto na parte gráfica quanto na linguagem dos *scripts* utilizados. Com o conceito de banco de dados do *software* GelCompar II, é possível ligar vários *fingerprints* a únicos organismos ou amostras estudadas, gerando grupos e identificações de consenso, além disso possui ferramentas de compartilhamento, onde bancos de dados são criados e em determinado formato, podem ser conectadas aos servidores da BioNumerics. GelCompar II é um pacote modular que consiste no *software* básico que envolve o processamento das imagens e perfis densitométricos, a funcionalidade do banco de dados e a exibição dos perfis normalizados, o cálculo de peso molecular e quantificação de bandas ou picos, quantificação e comparação de bandas entre grupos e análise de bandas, únicas, comuns, polimórficas e discriminativas.

O *software* se fundamenta em dois conceitos principais. O primeiro se baseia nas entradas no banco de dados, que consiste nos organismos ou amostras individuais estudadas, como cepas bacterianas e virais, animais, plantas e fungos, ou seja,

qualquer amostra orgânica onde os padrões de *fingerprints* podem ser obtidos, onde cada entrada no banco de dados é caracterizado por uma única chave, que pode ser atribuída manual ou automaticamente. O segundo conceito se baseia, no dado experimental. Os dados experimentais são os resultados da eletroforese ou qualquer outro experimento de *fingerprint* utilizado para estabelecer uma comparação entre organismos ou amostras. É permitido ao usuário também criar tipos de *fingerprints* personalizados, além disso, através da utilização do banco de dados, é possível que experimentos de *fingerprints* de diferentes naturezas, sejam definidos como uma mesma entrada, e assim, *fingerprints* múltiplos, agrupamentos e identificações podem ser obtidos dessas combinações.

## **2 Objetivo Geral**

Estudar uma comunidade de microrganismos desconhecidos provenientes de solo contaminado com petróleo e de uma estação de tratamento microbiológica de efluente de refinaria de petróleo visando comparação genética entre esses organismos.

### **2.1 Objetivos Específicos**

- Analisar a variabilidade genética de 15 cepas de microrganismos isolados de solo contaminado por petróleo e de 3 cepas isoladas de estações de tratamento de efluentes por meio de marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA);
- Realizar testes com a finalidade de por a prova a capacidade das bactérias em degradar diferentes compostos contendo substâncias de alto risco tóxico, encontrados no petróleo;

### **3 Materiais e Métodos**

#### **3.1 Origem dos microrganismos estudados**

Foram analisados 3 microrganismos previamente isolados de lodo ativado de refinaria de petróleo (Pinhati et al., 2008) denominados: A, F e N e 15 microrganismos provenientes de solo impactado com petróleo (microrganismos cedidos pela Universidade de Rosário), denominados: 1A, 4A, 1B, 4B, 1C, 2C, 3C, 9B, 9C, 6V, 4N, 5N, 6N, 5T e 7T.

#### **3.2 Cultivo de bactérias e extração de DNA**

As cepas foram cultivadas em tubos de ensaio autoclavados, contendo 5mL de meio Luria-Bertani (LB: triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%) por 16-18 h à 37°C e 150 rpm. Em seguida 1,5 mL de inóculo foi centrifugado à 12.000 x g por 10min à 4°C, o sedimento foi ressuspensionado em 200µL de água MilliQ e fervido por 10 min. Foram adicionados 200µL de acetato de sódio 3M e 400µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 v/v) às amostras e então centrifugadas a 14.000 x g por 20 min à 4°C. O sobrenadante foi recuperado, transferido para microtubos eppendorf limpos de 1,5mL e a este foi adicionado 2 volumes de etanol absoluto. A solução foi incubada a -20°C por 18 h para a precipitação do DNA. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 14.000 x g por 30min a 4°C, e o precipitado lavado com etanol 70% gelado. O DNA foi ressuspensionado em tampão TE (10mM Tris HCl e 1mM EDTA, pH8,0). O DNA das amostras foi quantificado utilizando o fluorômetro Qubit (Invitrogen - kit HS - High Sensivity). Os resultados obtidos foram usados para o cálculo das reações de RAPD.



### 3.3 Otimização das reações de RAPD

A reação de RAPD foi otimizada testando diferentes concentrações de  $Mg^{++}$  (1,5; 2,0 e 3,0mM), 3 concentrações de *Taq* DNA polimerase (1, 2 e 3U/reação) e quantidades de DNA (10, 20 e 30ng).

### 3.4 Análise da variabilidade por RAPD

As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 50 $\mu$ L, contendo 30ng de DNA total, 25pmoles de cada oligonucleotídeo (Operon Technologies, CA, EUA) (Tabela 1), 3mM de  $MgCl_2$ , 0,2mM de cada dNTPs (Ultrapure dNTP set, Pharmacia Biotech), 2 unidades de *Taq* DNA polimerase e 5  $\mu$ L do tampão da enzima 10 X concentrado (Fermentas). As amplificações foram feitas em termociclador (Perkin-Elmer Gene Amp® PCR System 2400), utilizando a seguinte sequência de reações: 94°C por 3 min, seguido de 45 ciclos, sendo que cada ciclo consiste de uma etapa de desnaturação (1 min a 92°C), uma etapa de anelamento (1 min a 35°C) e uma etapa de alongamento (2 min a 72°C), e finalmente uma extensão final de 72°C por 10 min. O resultado da reação foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2%, coloração feita com Gel Red (10X diluído DMSO), observação sobre luz U.V. e documentados utilizando-se sistema de fotodocumentação MiniBisPro (BioAmerica Inc.).

Tabela 1: Sequência e conteúdo das bases nitrogenadas guanina e citosina (GC) dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para análise de isolados de solo e lodo impactados por petróleo por marcadores RAPD

Oligonucleotídeos	Sequência 5'- 3'	Conteúdo GC (%)
OPA-02	TGCCGAGCTG	70
OPA-05	AGGGGTCTTG	60
OPA-10	GTGATCGCAG	60
OPA-13	CAGCACCCAC	70
OPA-20	TTCCGAACCC	60
OPD-02	GTTGCGATCC	60
OPD-05	GGACCCAACC	70
OPD-10	GGTCTACACC	70
OPD-13	GGGGTGACGA	70
OPD-20	CATCCGTGCT	60

### 3.5 Análise de similaridade

As análises de similaridade e de agrupamento entre os microrganismos foram feitas utilizando o *software* GelCompar II v. 5.0 (Applied Maths, Belgium) empregando-se o coeficiente de Pearson e o método da média aritmética não ponderada (UPGMA), estabelecendo as relações genéticas entre os diferentes isolados. O dendrograma obtido agrupou os isolados mostrando o nível de similaridade genética entre eles.

### 3.6 Crescimento dos isolados em hidrocarbonetos

Foram selecionados 8 microrganismos com base na análise da similaridade genética gerada por meio do dendrograma, assim 3 isolados de lodo (A, F e N) e 5 isolados de solo (1C, 6N, 6V, 5T, 7T) foram escolhidos levando em consideração o nível de similaridade genética de cada microrganismo em cada cluster. As bactérias selecionadas foram avaliados quanto a capacidade de crescimento em HPAs (antraceno, fenantreno, naftaleno), em hidrocarbonetos monoaromáticos (benzeno,

tolueno e xileno), em hidrocarboneto alifático (hexano) e etanol. Todos os substratos foram adicionados ao meio mineral Tanner [composição, em g L<sup>-1</sup>: CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0,04; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1; NaCl, 0,8; NH<sub>4</sub>Cl, 1,0; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,2 e KCl, 0,1; micronutrientes, mg L<sup>-1</sup>: CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 0,1; MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, 0,425; ZnCl<sub>2</sub>, 0,05; CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O, 0,015; NiCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 0,01; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0,01; Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>, 0,01 e Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 12,1; conforme modificação de Santos (2004), pH7,0], numa concentração de 250mg L<sup>-1</sup>. Os membros do consórcio microbiano foram individualmente inoculados, sendo os frascos incubados com duas repetições, sob agitação de 150rpm, durante um período de 7 dias. Após, uma alíquota de 1 mL das culturas crescidas foi utilizada para a diluição seriada em solução salina (0,85%), um volume de 1 mL das diluições foi plaqueada em meio LB, e incubada a 30°C por 72 horas, quando então verificada a presença de UFC nas placas. Foi realizado também um teste controle negativo onde os mesmos microrganismos foram inoculados isoladamente em meio mineral Tanner sem a adição da fonte de carbono. A contagem de células também foi realizada por meio de diluições seriadas em solução salina utilizando 1 mL das diluições e plaqueamento em meio LB sólido, aplicando assim a mesma metodologia descrita anteriormente.

## 4 Resultados e Discussões

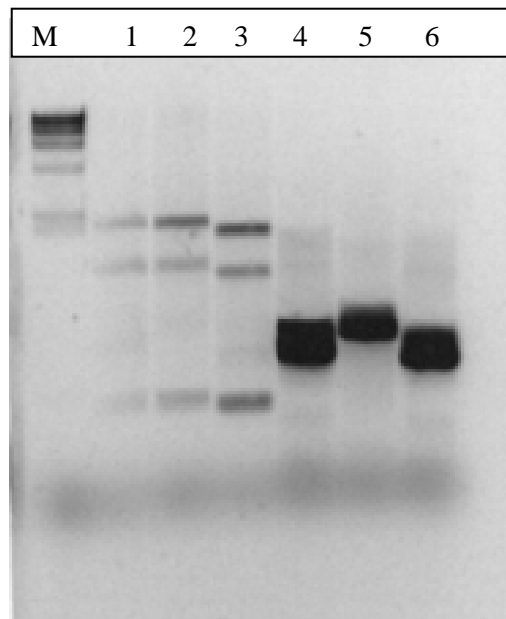
### Análise de variabilidade genética dos isolados de solo e lodo por meio de marcadores RAPD

#### 4.1. Padronização da técnica de RAPD e seleção de oligonucleotídeos

A classe de marcadores conhecida como RAPD permite identificar o grau de similaridade entre os genótipos de organismos de interesse. A técnica se baseia na amplificação de fragmentos não específicos de DNA, distribuídos de forma aleatória no genoma do organismo alvo. Esta metodologia utiliza oligonucleotídeos iniciadores (primers) de 10 bases para amplificar, via PCR fragmentos do DNA genômico (STIFT *et al.*, 2003). Utilizando-se a metodologia de extração de DNA, estabelecida inicialmente para bactérias, foi possível obter perfis eletroforéticos nas reações de RAPD. A fixação das células em etanol, seguida da conservação em baixa temperatura, permitiu a extração de DNA em quantidade e em qualidade para as reações de amplificação por RAPD.

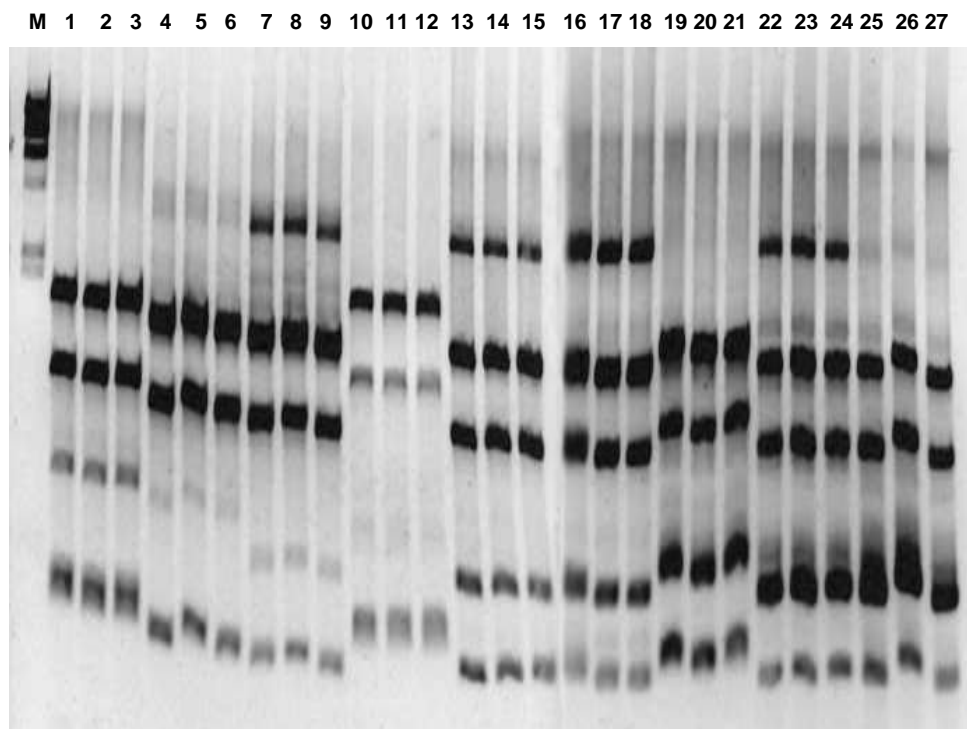
Para determinação de melhores resultados, as condições de amplificação devem ser otimizadas, incluindo a seleção de primers, concentração de íons  $Mg^{++}$  e concentração de DNA na reação. No presente trabalho, foram avaliados inicialmente 18 isolados, sendo 15 de solo e 3 de lodo. Foram avaliados os perfis de RAPD destes isolados utilizando 20 primers, dos quais foram selecionados 10 primers (Tabela 1) que mostram um melhor perfil de bandas.

Com base na otimização da reação de RAPD, foram avaliadas diferentes concentrações de DNA (10, 20 e 30ng). Sendo que na concentração de 30ng foi possível observar que o padrão de bandas apresentou maior definição e intensidade (Figura 2). Segundo Williams *et al.*, (1993), a concentração de DNA na reação é um fator muito importante na análise por RAPD, visto que em altas concentrações de DNA é observado um borrão (*background*), dificultando a leitura das bandas, enquanto que em concentrações baixas ocorre a perda de bandas importantes, que seriam visíveis em concentrações adequadas.



**Figura 2:** Otimização da Reação de RAPD em função da concentração de DNA utilizando para isso os isolados 1A, de solo e N, de lodo. Linhas M) marcador de peso molecular de 100pb DNA Ladder (Promega); 1) 10ng DNA 1A; 2) 20ng DNA; 1A 3) 30ng DNA 1A; 4) 10ng DNA N; 5) 20ng DNA N; 6) 30ng DNA N.

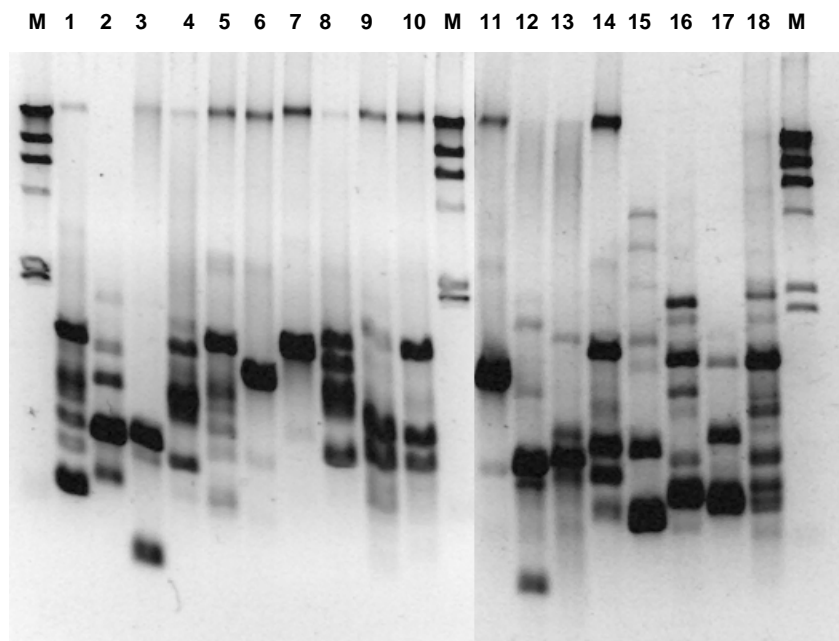
Niella (2000) analisando a variabilidade entre isolados de *Crinipellis pernicioso*, também utilizando a técnica de RAPD, só obteve bons resultados com uma quantidade maior de DNA por reação (30ng). Em relação a otimização da reação de RAPD para concentração de íons  $Mg^{++}$  e Taq DNA polimerase, foram testadas 3 concentrações diferentes de ambos, sendo que os valores que apresentaram bandas mais expressivas foram 3,0mM de  $Mg^{++}$  e 2U de enzima Taq DNA polimerase por reação (Figura 3).



**Figura 3:** Amplificação de DNA de isolado de solo (4A) com o primer OPA-02, para verificar a condição ótima de reação, em função da concentração de íons  $Mg^{++}$  e *Taq*. Linhas 1-3: 1,5mM  $Mg^{++}$  e 1U *Taq*; Linhas 4-6: 2,0mM  $Mg^{++}$  e 1U *Taq*; Linhas 7-9: 3,0mM  $Mg^{++}$  e 1U *Taq*; Linhas 10-12: 1,5mM  $Mg^{++}$  e 2U *Taq*; Linhas 13-15: 2,0mM  $Mg^{++}$  e 2U *Taq*; Linhas 16-18: 3,0mM  $Mg^{++}$  e 2U *Taq*; Linhas 19-21: 1,5mM  $Mg^{++}$  e 3U *Taq*; Linhas 22-24: 2,0mM  $Mg^{++}$  e 3U *Taq*; Linhas 25-27: 3,0mM  $Mg^{++}$  e 3U *Taq*; M: Marcador de peso molecular fago lambda digerido com *Hind III*

#### 4.2 Variabilidade genética dos isolados por marcadores de RAPD

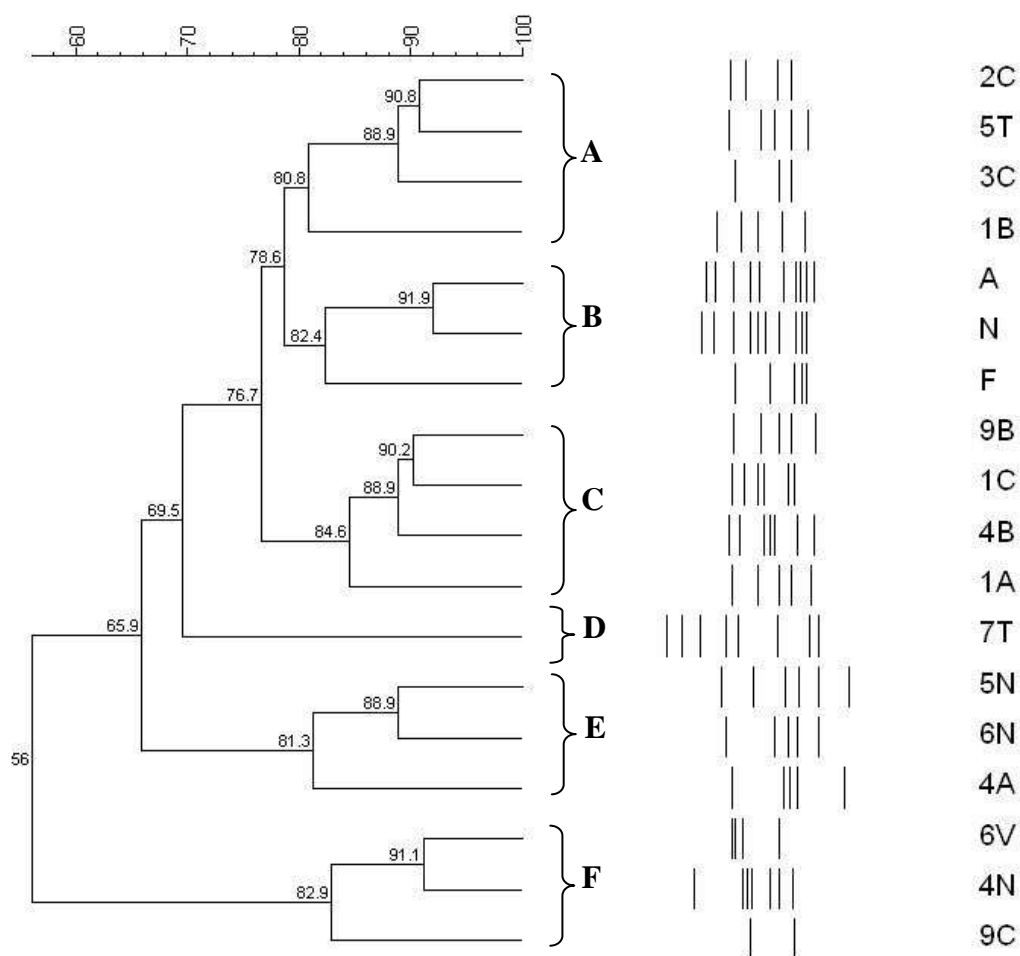
Com base nos resultados obtidos pela otimização da reação de RAPD, tornou-se possível a avaliação da diversidade genética dos 15 isolados de solo e 3 isolados de lodo. Foram utilizados 20 primers, sendo que 10 (Tabela 1) se mostraram capazes de gerar perfis de bandas para quase todos os microrganismos, dentre os quais um primer (OPA-2), foi selecionado por se mostrar satisfatório em gerar bandas reproduzíveis para todos os microrganismos, somando uma totalidade de 102 bandas ao final da reação. Dentre estas bandas, 17 se mostraram ausentes em pelo menos um microrganismo analisado, sendo assim denominadas bandas polimórficas, e 85 não polimórficas. O perfil de bandas gerado pela reação de RAPD otimizado, utilizando o primer OPA-2 para os 18 isolados se encontra na Figura 4.



**Figura 4:** Perfil de RAPD dos isolados de solo com os *iniciadores* OPA-2

M) marcador de peso molecular de 100pb DNA Ladder (Promega); 1) A; 2) F; 3) N; 4) 1A; 5) 1B; 6) 4A; 7) 4B; 8) 9B; 9) 9C; 10) 6V; 11) 1C; 12) 2C; 13) 3C; 14) 4B; 15) 5B; 16) 6V; 17) 5B; 18) 7T.

O *software* GelCompar II possibilitou a análise combinada de todas as 102 bandas, construindo assim um dendrograma de similaridade que permitiu a avaliação das relações genéticas de todos os isolados. Foram formados 3 grupos distintos: A (2C, 5T, 3C e 1B), B (A, N e F) e C (9B, 1C, 4B e 1A) no primeiro grupo; D (7T) no segundo grupo; E (5N, 6N e 4A) e F (6V, 4N e 9C) no terceiro grupo como demonstrado na Figura 5.



**Figura 5:** Dendrograma obtido através da matriz de similaridade genética entre as bactérias provenientes de solo e lodo contaminado com petróleo a partir de dados obtidos pela técnica de RAPD utilizando o método UPGMA.

O dendrograma foi dividido em três clusters principais, o primeiro cluster apresenta 69,5% de similaridade, sendo este cluster, subdividido em três subclusters denominados A, B e C. Os subclusters possuem índices de similaridades de 80,8%, 82,4% e 84,6%, respectivamente. O isolado 7T associa-se aos demais microrganismos desse cluster com 69,5%, pertencendo ao cluster D.

Ao analisarmos todos os microrganismos presentes no dendrograma é possível observar que estes possuem um índice de similaridade de 56% entre si, onde no primeiro cluster, se encontram os subclusters principais A, B e C. Podemos observar que os microrganismos isolados de lodo foram agrupados em um único subcluster (B). Os microrganismos A e N apresentaram a maior índice de similaridade obtido entre



todos os microrganismos estudados (91,9%). Pode-se atribuir esse alto índice de similaridade ao fato de estas bactérias terem sido isoladas de um ambiente em comum, um mesmo lodo de tratamento de efluente de refinaria de petróleo. O mesmo pode ser observado entre todos os microrganismos analisados. O alto índice de similaridade pode ser atribuído ao fato de estes, apesar de isolados de dois ambientes diferentes – o solo e o efluente – foram expostos a mesmas condições adversas (impactados com petróleo). O meio em que o lodo se encontra é muito mais seletivo do que o solo, pois no efluente, se encontram diversos compostos inorgânicos, orgânicos sulfurados e nitrogenados, fenólicos e hidrocarbonetos poliaromáticos, o que tende a selecionar os microrganismos existentes no lodo, pela sua capacidade de resistência por diversos mecanismos, com excreção de proteínas ou a adaptação de determinados compostos em seu metabolismo, utilizando como fontes de carbono esses compostos. Tais mecanismos se encontram codificados em seus genes, como os genes que codificam as vias metabólicas de degradação do naftaleno (HPA), por *Pseudomonas putida*, PpG7 (YEN e SERDAR, 1988). Pode-se aliar os fatos mencionados acima à razão pela qual um índice de similaridade elevado seja encontrado entre esses microrganismos. Assim, uma seleção desses microrganismos pode ser implantada como sementes em tratamentos de biorremediação. Estes microrganismos apresentaram índice de similaridade de 82,4% quando comparados ao microrganismo F, pertencente ao mesmo subcluster.

O maior índice de similaridade obtido entre os microrganismos do lodo em relação aos microrganismos do solo foi de 78,6%, sendo essa similaridade, entre os isolados do solo 2C, 5T, 3C e 1B, pertencentes todos ao subcluster A. No entanto a similaridade entre os microrganismos do lodo e todos os microrganismos do solo foi de 56%.

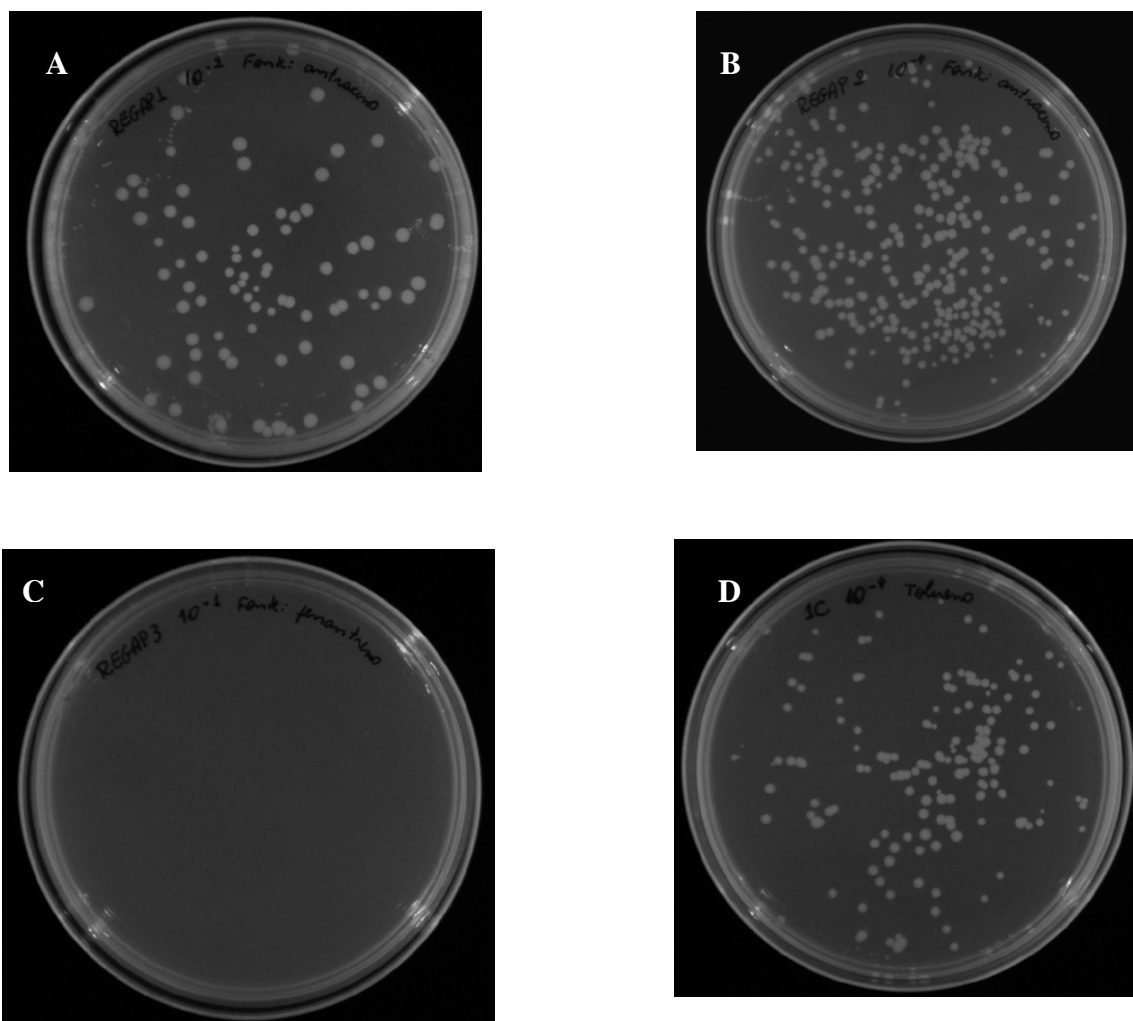
Os subclusters E e F, apresentaram respectivamente 81,3% e 82,9%, entre os microrganismos do solo, as bactérias 6V e 4N, apresentaram o maior índice de similaridade em relação aos demais isolados (91,1%). A relação entre diversidade microbiana e qualidade do solo tem sido muito discutida, mas não foi ainda completamente definida. O tempo necessário para o ecossistema retornar ao seu estado inicial, após um distúrbio qualquer, define a resiliência do sistema, ou seja, quanto maior esse tempo, menor a resiliência. Se a diversidade das comunidades microbianas do solo está diretamente relacionada com sua resiliência, ainda não está

definido, no entanto, esta é uma hipótese possível, se considerarmos que a diminuição da diversidade pode resultar em diminuição da redundância de funções bioquímicas e conseqüente redução da diversidade metabólica (REBER, 1992), uma justificativa plausível para o grau de similaridade obtido. Assim, observa-se que existem espécies com um alto grau de similaridade entre os microrganismos do lodo e do solo, porém quando levados em consideração os grupos isolados, existe grande diversidade genética.

#### **4.3 Crescimento dos isolados em diferentes fontes de carbono**

Ao todo foram selecionadas oito, de um total de dezoito bactérias isoladas, dentre elas os três isolados de lodo (A, F, N) e cinco isolados de solo (1C, 6N, 6V, 5T e 7T), para testar a capacidade desses microrganismos em se manter viáveis na presença de diferentes compostos, utilizando-os como fontes de carbono. A escolha foi baseada no grau de similaridade obtida pela análise do dendrograma, levando em consideração cada um dos microrganismos de cada subcluster gerado. Uma concentração de  $10^3$  células/mL de cada microrganismo foi inoculado em meio mineral Tanner, um meio mínimo, suplementado com uma das oito fontes de carbono diferentes, que variaram das mais complexas, hidrocarbonetos poliaromáticos (antraceno, fenantreno, naftaleno), hidrocarbonetos monoaromáticos (benzeno, tolueno, xileno), até as mais simples, hidrocarboneto alifático (hexano), álcool orgânico (etanol). A viabilidade celular foi avaliada por meio de plaqueamento e contagem de UFC (unidades formadoras de colônias).

Os sucessivos plaqueamentos e contagem de UFC foram feitos no intervalo referente aos dias 0, 7 e 14, tempo necessário para fazer a análise da viabilidade celular. Houve crescimento ou não de colônias nas placas como exemplificado na Figura 6.



**Figura 6:** Crescimento de colônias e contagem de UFC dos diferentes isolados selecionados para avaliação da viabilidade celular com diferentes fontes de carbono. A – Isolado A em meio contendo antraceno; B – Isolado F em meio contendo antraceno; C – Isolado N em meio contendo fenantreno; D – Isolado 1C em meio contendo tolueno.

Com base na contagem de UFC os microrganismos foram marcados como positivos, caso fossem viáveis nos 14 dias de inóculo e plaqueamento, ou negativo, caso não fossem viáveis até os 14 dias, os dados estão mostrados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Análise da viabilidade dos isolados nas diferentes fontes de carbono adicionadas individualmente ao meio.

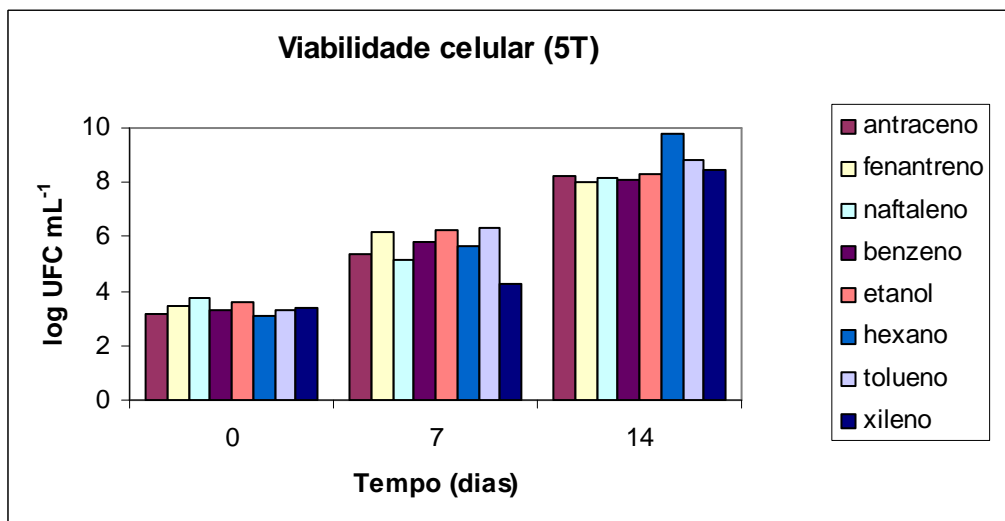
Isolados de solo/lodo	Fontes de carbono							
	Antraceno	Fenantreno	Naftaleno	Benzeno	Etanol	Hexano	Tolueno	Xileno
1C	+	+	+	+	+	+	+	+
6N	+	+	+	+	+	+	+	+
6V	+	+	+	+	+	+	+	+
5T	+	+	+	+	+	+	+	+
7T	+	+	+	+	+	+	+	+
A	+	+	+	+	+	+	+	+
F	+	+	-	+	+	+	+	+
N	+	-	+	+	+	+	+	+

Em decorrência dos resultados obtidos com a análise da viabilidade celular com os diferentes microrganismos, foi possível observar que os todos os isolados apresentaram grande versatilidade metabólica, pelo fato da grande maioria conseguir se manter viável durante os 14 dias de inóculo em todas as fontes de carbono avaliadas, como exemplo dessa versatilidade, um gráfico da formação do log UFC mL<sup>-1</sup> no intervalo de tempo de 14 dias referente ao isolado do solo 5T foi construído, demonstrando a versatilidade metabólica mencionada anteriormente, como indicado na figura 7. Esses dados podem ser relacionados com a literatura, considerando que os microrganismos que assimilam petróleo ou derivados são comumente encontrados em locais em que ocorre contaminação ou em áreas que, historicamente, tenham sido expostas a algum tipo de contaminação por hidrocarboneto (BARATHI *et al.*, 2001). Assim, as bactérias isoladas de solo contaminado com petróleo possivelmente apresentaram melhores resultados quando comparadas com as isoladas de lodo, pelo ambiente a qual estavam expostas.

Apenas dois microrganismos analisados não conseguiram se manter viáveis em todas as fontes de carbono, ambos pertencem ao grupo dos isolados do lodo, onde o microrganismo F não se manteve viável em meio contendo naftaleno como fonte de carbono, e o microrganismo N, em meio contendo fenantreno como fonte.

Mesmo sendo um HPA relativamente simples, apresentando dois anéis aromáticos, o naftaleno não conseguiu ser metabolizado pela bactéria F. De acordo com a literatura, Zhang *et al.*, (2004), obteve resultados semelhantes onde, um isolado de *Paracoccus*

degradou o antraceno, o fenantreno e o pireno, mas não o naftaleno, o que demonstra que não é somente a complexidade do hidrocarboneto o fator que afeta o metabolismo bacteriano.



**Figura 7:** Gráfico referente à análise da viabilidade do isolado 5T, demonstrando sua versatilidade metabólica nas diferentes fontes de carbono adicionadas individualmente ao meio no tempo de 14 dias.

## 5 Conclusões

- A técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) apresentou ser uma ferramenta satisfatória para fins de análise de variabilidade e conseqüentemente similaridade entre os microrganismos.
- A padronização da reação de RAPD foi um ponto essencial no desenvolvimento e aplicação da técnica e deve ser levado em consideração, seja para microrganismos provenientes de um mesmo ou diferente ambiente, no qual se deseja o uso desta ferramenta molecular.
- A condição para padronização de RAPD que apresentou melhores resultados foi a de 30ng de DNA, 2U de enzima Taq polimerase e 3,0mM de MgCl<sub>2</sub>.
- Todos os *primers* mostraram-se capazes de gerar perfis polimórficos entre os isolados, porém o único que permitiu gerar perfis para todos os microrganismos com melhor qualidade foi o primer OPA-2.
- A utilização da bioinformática foi imprescindível para análise da variabilidade genética obtida. O *software* GelCompar II permitiu gerar um dendrograma de similaridade entre os isolados, observando assim que entre os microrganismos do solo e do lodo, há espécies com alto grau de similaridade, enquanto que em relação aos dois grupos estudados há grande diversidade genética.
- Expressiva parte dos microrganismos selecionados para o teste de viabilidade utilizando diferentes fontes de carbono conseguiu se manter viável pelo período estabelecido, sendo assim, possivelmente podem apresentar potencial para o uso como sementes na biorremediação de áreas impactadas com petróleo.

## Referências Bibliográficas

ALVA-ARGÁEZ, ALBERTO; KOKOSSIS, ANTONIS; SMITH, ROBIN. The design of waterusing systems in petroleum refining using a water-pinch decomposition. **Chemical Engineering Journal**, v.128, n. 1, p. 33-46, 2007.

ARRUDA, ÉRICO ANTÔNIO GOMES DE. **Infecção hospitalar por *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente: análise epidemiológica no HC-FMUSP**. São Paulo, 1996. Dissertação (Mestrado em Infectologia) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

BERGER, THOMAS MICHAEL. **Biorremediação de Solos Contaminados com Hidrocarbonetos Totais de Petróleo – Enfoque na Aplicação do Processo Terraferm®**. Porto Alegre, 2005. Tese (Doutorado em Ecologia) – Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FERREIRA, ALDO PACHECO; CUNHA, CYNARA DE LOURDES DA NÓBREGA; ROQUE, ODIR CLÉCIO DA CRUZ. Avaliação da Microfauna no Efluente Final para Monitoramento da Qualidade Ambiental em Estações de Tratamento de Esgotos do Tipo Lodos Ativados. **Gaia Scientia**, 2008, 1(2): 51 – 59.

FICA-PIRAS, PABLO RODRIGO. **Estudos sobre nitrificação de efluentes de refinaria em biorreatores trifásicos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – UFRJ, Rio de Janeiro, 2000.

FUENTEFRIA, DAIANE BOPP; FERREIRA, ALESSANDRA EINSFELD; GRÄF, TIAGO; CORÇÃO, GERTRUDES. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 41(5):470-473, set-out, 2008.

GASPAROTTO, PAULO HENRIQUE GILIO; PLASZEZESKI, FERNANDO RODRIGUES; ROCHA, CÁSSIO DOS SANTOS; GRECELLÉ, CRISTINA BERGMAN ZAFFARI. Isolamento e Identificação da Bactéria *Pseudomonas* sp. em Amostras de Leite *IN NATURA*. 2007. **Ciência & consciência - revista de iniciação científica do ceulji/ulbra**, Ji-Paraná, v.1, p.1, 2007.

JACQUES, RODRIGO JOSEMAR SEMINOTI. **Biorremediação de Antraceno, Fenantreno e Pireno em um Argissolo**. Porto Alegre, 2005. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LANA, TAÍS GUIMARÃES. **Caracterização Genética e fisiológica de Crinipellis pernicioso**. São Paulo, 2004. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

MARIANO, ADRIANO PINTO. **Avaliação do Potencial de Biorremediação de Solos e de Águas Subterrâneas Contaminados com Óleo Diesel**. Rio Claro, 2006. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) - Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

**Manual GelCompar II**, disponível em:<[http://www.applied-maths.com/download/brochures/brochure\\_gc.pdf](http://www.applied-maths.com/download/brochures/brochure_gc.pdf)>. Acesso em 21 de agosto de 2009.

MEIREL, RODRIGO ORNELLAS; AZEREDO, ANTONIO; TORRES, JOÃO PAULO MACHADO. Aspectos Ecotoxicológicos de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. **Oecol. Bras.**, 11 (2): 188-201, 2007.

MORAIS, MARCIO. **Diversidade Bacteriana do solo sob cultivo de cana-de-açúcar**. Piracicaba, 2008. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

**O ESTADO DE SÃO PAULO**. Brasil é o décimo quinto produtor mundial de petróleo. São Paulo, 2002. Disponível em:<<http://www.estadao.com.br/arquivo/economia/2002/not20020731p34908.html>>. Acesso em 7 de Junho de 2009.

PEIXOTO, RENATA DE MELO. **Bioprospecção de Microrganismos do Gênero Pseudomonas Produtores de Biossurfactantes**. São Paulo, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.



PEREIRA, RENATO CRESPO; GOMES, ABÍLIO SOARES. Poluição Marinha In: Biologia marinha. **Interciência** (ed), 2002, p. 311-334.

PINHATI, FERNANDA ROMANHOLI. **Reuso de Efluentes de Refinaria de Petróleo: Caracterização Molecular da População Microbiana do Lodo de SMBR por PCR-DGGE E RAPD**. Rio de Janeiro, 2008. Tese ( Mestrado em Bioquímica ) – Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

**Relatório Anual Petrobrás 2008**, disponível em: <[http://www2.petrobras.com.br/ri/port/ConhecaPetrobras/RelatorioAnual/pdf/RelatorioAnual\\_2008.pdf](http://www2.petrobras.com.br/ri/port/ConhecaPetrobras/RelatorioAnual/pdf/RelatorioAnual_2008.pdf)>. Acesso em 16 de outubro de 2009.

SAZAKLI, ELENÍ; LEOTSINIDIS, MICHAEL; VANTARAKIS, APOSTOLOS; PAPAPETROPOULOU, MARY. Comparative Typing of Pseudomonas Species Isolated from the Aquatic Environment in Greece by SDS-PAGE and RAPD Analysis. **Journal of Applied Microbiology**, 2005, 99, 1191-1203.

SILVA, THAYSSSE ALVES DE LIMA *et al.* Potencial Biotecnológico de uma Nova Linhagem de Pseudomonas fluorescens na Produção de Biossurfactante Utilizando Petróleo como Substrato. **Exacta**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 31-37, jan./mar. 2009.

SOTELLO, FRANCISCO FALLA. **Aplicação da espectroscopia de Infravermelho Próximo na caracterização de petróleo. Simulação de uma unidade de destilação atmosférica**. São Paulo, 2006. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

SPINELLI, LEANDRO DE FREITAS. **Biorremediação, Toxicidade e Lesão Celular em Derrames de Gasolina**. Porto Alegre, 2005. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

VAL-MORAES, SILVANA POMPÉIA *et al.* Diversidade de Bactérias de Solo sob Vegetação Natural e Cultivo de Hortaliças. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 1, p. 7-16, jan-mar, 2009.

