



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA
REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL**

**MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE PETRÓLEO ISOLADOS DE
AMBIENTES AQUÁTICOS DO ENTORNO DA BASE PETROLÍFERA DE URUCU,
COARI, AMAZONAS-BRASIL**

FERDYANNE BEATRIZ SABÓIA PEIXOTO

**MANAUS-AM
SETEMBRO/2017**

FERDYANNE BEATRIZ SABÓIA PEIXOTO

**MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE PETRÓLEO ISOLADOS DE
AMBIENTES AQUÁTICOS DO ENTORNO DA BASE PETROLÍFERA DE URUCU,
COARI, AMAZONAS-BRASIL**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - BIONORTE, na Universidade Federal do Amazonas-UFAM/Universidade do Estado do Amazonas - UEA, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia, na área de concentração de Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

Coorientadores: Prof. Dr. José Odair Pereira

Prof. Dr. Jean Charles da Cunha Peixoto

**MANAUS-AM
SETEMBRO/2017**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P379m Peixoto, Ferdyanne Beatriz Sabóia
Microrganismos degradadores de petróleo isolados de ambientes
aquáticos do entorno da Base Petrolífera de Urucu, Coari,
Amazonas-Brasil / Ferdyanne Beatriz Sabóia Peixoto. 2017
140 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Spartaco Astolfi Filho
Coorientador: José Odair Pereira
Coorientador: Jean Charles da Cunha Peixoto
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede
Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Microrganismos. 2. Biodegradação. 3. Petróleo. 4. Amazônia. I.
Astolfi Filho, Spartaco II. Universidade Federal do Amazonas III.
Título

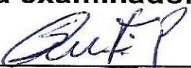
FERDYANNE BEATRIZ SABÓIA PEIXOTO

**MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE PETRÓLEO ISOLADOS DE
AMBIENTES AQUÁTICOS DO ENTORNO DA BASE PETROLÍFERA DE URUCU,
COARI, AMAZONAS-BRASIL**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - BIONORTE, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM/Universidade do Estado do Amazonas - UEA, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia.

Orientador: **Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho**
Coorientadores: **Prof. Dr. José Odair Pereira**
Prof. Dr. Jean Charles da Cunha Peixoto

Banca examinadora:



Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho (UFAM)
Orientador – Presidente da banca



Prof. Dr. Luiz Antônio de Oliveira (INPA)
Membro



Profa. Dra. Ieda Hortêncio Batista (UEA)
Membro



Prof. Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio (UEA)
Membro



Prof. Dr. Antonia Queiroz Lima de Souza (UFAM)
Membro

MANAUS - AM

SETEMBRO/2017

Aos meus filhos João Fernando e Lara Sofia, pelas experiências e desafios oportunizados a cada amanhecer, pela compreensão e amor incondicional, por aliviarem os momentos difíceis com um simples sorriso de criança.

*Meus filhos, vocês deixam meus dias mais brandos.
Sem vocês nada teria sentido!*

Com muito amor e carinho,

DEDICO!

Aos meus pais Fernando e Maria Elane (In Memoriam) por renunciarem seus sonhos em favor dos meus, por me apoiarem e incentivarem aos estudos, por me ensinarem a viver a vida com simplicidade, dignidade e honestidade.

OFEREÇO!

AGRADECIMENTOS

Ao Deus pai todo poderoso, pelo dom da vida e oportunidade de renovação, aprimoramento espiritual e intelectual ofertado a cada amanhecer;

Ao meu esposo Jean Charles, por sua dedicação como pai e marido. Pela colaboração e coorientação. Por ter me ensinado na prática e na íntegra todas as atividades e “segredos” pertinentes à formação de um bom microbiologista;

Aos meus irmãos Fagner e Fernanda, por compreenderem minha ausência ao longo da minha vida acadêmica, pelo amor, incentivo, apoio, e pelos bons momentos vividos juntos;

Às minhas filhas do coração Elise e Tetê, pelo carinho, solicitude e sufrágio constantes ao longo dessa jornada;

Aos meus familiares e amigos pelo estímulo, carinho, momentos fraternais, de reflexão e aprendizado. Agradeço especialmente aos meus avós Fernando e Margarida Sabóia (In Memoriam); à Meire Ane Feitosa, Eliane e Sebastião Lima, e Marieth Sabóia (tios); à Ana e Vicente (sogros), à Karla Miranda (amiga), e as primas Dayane e Sanayane Lima;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho, pela confiança e amizade, pelos exemplos de profissionalismo e dedicação ao ensino e à pesquisa, por me orientar com sabedoria, e a nobreza de um grande Mestre;

Ao meu coorientador, Prof. Dr. José Odair Pereira, pela serenidade e segurança transmitidas na sua coorientação, pela amizade e auxílio;

Aos Professores, Luiz Antônio, Antônia Queiroz, Ieda Batista e Pedro Queiroz, pela amizade, conversas construtivas e orientações;

Aos professores Adolfo Mota e Hiléia Barroso, seus alunos Samara Santos, Alzira Frota e Vanderlei Sabóia, pela colaboração;

Às Doutoras Marelis Ruiz pela realização da coleta, e Enedina Nogueira pelo cumprimento da etapa de sequenciamento;

As alunas Ana Beatriz, Diana Motta, Adrieli Souza, e Laís Belém pela convivência e auxílio na rotina do laboratório;

Aos colegas, Júlio Nino, Rogério, Lorena, Mirna, Hallana, Edson, Pamela, Jucileuza, João Marcelo, Gabriela, Solange, Ydrielly, Patrícia e Elza pela amizade, solidariedade e generosidade;

À Universidade Federal do Amazonas, pela infraestrutura disponibilizada para a execução das atividades acadêmicas e laboratoriais;

Ao programa de Pós- Graduação BIONORTE, ao corpo docente, discente, e membros da coordenação geral e estadual;

À Universidade Estadual do Amazonas, pela estrutura cedida para realização das análises Cromatográficas;

À Petrobrás pela infraestrutura proporcionada desde o traslado de Manaus à base Petrolífera de Urucu, pela logística de campo, suporte e acompanhamento nas coletas;

A CAPES pela concessão da bolsa, à FAPEAM e ao CNPq pelo financiamento do projeto;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!

*...“Ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse **AMOR**, nada disso me adiantaria”... (Paulo de Tarso - Primeira Carta aos Coríntios, Cap.13,V.2).*

PEIXOTO, Ferdyanne Beatriz Sabóia. Microrganismos degradadores de petróleo isolados de ambientes aquáticos do entorno da Base Petrolífera de Urucu, Coari, Amazonas-Brasil. 2017. 140f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.

RESUMO

O petróleo possui origem fóssil não renovável, e representa, ainda, a maior fonte de energia na atualidade. Os hidrocarbonetos constituintes da complexa mistura do petróleo, como os HPA's, representam uma ameaça às populações humanas, aos animais e ao meio ambiente por se tratar de xenobióticos extremamente tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos. O processo de remoção do petróleo e derivados de ambientes poluídos, requer rapidez, eficiência, baixa toxicidade e custos reduzidos. Nesse sentido, diferentes abordagens têm sido utilizadas com a finalidade de recuperar áreas impactadas com petróleo. O uso de microrganismos degradadores na recuperação de ambientes impactados, tem se mostrado um método eficaz, por agregar condições ideais. Este trabalho teve como objetivo isolar, selecionar e caracterizar, microrganismos degradadores de petróleo, nativos de ambientes aquáticos localizados no entorno da Base Petrolífera de Urucu, Coari, Amazonas-Brasil. Para isolamento dos microrganismos, as amostras de água foram enriquecidas em caldo BH com petróleo, em seguida plaqueadas em ágar BH acrescido de 1% de petróleo como fonte única de carbono. Os isolados microbianos foram submetidos ao teste qualitativo e quantitativo de biodegradação com indicador redox 2,6 diclorofenol indofenol - DCPIP. A caracterização das linhagens com potencial degradador foi realizada por meio do sequenciamento das regiões gênicas 16S e 18S, para bactérias e levedura, respectivamente. A taxa de biodegradação foi obtida por meio da análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas – CG/MS. Foi realizado o teste de susceptibilidade a antimicrobianos. Foram selecionadas por meio do ensaio qualitativo com DCPIP, três linhagens com potencial para degradar petróleo, as quais descoloriram o meio acrescido de petróleo no tempo máximo de 16 horas. Duas linhagens bacterianas foram identificadas como pertencentes às espécies *Serratia marcescens* e *Bacillus toyonensis*, e uma linhagem leveduriforme como sendo da espécie *Candida mesorugosa*. No teste quantitativo com DCPIP, a espécie bacteriana *S. marcescens* AMS212 reduziu a concentração do DCPIP a 13.08 mg.L⁻¹ em 48 horas e a espécie *B. toyonensis* AM07 foi capaz de reduzir a concentração do DCPIP a 7.23 mg.L⁻¹ em 72 horas. No teste de susceptibilidade, *S. marcescens* apresentou resistência múltipla a quatro antibióticos diferentes. A espécie *C. mesorugosa* AM15 degradou 79.4% de HPA's. Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram a capacidade dos isolados em degradar petróleo e derivados, sugerindo sua utilização em projetos futuros visando à recuperação de áreas impactadas com esses xenobióticos.

Palavras-Chave: Degradação microbiana, Petróleo, DCPIP, HPAs, CG/MS.

PEIXOTO, Ferdynne Beatriz Savoia. Petroleum degrading microorganisms isolated from aquatic environments around the Urucu Petroleum Base, Coari, Amazonas-Brazil. 2017. 140f. Thesis (Doctorate in Biodiversity and Biotechnology) - Federal University of Amazonas, Manaus, 2017.

ABSTRACT

Oil has a non-renewable fossil origin, and still represents the largest source of energy today. Hydrocarbons constituting the complex petroleum blend, such as HPA's, pose a threat to human populations, animals and the environment as they are extremely toxic, mutagenic and carcinogenic xenobiotics. The process of removing oil and by-products from polluted environments requires speed, efficiency, low toxicity and low costs. In this sense, different approaches have been used with the purpose of recovering areas impacted with oil. The use of degrading microorganisms in the recovery of impacted environments has been shown to be an effective method, by aggregating ideal conditions. This work aimed to isolate, select and characterize, petroleum degrading microorganisms, natives from aquatic environments located near the Urucu Petroleum Base, Coari, Amazonas-Brazil. For isolation of the microorganisms, water samples were enriched in BH broth with petroleum, and then plated on BH agar plus 1% petroleum as the sole carbon source. The microbial isolates were submitted to the qualitative and quantitative biodegradation test with redox indicator 2,6 dichlorophenol indophenol - DCPIP. The characterization of the strains with degradation potential was performed by sequencing the 16S and 18S gene regions for bacteria and yeast, respectively. The rate of biodegradation was obtained by gas chromatography coupled to GC/MS mass spectrometry. The antimicrobial susceptibility test was performed. Three lines with potential to degrade oil were selected by means of the qualitative test with DCPIP, which discolored the medium plus oil in the maximum time of 16 hours. Two bacterial strains were identified as belonging to the species *Serratia marcescens* and *Bacillus toyonensis*, and a yeast strain as *Candida mesorugosa*. In the quantitative assay with DCPIP, the bacterial species *S. marcescens* AMS212 reduced the DCPIP concentration to 13.08 mg.L⁻¹ in 48 hours and the *B. toyonensis* AM07 species was able to reduce the concentration of DCPIP to 7.23 mg.L⁻¹ in 72 hours. In the susceptibility test, *S. marcescens* presented multiple resistance to four different antibiotics. The species *C. mesorugosa* AM15 degraded 79.4% of HPA's. The results obtained in the present study demonstrated the ability of the isolates to degrade oil and derivatives, suggesting their use in future projects aiming at the recovery of impacted areas with these xenobiotics.

Keywords: Microbial degradation, Petroleum, DCPIP, HPAs, CG- MS.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: A) Vista aérea da Base Petrolífera de Urucu. B) Localização da Província Petrolífera de Urucu - Coari /AM.....	23
Figura 2: Base Petrolífera de Urucu.....	23
Figura 3: Principais Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos classificados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA).....	26
Figura 4: <i>Serratia marcescens</i> isolada de igarapé localizado no entorno da base petrolífera de Urucu, Coari -AM.....	30
Figura 5: <i>Bacillus toyonensis</i> degradador isolado do dique de efluente da Base Petrolífera de Urucu, Coari-AM.....	31
Figura 6: <i>Candida mesorugosa</i> isolada do dique de efluente da Base Petrolífera de Urucu,, Coari, AM.....	33
Figura 7: Princípio da degradação aeróbia dos hidrocarbonetos.....	34
Figura 8: Estrutura química da reação de oxirredução do DCPIP.....	37
Figura 9: RNA ribossômico, ribonucleoproteínas e ribossomos de procariontes.....	38
Figura 10: RNA ribossômico, ribonucleoproteínas e ribossomos de eucariontes.....	39

Figura 11: Região do rRNA com o espaço interno transcrito ITS1 e ITS2.	39
--	----

CAPÍTULO I

Figure 1: Standard curve - [DCPIP].....	67
---	----

Figure 2. Concentration of DCPIP as a function of time.....	69
---	----

Figure 3. Antimicrobial activity profile of isolated <i>S. marcescens</i> AMS212 <i>E.coli</i> was used as control.....	72
---	----

Figure 4. Phylogenetic tree showing the taxonomic location of AMS212 strain. The phylogenetic dendrogram was built by using Neighbor-Joining method, based on sequences from gene region rRNA 16S. Values of bootstrap determined for 1000 repetitions are shown at the ramifications nodes.....	73
--	----

CAPÍTULO II

Figure 1: Standard curve - [DCPIP].....	86
---	----

Figure 2: Biodegradation test with DCPIP - plate after 16 hours of incubation	89
---	----

Figure 3: Concentration of DCPIP as a function of time.....	89
---	----

Figure 4. Phylogenetic analysis of the specie <i>B. toyonensis</i> AM07 by using partial sequences from gene rRNA 16S bacterial strains from in the GenBank-NCB.....	90
--	----

CAPÍTULO III

Figure 1: a) PCR-RFLP yeast identification method. The 2,622 bp was digested with the *DdeI* restriction enzyme and produced the same pattern as *Candida mesorugosa* L96D (a). The arrangement of restriction fragments in the 2% agarose gel can be compared with the in silico prediction table (b). Fragments 222 and 224 are collapsed, as well as fragments 205 and 197 due to having similar sizes. In (c) the restriction map shows the position of the 11 cut sites of *DdeI*. L 100 bp DNA Ladder..... 104

Figure 2: Sequence analyses. The 2,622 bp amplicon was sequenced using the Sanger method and the sequence alignment showed 3 SNPs, indicated by red arrows. (a) Eletropherogram showing the position of the SNP observed in (b) the blast2sequence analyses. Numbers represents the position of each nucleotide in the sequence..... 105

Figure 3: Molecular phylogenetic analysis. The evolutionary history was inferred by using the maximum likelihood method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test are shown next to the branches. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 2,460 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6..... 106

Figure 4: Biodegradation of PAH from diesel 3 - naphthalene, 2 - methyl naphthalene, 1 - methyl naphthalene, demethyl naphthalene, trimethyl naphthalene, and phenanthrene by the *Candida mesorugosa* line, strain AM15 (a) Individual biodegradation rates by replicate. (B) Percentage of total PAH degradation..... 107

Figure 5: A) Reaction controls. Numbered chromatographic peaks correspond to the following compounds: 1) Naphthalene D-8 * (Surrogate); 2) Naphthalene; 3) 2-methylnaphthalene; 4) 1-methylnaphthalene, 5) Biphenyl; 6) Alkyl naphthalenes; 7) Acenaftene D-10 *; 8) Phenanthrene D-10 * (Surrogate);

9) Phenanthrene; 10) Fluoranthene D-10 * (Internal Standard). D-8 and D-10 *: Deuterated Compounds. B) Mass Spectrum demonstrating the degradation of PAHs by <i>C. mesorugosa</i> AM15 after 14 days of incubation.....	107
--	-----

ANEXOS

Anexo I: Figura 1: Sítios de coleta. A-B Igarapé natural - livre de contaminação com petróleo. C-D) Dique de efluente. E) Igarapé após o encontro com o dreno do dique de efluente.....	134
---	-----

Anexo II: Figura 2: Seleção de microrganismos. A-B) Enriquecimento das amostras. C) <i>B. toyonensis</i> . D) <i>C. mesorugosa</i> . E) <i>S. marcescens</i> . F) Isolamento de microrganismos.....	135
---	-----

Anexo III: Figura 3: Caracterização fenotípica. A-B) Tríplice açúcar ferro (TSI). C) Citrato de Simons. D) Manitol. E) Oxidase. F) Coagulase. G) Voges-Proskauer. H) Fermentação da lactose.....	136
--	-----

Anexo IV: Figura 4: Microrganismos degradadores de petróleo. A-B) <i>Candida mesorugosa</i> . C-D) <i>Bacillus toyonensis</i> . E-F) <i>Serratia marcescens</i> . G-H) Ensaio em placas de cultura de células com 24 poços.....	137
---	-----

Anexo V: Figura 5: Crescimento microbiano em meio BH suplementado com 1% de óleo diesel. (SM) <i>Serratia marcescens</i> . (C) <i>Candida mesorugosa</i> . (BT) <i>Bacillus toyonensis</i>	138
--	-----

Anexo VI: Figura 6: A-B-C-D-E) Avaliação do índice de emulsificação. Ensaio do colapso da gota e dispersão do petróleo.....	139
---	-----

Anexo VII:Figura 7: Resultados dos antibiogramas realizados com linhagens bacterianas degradadoras de petróleo.....	140
---	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1. Composition of qualitative test.....	66
Table 2. Composition of the quantitative assay.....	66
Table 3: Absorbance readings at 600 _{nm} and dilutions of DCPIP redox indicator.....	67
Table 4. DCPIP Concentrations.....	70

CAPÍTULO II

Table 1. Composition of the quantitative assay.....	85
Table 2. Absorbance readings at 600 _{nm} and dilutions of redox indicator DCPIP.....	86
Table 3. DCPIP Concentrations.....	89

APÊNDICE I

Tabela 1: Número de UFC's por ponto de coleta.....	123
Tabela 2: Identificação morfotintorial e resultados dos testes enzimáticos dos microrganismos isolados do Dique de Efluente (S1); Igarapé Natural (S2) e Igarapé após a confluência com o efluente (S3).....	124
Tabela 3: Análise estatística semiquantitativa da produção de lipase.....	126
Tabela 4: Análise estatística semiquantitativa da produção de amilase.....	127
Tabela 5: Análise estatística semiquantitativa da produção de celulase.....	128
Tabela 6: Análise estatística semiquantitativa da produção de protease.....	129
Tabela 7: Atividade enzimática expressa por isolados do Dique de Efluente (S1); Igarapé Natural (S2) e Igarapé após a confluência com o efluente (S3).....	130

LISTA DE ABREVIATÖES

BH	Burshnell Haas
Σ16PHAs	Somatório das concentrações dos HPAs prioritários segundo a US-EPA
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
DCPIP	2,6-diclorofenol indofenol
D.O	Densidade óptica
rpm	Rotações por minuto
PHAs ou HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
°C	Grau Celsius
nm	Nanômetros
UFC's	Unidades Formadoras de Colônia
M	Molar
NaCl	Cloreto de sódio
TSA	Ágar triptona soja
rRNA	RNA ribossomal
rDNA	DNA ribossomal
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ATCC	American Type Culture Collection
pH	Potencial hidrogênico
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	18
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
Aspectos gerais da origem do petróleo e sua exploração na Amazônia.....	20
Hidrocarbonetos do Petróleo.....	24
Microrganismos degradadores de petróleo.....	27
<i>Serratia marcescens</i>	29
<i>Bacillus toyonensis</i>	31
<i>Candida mesorugosa</i>	32
Mecanismo de biodegradação dos hidrocarbonetos.....	33
Fatores que influenciam na biodegradação.....	35
Seleção de microrganismos degradadores.....	36
Caracterização genotípica e fenotípica.....	37
Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.....	41
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 43
OBJETIVOS.....	59
LISTA DE PUBLICAÇÕES.....	60
 CAPÍTULO I- Petroleum biodegrading and co-resistance to antibiotics by <i>Serratia marcescens</i> strain isolated in Coari- Amazonas.....	 61
Abstract.....	62
Resumo.....	63
Introduction.....	64
Material and methods.....	65
Results and discussion.....	69
Conclusions.....	73
Acknowledgments.....	74
References.....	74

CAPÍTULO II: Assessment of petroleum biodegradation for <i>Bacillus toyonensis</i> by using redox indicator 2,6 dichlorophenol indophenol.....	80
Abstract.....	81
Resumo.....	82
Introduction.....	82
Material and methods.....	83
Results and discussion.....	88
Conclusions.....	91
Acknowledgments.....	91
References.....	91
 CAPÍTULO III : Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by <i>Candida mesorugosa</i> native to the Brazilian Amazon	 96
Abstract.....	97
Introduction.....	98
Material and methods.....	99
Results.....	103
Discussion.....	108
Conclusions.....	109
Acknowledgments.....	109
References.....	110
 CONCLUSÕES.....	 115
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	116
 APÊNDICE.....	 117
Apêndice I: Artigo IV - Microrganismos isolados de ambientes aquáticos da Amazônia produtores de hidrolases de interesse industrial e biotecnológico.....	117
 ANEXOS.....	 134
Anexo I : Coleta das amostras de água.....	134

Anexo II: Enriquecimento das amostras e seleção de microrganismos degradadores de petróleo.....	135
Anexo III: Testes bioquímicos realizados com as linhagens bacterianas degradadoras de petróleo isoladas de ambientes aquáticos da Amazônia.....	136
Anexo IV: Avaliação do potencial de biodegradação do petróleo por linhagens microbianas isoladas de ambientes aquáticos do entorno da Base petrolífera de Coari-AM, utilizando o indicador redox DCPIP.....	137
Anexo V: Avaliação do crescimento microbiano em meio BH suplementado com 1% de óleo diesel como única fonte de carbono.....	138
Anexo VI: Avaliação da produção de biossurfactante por linhagens microbianas com potencial para degradar petróleo.....	139
Anexo VII: Perfil de sensibilidade a antimicrobianos das linhagens bacterianas degradadoras de petróleo.....	140

INTRODUÇÃO

Os combustíveis fósseis representam na atualidade, mais de 50% da matriz energética mundial. O petróleo e seus derivados mobilizam a economia do planeta, ora na geração de energia para uso industrial ou doméstico, ora na movimentação dos meios de transporte, coletivos e individuais. A intensa manipulação do petróleo, desde sua obtenção nos poços de perfuração, passando pelos processos de refino, e finalmente o transporte ao destino final, geram resíduos de menor ou maior monta que causam danos ao meio ambiente. Todavia, os derrames acidentais de petróleo ainda têm sido a principal origem de impactos ambientais que atingem grandes proporções, como o acidente ocorrido com o navio petroleiro Exxon Valdez em 1989, que derramou cerca de 11 milhões de petróleo bruto no mar, atingindo aproximadamente 15% da costa do golfo do Alasca e exterminando milhares de animais marinhos e aves, danos irreparáveis à fauna e flora daquele ecossistema (IEA, 2017; CALIXTO, 2011; SOUZA FILHO, 2006; SEABRA, 2005).

No Brasil há vários registros de vazamentos de óleo em pequenas e grandes proporções, como os que ocorreram com os petroleiros Takimya Maru em 1974 e Brazilian Marina em 1978, no Canal de São Sebastião, litoral paulista, ao colidirem com rochas submersas. Estima-se que em cada um destes eventos tenham vazado aproximadamente 6.000 toneladas de petróleo (POFFO, 2002).

Os combustíveis fósseis têm desencadeado desastres ambientais, afetando todos os níveis tróficos da cadeia alimentar, tornando-se premente o uso de biotecnologias que visem minimizar os danos causados ao meio ambiente. Nesse contexto, a biorremediação se destaca como uma tecnologia limpa, com baixa toxicidade e custos reduzidos, que aproveita a atividade microbiana natural, em favor do restabelecimento e equilíbrio do ambiente impactado (GAYLARDE et al., 2005, BENTO et al, 2003, BRITO et al., 2010). O emprego dos microrganismos nas tecnologias de biorremediação está

associado à facilidade de propagação, variabilidade genética e versatilidade metabólica que os capacitam a desenvolver funções únicas e cruciais na degradação da complexa mistura de hidrocarbonetos existentes no petróleo, sejam eles alifáticos, cíclicos ou aromáticos (BATISTA, 2009; ALEXANDER, 1994).

A eficácia comprovada, de que os microrganismos são capazes de degradar diferentes compostos do petróleo, e que esses microrganismos degradadores, estão amplamente distribuídos na natureza, podendo ser isolados facilmente de amostras de solos, água, plantas e sedimentos (HESHAM et al., 2006; 2009; DAS & CHANDRAN, 2011, FLOODGATE, 1984; ZOBELL, 1946; BATISTA, 2009; ARAÚJO, 2014; SOUZA, 2015), tem favorecido o desenvolvimento de muitas pesquisas na área de biorremediação, inclusive na Amazônia, com vista a obtenção de novas linhagens microbianas degradadoras, que se mostrem bem adaptadas às mais diversas condições de pressão ambiental determinadas pelos derramamentos acidentais de petróleo e derivados, bem como linhagens produtoras de compostos bioativos como biossurfactantes e enzimas (LIMA et al., 2016; LIMA, 2016; SOUZA, 2015, BRITO, 2013; ARAÚJO, 2014; BATISTA, 2009). Nesse contexto, esta pesquisa vem contribuir com novas linhagens microbianas degradadoras de petróleo, nativas da Amazônia Central, que poderão futuramente, ser utilizadas em tecnologias de remediação.

O presente trabalho foi organizado em três capítulos que compilam informações referentes ao potencial de biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo pelas linhagens microbianas *Candida mesorugosa*; *Bacillus toyonensis* e *Serratia marcescens*, isoladas do dique de efluente e do igarapé localizados no entorno da Base Petrolífera de Urucu, município de Coari – Amazonas. Os capítulos foram formatados de acordo com as normas das revistas às quais foram submetidos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Aspectos Gerais da Origem do Petróleo e sua Exploração na Amazônia

O petróleo é um recurso não renovável, originado a partir da decomposição da matéria orgânica fossilizada há milhões de anos. É caracterizado como um líquido oleoso, inflamável, menos denso que a água, com tonalidades que vão do preto ao castanho (ATLAS, 1981; CRAPEZ et al, 2002; ZÍLIO & PINTO, 2002; VAN HAMME et al., 2003). O petróleo é constituído por diferentes compostos, incluindo os n-alcanos, c-alcanos, compostos aromáticos, resinas, asfaltenos entre outras frações (PLAZA et al, 2007; DAS & CHANDRAN, 2011; LIANG et al., 2012). De acordo com *United Nations Environment Programme Chemicals* - UNEP (2002) os principais HPAs presentes no petróleo bruto são o naftaleno, o fenantreno e seus derivados alquilados. Os diversos tipos de petróleo existentes no mundo são definidos pela variação de compostos orgânicos tais como os hidrocarbonetos, cujas frações leves formam os gases e as frações pesadas o óleo cru. A distribuição destes percentuais de hidrocarbonetos é o que caracteriza os tipos de petróleo existentes no mundo (PEREIRA et. al., 2012).

O petróleo é considerado a matéria prima da indústria petrolífera por se tratar da principal fonte de energia em todo o mundo. Nos dias atuais é difícil determinar algo que não dependa direta ou indiretamente do petróleo (PEREIRA et. al., 2012). Entre outros produtos podemos citar os solventes, óleos combustíveis, gasolina, óleo diesel, querosene, gasolina de aviação, lubrificantes, asfalto e plástico como os principais derivados obtidos a partir do refino do petróleo (PEREIRA et. al., 2012).

A exploração mundial do petróleo data do século XIX, onde teve início as buscas por jazidas e perfuração de poços de petróleo. Desde então, a indústria petrolífera sofreu grande expansão e se estabeleceu nos cinco continentes, sobretudo nos Estados Unidos e Europa, principalmente após a invenção dos motores a gasolina e a óleo diesel (PEREIRA et. al, 2012). A

busca por fontes de petróleo no Brasil iniciou na década de 1860, porém somente em 1939, na localidade de Lobato, no Recôncavo Baiano, foi descoberta a primeira jazida de petróleo em território brasileiro (MORAIS, 2013). Na região amazônica, norte do país, a busca por jazidas de petróleo data do início do século XX, onde a Bacia do Amazonas foi pioneira nessa exploração (PETROBRÁS, 2005). Nessa época a província petrolífera de Urucu era apenas um campo de estudos, pesquisas e tentativas de exploração de petróleo na região amazônica (PETROBRÁS, 2005).

Os principais eventos históricos da exploração do petróleo na região amazônica iniciaram em 1917 quando o Serviço Mineralógico do Brasil, órgão do governo federal, criado em 1905 para localizar jazida de carvão e outros combustíveis, foi responsável pela perfuração do primeiro poço nessa região (PETROBRÁS, 2005). Em 1925 o Serviço Mineralógico do Brasil, inaugurou na cidade de Itaituba, no Pará, a primeira cidade com iluminação pública a gás natural (PETROBRÁS, 2005). Em 1934 foi iniciada a exploração de petróleo nos grandes rios do Amazonas (PETROBRÁS, 2005).

Os primeiros levantamentos sísmicos na Amazônia, realizados com intuito de encontrar gás natural e petróleo ocorreram no ano de 1948 (PETROBRÁS, 2005). No ano de 1955, na localidade de Nova Olinda, situada na margem do rio Madeira, a 125 km de Manaus, Amazonas, foi descoberto o primeiro poço (NO-1-AZ) com uma pequena acumulação de petróleo, à profundidade de 2.700 metros (MORAIS, 2013; GARCIA, 2008). As primeiras descobertas significativas de petróleo e de gás natural no Amazonas aconteceram no final da década de 1970, época em que as pesquisas na bacia do Solimões se intensificaram (GARCIA, 2008; RIMA, 2004).

O ano de 1978 registra o crescimento das pesquisas na Bacia do Solimões estimulados pela descoberta uma reserva de gás natural na bacia do Rio Juruá (GARCIA, 2008, RIMA, 2004). No ano de 1986 ocorreu a descoberta da primeira jazida de óleo e gás em escala comercial, localizada nas proximidades do rio Urucu (GARCIA, 2008). Em 1988 foi iniciada a

produção comercial de petróleo na Província Petrolífera de Urucu com produção inicial de 3.500 barris de petróleo por dia, os quais eram transportados por meio de pequenas balsas, pelos rios Urucu e Solimões até a Refinaria Isaac Sabbá, situada na cidade de Manaus (PETROBRAS, 2008). A descoberta de gás em escala comercial viável ocorreu no Campo de Azulão (poço 1-RUT-1-AM), Bacia do Amazonas em 1999 (ANP, 2015). Em 2001 foi descoberta uma segunda acumulação de gás comercial no Campo de Japiim poço 1-BRSA- 98-AM (1-IMP-1-AM) (ANP, 2015).

Atualmente a Província Petrolífera de Urucu denominada também de Base Operacional Geólogo Pedro de Moura está localizada no Município de Coari, situado a 653 km em linha reta a sudoeste de Manaus (4°30'S/64°30'W), constitui um sistema ativo de Produção de petróleo e gás da Petrobrás pertencente à Unidade de Exploração e Produção da Bacia amazônica (PETROBRAS, 2008). Esse complexo petrolífero faz do estado do Amazonas, o único produtor de petróleo e gás da Amazônia brasileira com reservas estimadas em 187,5 milhões de barris de petróleo e 89,7 bilhões de metros cúbicos de gás natural difundidas nas Bacias Sedimentares do Solimões e do Amazonas (Figura 1 A-B, Figura 2) (ANP, 2012; PETROBRÁS, 2008).

O petróleo prospectado em Urucu – AM, descoberto em 1987, é constituído por 64,8% de compostos parafínicos (leves); 20,2% de compostos naftênicos (médios) e 15% de hidrocarbonetos aromáticos (pesados), é considerado nobre por ser de alta qualidade, possui energia para fluir espontaneamente e é analisado como mais leve dentre os óleos processados nas refinarias do país (PETROBRÁS, 1997). O petróleo de Urucu é utilizado especialmente na produção de artigos com alto valor comercial agregado como o óleo diesel, a nafta petroquímica, a gasolina e o GLP – gás de cozinha (PETROBRÁS, 2008).



Figura 1: A) Vista aérea da Base Petrolífera de Urucu. Fonte: (www.petrobras.com.br). B) Localização da Província Petrolífera de Urucu - Coari /AM. Fonte: Prado, (2009), com modificações.

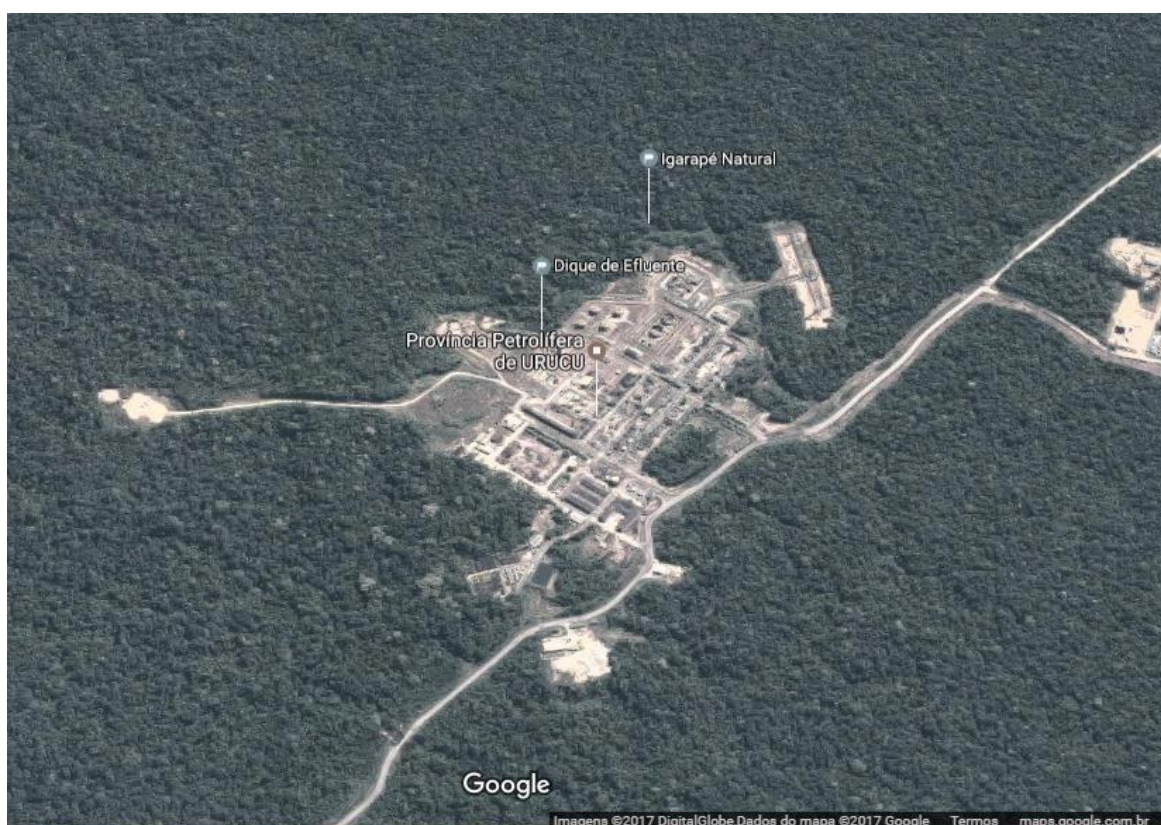


Figura 2: Base Petrolífera de Urucu. Fonte: Google Maps 2017.

Hidrocarbonetos do petróleo

Os hidrocarbonetos são definidos como compostos orgânicos constituídos por carbono e hidrogênio, são apolares e hidrofóbicos. Tendem a se associar as fases sólidas, tais como as partículas em suspensão, os tecidos biológicos e os sedimentos. Entre as principais fontes de hidrocarbonetos podemos citar os combustíveis fósseis, tais como, petróleo, gás natural, hulha e xisto betuminoso (BENTO, 2005; ANDRADE, 2008; PAULINO, 2011). Os hidrocarbonetos são os principais constituintes do petróleo e podem ser classificados em alifáticos, cíclicos e aromáticos.

Os hidrocarbonetos alifáticos (cadeia aberta) incluem os alcanos (ligações simples), os alcenos (ligação dupla) e alcinos (ligação tripla). Os alcanos ou parafinas são hidrocarbonetos saturados, formados por cadeias carbônicas acíclicas, ramificadas ou não, apresentam ligações simples entre seus átomos de carbonos, sua fórmula geral compreende C_nH_{2n+2} . Os alcanos podem se apresentar nos estados líquido (5-15 átomos de carbono), gasoso (1-4 átomos de carbono) ou sólido (+ 16 átomos de carbono). Os alcanos são constituintes do petróleo e do gás natural. O petróleo parafínico, por sua vez, apresenta até 90% de alcanos. Quanto ao gás natural, seu principal constituinte é o metano. O metano (CH_4) é caracterizado como uma substância gasosa, inodora, incolor e extremamente inflamável (FELTRE, 2004; USBERCO & SALVADOR, 2002).

Os hidrocarbonetos cíclicos compreendem os cicloalcanos (ligações simples), cicloalcenos (ligação dupla) e os, cicloalcinos (ligação tripla); Os cicloalcanos também conhecidos como naftênicos são hidrocarbonetos cíclicos e apresentam ligações simples em sua conformação. Os cicloalcanos constituem pouco mais de 25% do petróleo bruto (ARRUDA, 2008; SOUTO & DUARTE, 2006; FELTRE, 2004; MORRISON, 1972; SOLOMONS, 1996).

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – (HPAs) são estruturas constituídas por moléculas de carbono e hidrogênio formadas por dois ou mais anéis aromáticos condensados com cinco ou seis átomos de carbono,

podendo estar ou não substituídos por radicais alquilas (metil, etil, dimetil, trimetil, etc.) ou conter heteroátomos (NETTO et al., 2000; HARITASH & KAUSHIK, 2009; BARROSO, 2010). Os HPAs alquilados apresentam uma cadeia aberta, curta, de n-alcanos, que se encontram associados ao conjunto de anéis aromáticos, já os HPAs parentais são caracterizados por não apresentarem ramificações (OLIVEIRA, 2007). Os HPAs considerados de baixo peso molecular (LMW) possuem em sua conformação 2-3 anéis aromáticos e são geralmente encontrados na fase gasosa (antraceno, acenafteno, acenaftaleno, fluoreno, naftaleno e fenantreno) enquanto que os HPAs considerados de alto peso molecular (HMW) são formados por 4-6 anéis aromáticos (pireno, fluoranteno, benzo(a)antraceno, benzo(g,h,i)perileno) e são adsorvidos na superfície de partículas em suspensão (NETTO et al., 2000; PAVLIDOU et al., 2002; CELINO & QUEIROZ, 2006; ALMEIDA et al., 2007, BOUROTTE et al., 2009, SOUZA, 2015).

Os HPAs são classificados como Substâncias Tóxicas Persistentes (STPs), representam perigo à saúde humana, aos animais e ao meio ambiente, mesmo em concentrações muito baixas, devido a sua alta toxicidade (ALMEIDA et al., 2007, BRITO et al., 2005). Este importante grupo de hidrocarbonetos compreendem um grupo formado por mais de 100 compostos orgânicos diferentes, dos quais um grupo de 16 HPAs com peso molecular variando entre 128 e 278 g/mol, foi considerado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA) como poluentes prioritários, devido a sua toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade (Figura 3) (PASSARINI et al., 2011; TING, et al., 2011; HARITASH & KAUSHIK, 2009; HESHAM et al. 2009; CARUSO & ALABURDA, 2008; JAQUES et al., 2007; MEIRE et al., 2007; NETTO et al., 2000; STAPLETON et al, 1998; IARC 1983). Os principais HPA's encontrados no petróleo são naftaleno, fenantreno e seus derivados alquilados (UNEP, 1991; PETERS e MOLDOWAN, 1993).

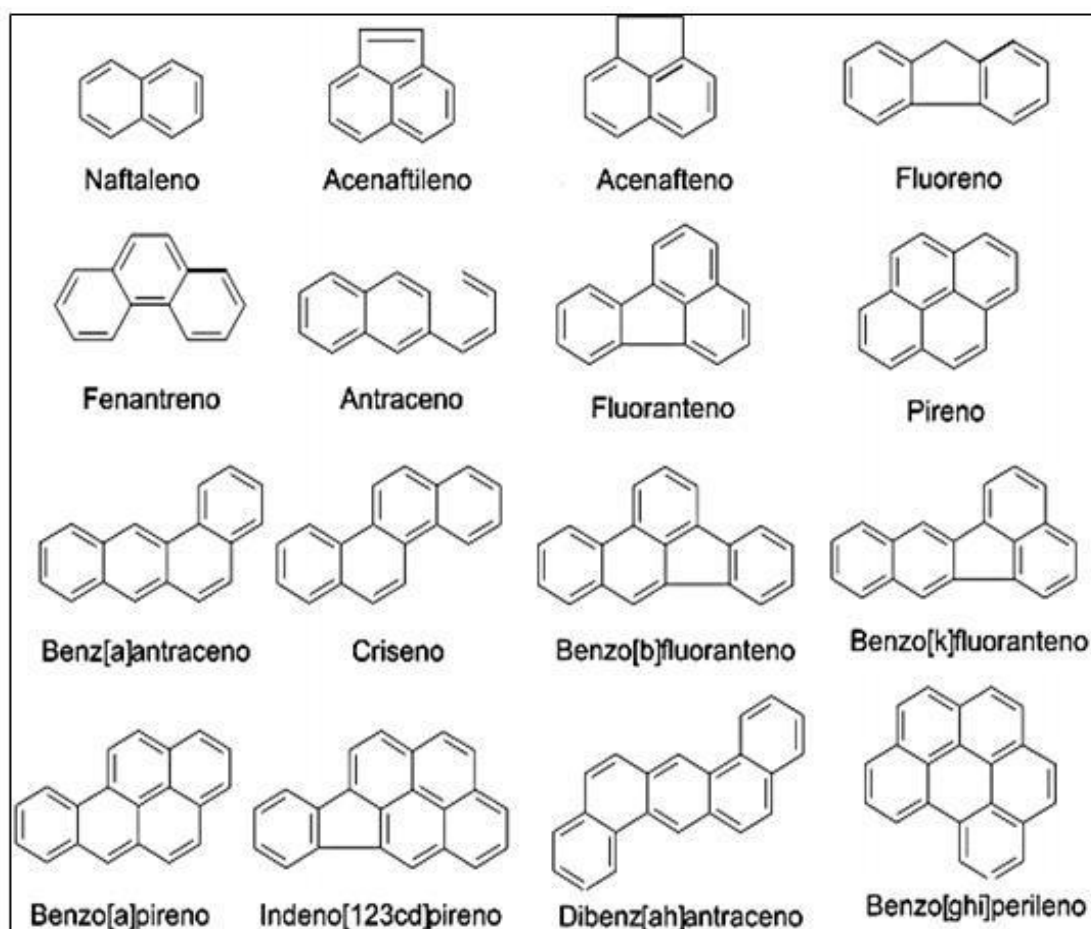


Figura 3: Principais Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos classificados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA). Fonte: Meire et al., (2007).

Estudos ressaltam que a propagação dos HPAs no ambiente é originada a partir da atividade antrópica e ocorre por meio de várias rotas como derrame de petróleo e seus derivados, exaustão de motores a diesel e gasolina, queima do carvão, incineração de plantas e rejeitos agroindustriais entre outros processos industriais (pirogênica) (BRITO et al., 2005; NETTO, et al., 2000). Os HPAs pirogênicos são formados por compostos de alto peso molecular, possuem 4-6 anéis aromáticos, baixo grau de alquilação (NEFF, 1979), e são mais complexos de serem biodegradados, devido ao difícil acesso dos microrganismos a esses compostos (BOULOUBASSI & SALIOT, 1993). Já os HPAs de origem petrogênica exibem em sua estrutura molecular 2-3 anéis aromáticos, alquilsubstituintes e/ou de heteroátomos (NEFF, 1979). Quando essa importante classe de xenobióticos, é liberada no ambiente aquático associam-se as partículas na atmosfera ou ainda, a matéria

orgânica, sedimento, devido sua baixa solubilidade em água e natureza hidrofóbica (ALMEIDA et al., 2007). No solo, esses contaminantes tendem a concentrar-se nas zonas saturadas e não saturada (BRITO et al., 2010).

Microrganismos degradadores de petróleo

Há décadas tem sido reportado o potencial metabólico dos microrganismos capazes de utilizar compostos do petróleo como fonte de carbono e energia (ZOBELL, 1946; ATLAS, 1981; RISER-ROBERTS, 1998; JAHANGEER & KUMAR, 2013; PANKAJ & BAJPAI, 2012; MACNAUGHTON et al., 1999). Desde então, os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, vêm sendo empregados em tecnologias de remediação, de áreas impactadas, por apresentarem baixa toxicidade, e efetividade na remoção dos contaminantes (OLAJIRE & ESSIEN, 2014; DAS & CHANDRAN, 2011; BENTO et al., 2003).

De acordo com Atlas (1981) e Riser-Roberts (1998) os microrganismos com potencial de degradação podem ser corriqueiramente encontrados em áreas impactadas, bem como em áreas não impactadas. Todavia, observa-se que em ambientes não impactados, a população microbiana degradadora pode chegar a constituir menos de 1% da comunidade. Enquanto que em ambientes contaminados, ou seja, com disponibilidade de hidrocarbonetos, os microrganismos degradadores, proliferam-se rapidamente (ATLAS, 1995; BRITO et al., 2010; RITTMANN, 1992) podendo chegar a constituir 100% da comunidade microbiana.

Diferentes estudos reportam que os microrganismos nativos, melhor adaptados ou que foram expostos previamente ao petróleo, apresentam maiores taxas de biodegradação se comparados a comunidades não expostas a esses compostos (OLAJIRE & ESSIEN, 2014; BRITO et al., 2010; KATAOKA, 2001; SEABRA, 2001; ATLAS, 1995; RITTMANN, 1992). Esse fato pode ser explicado devido algumas populações microbianas terem preferência somente por compostos do petróleo, enquanto que outras populações utilizam além do petróleo, outras fontes de alimento (ZAKI et al.,

2015a; 2013b; JAHANGEER & KUMAR, 2013; PANKAJ & BAJPAI, 2012; YAKIMOV et al , 2007; HOPPER, 1991; LEAHY & COLWELL, 1990; SMITH, 1990; ATLAS & BARTHA, 1972; ATLAS, 1981).

Os microrganismos são capazes de degradar hidrocarbonetos aromáticos ou alifáticos (cadeias longas, curtas, lineares ou ramificadas), contudo, as moléculas de cadeia alifática são mais susceptíveis ao ataque microbiano, por se tratarem de estruturas químicas com menor complexidade (RAMSAY et.al., 2000), Segundo Das e Chandran (2010), o ataque microbiano aos hidrocarbonetos se dá de acordo com sua susceptibilidade sendo, portanto, biodegradados na seguinte ordem: *n*-alcanos >alcanos ramificados > aromáticos de baixo peso molecular> cicloalcanos> aromáticos de alto peso molecular. Contudo, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de alto peso molecular (HPAs), podem não ser degradados.

Dentre os microrganismos degradadores, há uma predominância das bactérias nos ambientes marinhos, enquanto que os fungos filamentosos e leveduras são predominantes em ambientes de água doce e terrestres (OLAJIRE & ESSIEN, 2014; BRITO et al., 2010; KATAOKA, 2001; SEABRA, 2001; ATLAS, 1995; RITTMANN, 1992). Os principais gêneros microbianos descritos na literatura com habilidade de degradar compostos do petróleo são: *Acidovorans*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Beijemickia*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Comomonas*, *Corynebacterium*, *Cycloclasticus*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Microbacterium*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Neptunomonas*, *Nocardia*, *Paracoccus*, *Pasteurella*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Vibrio*, *Blastochloris*, *Azoarcus*, *Dechloromonas*, *Geobacter*, *Desulfobacula*, *Desulfobacterium*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Rhodosporidium*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Cladosporiumm*, *Mucor* e *Rhizopus* (CRAPEZ et al., 2002; VAN HAMME et al., 2003; SANTOS &

LINARDI, 2004; JACQUES et al., 2007; MANDRI & LIN, 2007; SEO et al., 2009; DAS & CHANDRAN ,2011).

Serratia marcescens

Serratia marcescens, é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, de crescimento quimioautotrófico, pertencente à família Enterobacteriaceae (HEJAZI & FALKINER, 1997). *S. marcescens*, tem sido descrita como uma bactéria saprófita, (HEJAZI & FALKINER, 1997), cosmopolita, podendo ser encontradas em ambientes aquáticos e solos, ou associadas a plantas, insetos, humanos e outros animais (Figura 4) (GRIMONT & GRIMONT, 1992; ASHELFORD et al., 2002, IGUCHI et al., 2014).

A espécie *S. marcescens* tem sido reportada como a mais importante dentre as espécies do gênero *Serratia* devido sua capacidade de produzir compostos bioativos, como a prodigiosina, um pigmento vermelho natural, Serrawettina, um biotensoativo que lhe confere aderência no processo de colonização de superfícies, enzimas, como as proteases, nucleases, lipases, quitinases, benzonases e cloroperoxidasas (MONTANER et al., 2000; PÉREZ-TOMÁS et al., 2003; MOROHOSHI et al., 2007; KALIVODA et al., 2010; ARAÚJO, 2010).

Além das habilidades descritas acima, *S. marcescens* tem sido mencionada como sendo capaz de utilizar uma ampla gama de nutrientes, podendo sobreviver e crescer em condições extremas, inclusive em desinfetantes e antissépticos (HEJAZI & FALKINER, 1997). *S. marcescens* tem potencial para degradar diferentes hidrocarbonetos, utilizando-os como fonte de carbono e energia para sua manutenção e sobrevivência (DE LA FUENTE et. al, 1991; IJAH, 1998, WONGSA et al., 2004; JAYSREE et al., 2015). Wongs et al., (2004) ressaltam que a espécie *S. marcescens* é capaz de degradar um amplo espectro de hidrocarbonetos, principalmente compostos aromáticos, e alcanos de cadeia longa. De La Fuente et al., (1991)

reportam a capacidade da *S. marcescens* oxidar compostos de aldeídos aromáticos.

S. marcescens é um patógeno oportunista, relatado como um importante agente de infecções relacionadas à saúde humana como pneumonia, septicemia, urinária, meningite dentre outras (CARVALHO et al., 2010; HEJAZI & FALKINER, 1997; SALGADO, 2013). Essa espécie bacteriana apresenta alto nível de resistência aos antimicrobianos, dentre eles os antibióticos β -lactâmicos de espectro estendido, drogas usadas em neonatologia, e agentes antissépticos (CARVALHO et al., 2010).

De acordo com Santos (2004) a resistência apresentada por alguns microrganismos pode estar relacionada a fatores genéticos, pelo fato desses microrganismos possuírem genes que codificam mecanismos bioquímicos impedindo a ação dos antibióticos. A resistência bacteriana aos antimicrobianos pode ser originada devido à ocorrência de mutações, transferência de genes, ou mecanismos naturais (TAVARES, 2000).

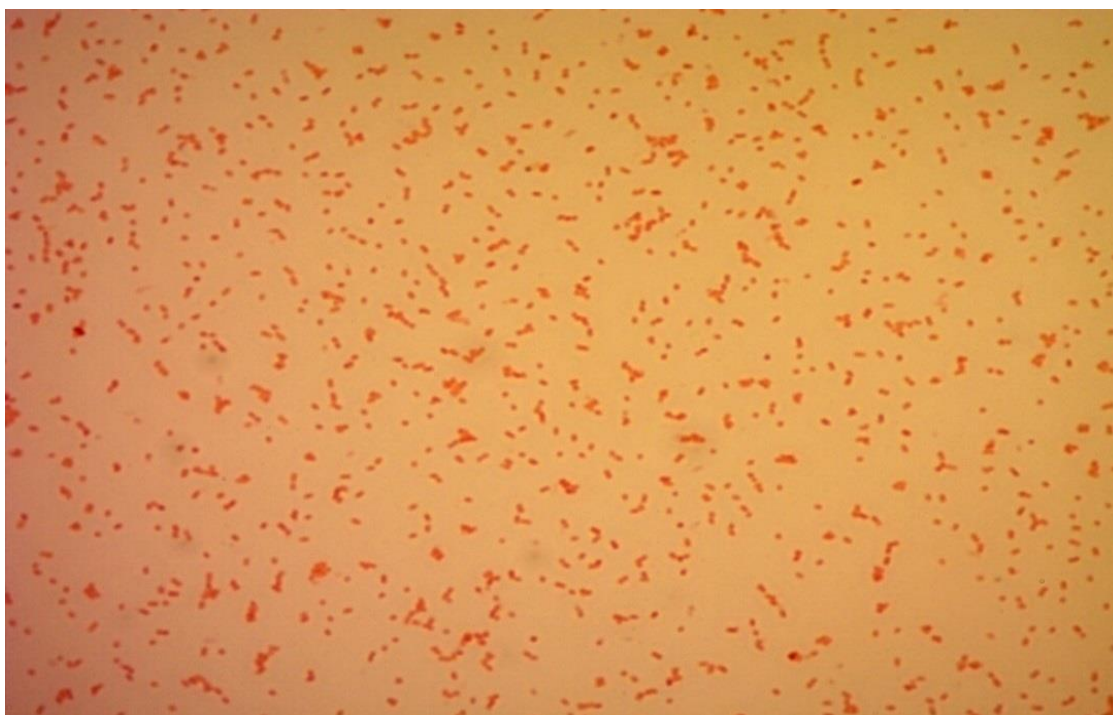


Figura 4: *Serratia marcescens* isolada de amostras de água do igarapé localizado no entorno da Base Petrolífera de Urucu, Coari -AM.

Bacillus toyonensis

Bacillus toyonensis é uma bactéria Gram positiva formadora de endósporos, não patogênica (Figura 5), proposta como uma nova espécie do grupo filogenético *Bacillus cereus* (JIMÉNEZ et al., 2013a). *B. toyonensis* foi isolada pela primeira vez no Japão , em 1966 , como *B. cereus* var. *toyoi* (BCT-7112 strain) e tem sido utilizada como probiótico na nutrição animal desde 1975, quando foi oficialmente aprovada pelo Ministério Japonês da Agricultura e Florestas como Toyocerin® (JIMÉNEZ et al., 2013a; JIMÉNEZ et al., 2013b).

Okaiyeto et al. (2015) registraram a ocorrência de *B. toyonensis* em amostras de sedimentos de ambiente marinho na África do Sul. Os autores reportam a capacidade de *B. toyonensis* em produzir biofloculantes. Adewale et al. (2015) descreveram *B. toyonensis*, como uma bactéria endofítica, isolada de uma planta medicinal denominada *Mentha spicata*.

Kreischer e Silva (2017) isolaram *B. toyonensis* de amostras de solo contaminadas com agrotóxicos. Os autores mencionaram essa espécie como sendo produtora de biossurfactante. A produção de biossurfactante por microrganismos é de suma importância no processo de biodegradação, pois ajuda na emulsificação, reduzindo a recalcitrância e facilitando a oxidação dos hidrocarbonetos.

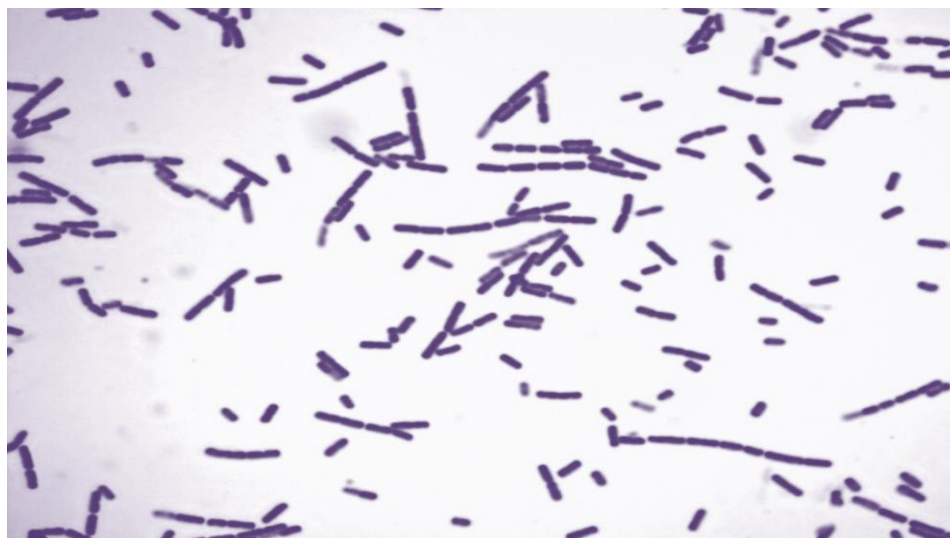


Figura 5: *Bacillus toyonensis* isolado de amostras de água do dique de efluente da Base Petrolífera de Urucu, Coari-AM.

Candida mesorugosa

A espécie *Candida mesorugosa* é caracterizada por suas colônias lisas, de cor creme, opacas e suaves. São formadoras de blastosporos e pseudo-hifas abundantes, e possuem capacidade de assimilar D-glucose, D-sorbitol, D-xilose e D-manitol (Figura 6) (CHAVES et al., 2013).

C. mesorugosa foi descrita recentemente por Chaves et al. (2013) como uma nova espécie similar a *C. rugosa*. Os autores isolaram a cepa de amostras de sangue humano num hospital terciário no Brasil. Adjapong et al. (2016) isolaram cepas de *C. mesorugosa* de amostras de urina em Gana na África. Essa espécie microbiana é membro do complexo de espécies da *C. rugosa*, juntamente com as espécies *C. rugosa*, *C. pseudorugosa*, e *C. neorugosa* (ADJAPONG et al. 2016).

Candida rugosa tem sido reportada como um patógeno fúngico humano e emergente, responsável por um número crescente de infecções causadas por *Candida* (ADJAPONG et al. 2016; CHAVES et al., 2013).

Muitas espécies de leveduras, dentre elas espécies do gênero *Candida*, com capacidade para degradar hidrocarbonetos tem sido isoladas de diferentes ambientes (HESHAM et al., 2009; ZINJARDE & PANT, 2002; PALITTAPONGARNPIM, et al., 1998). MacGillivray e Shia (1993) reportaram o potencial das espécies do gênero *Candida*, dentre outros gêneros leveduriformes, isoladas a partir de sedimentos costeiros, em degradar HPAs.

Gargouri et al. (2015) mencionam a capacidade de linhagens pertencentes aos gêneros *Cândida* e *Trichosporon* isoladas a partir de efluentes industriais de refinaria, capazes de degradar fenantreno, antraceno, fluoranteno.

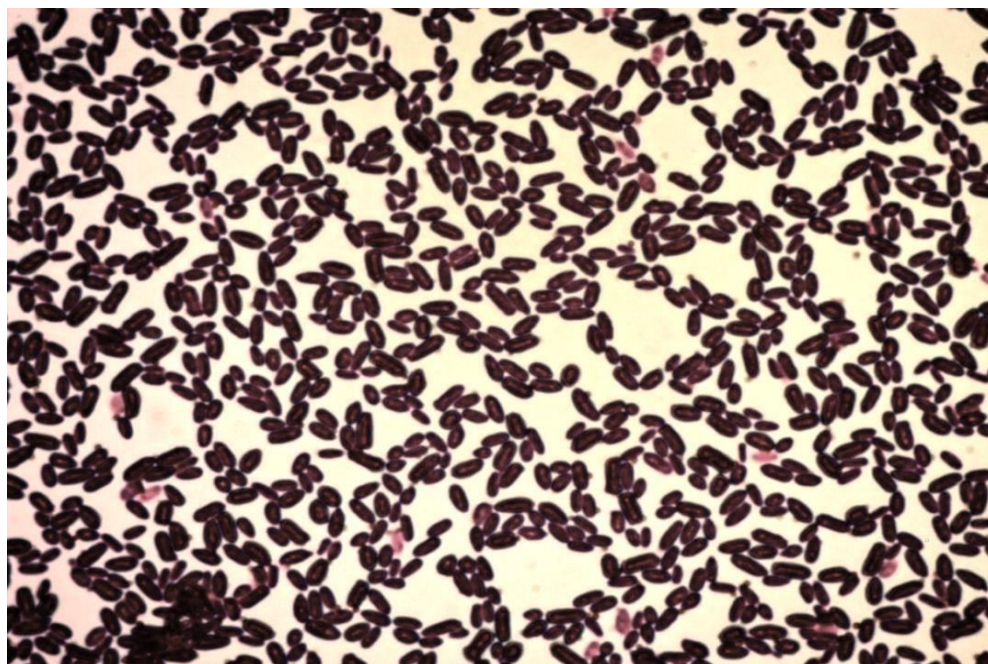


Figura 6: *Candida mesorugosa* isolada de amostras de água do dique de efluente da Base Petrolífera de Urucu, Coari, AM.

Mecanismo de biodegradação dos hidrocarbonetos

A degradação dos compostos do petróleo por populações microbianas nativas é um mecanismo primário de eliminação desses poluentes do ambiente (ATLAS, 1981). O mecanismo de biodegradação pode ocorrer por respiração aeróbia ou anaeróbia. Contudo em condições aeróbias, a biodegradação dos poluentes orgânicos é mais rápida e completa (DAS & CHANDRAN, 2011).

O princípio metabólico da biodegradação aeróbia é iniciado com a oxidação dos hidrocarbonetos promovida por reações enzimáticas de ativação e incorporação do oxigênio, catalisadas por enzimas oxidases e peroxidases. Quando ocorre a incorporação de uma molécula de oxigênio, a enzima monoxigenase ataca os substituintes metil do hidrocarboneto, resultando na degradação do tolueno e xileno. Se forem incorporadas duas moléculas de oxigênio, a enzima dioxigenase ataca os anéis aromáticos, resultando na

degradação do benzeno (DAS & CHANDRAN, 2010; FRITSCHÉ & HOFRICHTER, 2000; OLAJIRE & ESSIN, 2014).

As vias periféricas de degradação convertem os poluentes orgânicos, em intermediários do metabolismo central, como o ciclo do ácido tricarboxílico. A biossíntese da biomassa celular ocorre a partir de metabólitos precursores, como o acetil-coA, succinato e piruvato. Os açúcares necessários para a biossíntese e crescimento, são sintetizados pela glicogênese (Figura 7) (DAS & CHANDRAN, 2010; FRITSCHÉ & HOFRICHTER, 2000; OLAJIRE & ESSIN, 2014).

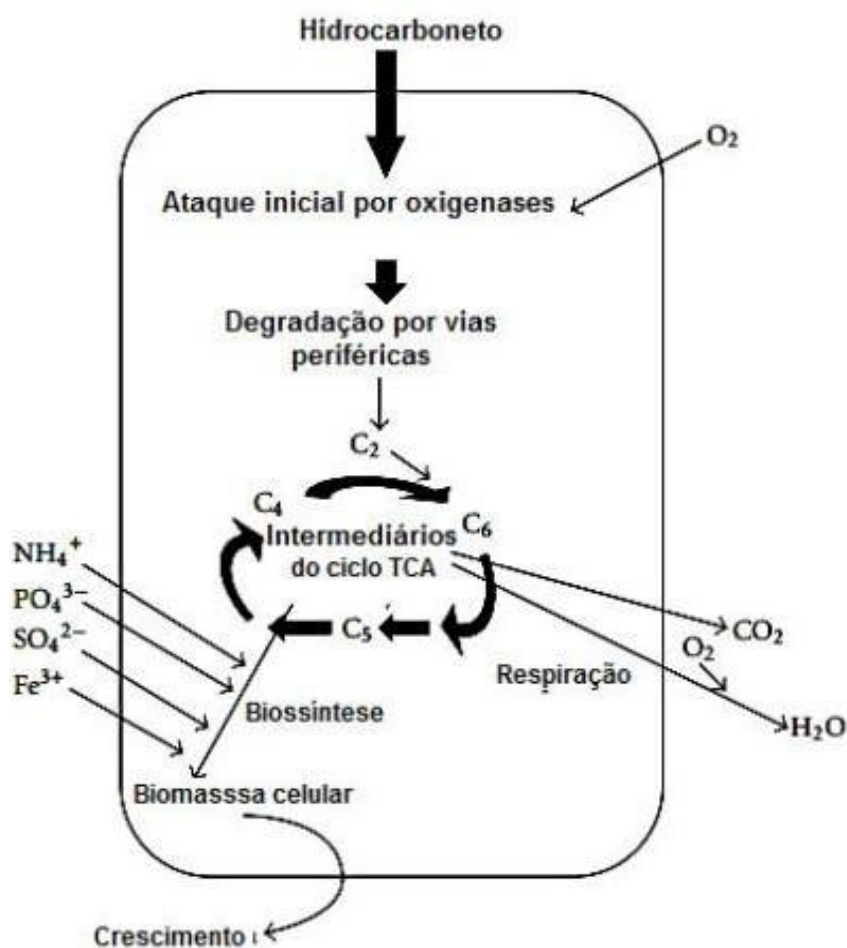


Figura 7: Princípio da degradação aeróbica dos hidrocarbonetos. Fonte: Das e Chandran (2011), com adaptações.

No mecanismo de oxidação anaeróbia de compostos orgânicos, o nitrato, o sulfato, o ferro (III) e o dióxido de carbono podem atuar como aceptores terminais de elétrons. Nesse processo, o CO₂ é reduzido a metano, o sulfato é reduzido a sulfeto e o nitrato a nitrogênio molecular ou íon amônio. Quando substratos fosforilados tem a função de aceptores finais de elétrons, a degradação ocorrerá por via fermentativa resultando em compostos como CO₂, acetato, etanol, propionato e butirato (ENGLERT et al., 1993).

Fatores que influenciam na biodegradação

A biodegradação do petróleo é um processo complexo, o qual depende de diferentes fatores como temperatura, oxigênio, pH, disponibilidade de nutrientes, e umidade, que podem influenciar direta ou indiretamente no metabolismo microbiano, e na eficiência da biodegradação (KENNISH, 1996, ATLAS, 1994, AZEVEDO, 2010).

Temperatura - a temperatura influencia na biodegradação devido ao seu efeito no metabolismo microbiano, composição da microbiota e nas características física e química do petróleo (SORKHOH et al., 1993; OKOH, 2006). Em geral a biodegradação dos hidrocarbonetos pode ocorrer em diferentes temperaturas, contudo, em temperaturas mais elevadas obtêm-se melhores taxas de biodegradação (ATLAS, 1991, OKOH, 2006). Assim, as taxas de degradação mais altas já registradas estão entre as faixas de 30 a 40 °C em ambientes terrestres, 20 a 30 °C em alguns ambientes de água doce, e 15 a 20 °C em ambientes marinhos (OKOH, 2006).

Oxigênio - o teor de oxigênio dissolvido favorece uma rápida oxidação dos hidrocarbonetos (ATLAS, 1984; BENTO, 2005).

pH - os microrganismos são capazes de crescer em diferentes faixas de pH, contudo as melhores taxas de degradação são conseguidas entre o pH 6 e 8, entretanto, o pH 7 é o mais recomendado (AZEVEDO, 2010; ROSATO, 1998).

Nutrientes – os nutrientes como o nitrogênio, fósforo e em alguns casos o ferro, são necessários aos microrganismos, e tão logo a biodegradação. Contudo em ambientes contaminados a disponibilidade desses nutrientes é um fator crítico, e conseqüentemente limitante ao crescimento microbiano (ATLAS 1984, OKOH, 2006). A limitação desses nutrientes tem sido registrada principalmente em ambientes marinhos, devido aos baixos níveis de nitrogênio e fósforo na água do mar (FLOODGATE 1984, OKOH, 2006).

Umidade - a umidade é um facilitador das reações, auxilia nas trocas gasosas e no transporte de nutrientes (AZEVEDO, 2010).

Outros fatores como biodisponibilidade e toxicidade dos poluentes, tipo de ambiente contaminado, histórico da contaminação, existência de organismos que possuam enzimas necessárias à degradação, contato óleo-água, podem influenciar no processo de biodegradação dos hidrocarbonetos (BENTO et al., 2005, PEIXOTO et al., 2008, AZEVEDO, 2010).

Seleção de microrganismos degradadores

O método de seleção de microrganismos degradadores utilizando o indicador redox 2,6 – diclorofenol indofenol leva em conta a reação de oxirredução promovida pelos microrganismos durante o processo de biodegradação dos hidrocarbonetos (HANSON et al., 1993; KUBOTA et al., 2008). Esse método é considerado eficaz, e tem sido amplamente citado na literatura (HANSON et al., 1993; BIDOIA et al., 2010; SOUZA, 2015; LIMA et al., 2016). Destacando-se as vantagens de ser um teste de execução rápida baixo custo, e baixa complexidade (HANSON et al., 1993; WONGSA et. al., 2004; BIDOIA et al., 2010; AFUWALE & MODI, 2012; NAKAMURA et. al., 2014).

O DCPIP é uma molécula indicadora que detecta a oxidação de NADH a NAD⁺ (BIDOIA et al., 2010). Na prática, o DCPIP atua como um aceptor de elétrons, recebendo-os do processo de oxidação, mediado pelos microrganismos ao utilizarem hidrocarbonetos como substratos (HANSON, et al, 1993; BIDOIA et

al., 2010). A reação de oxido-redução pode ser constatada pela redução na concentração do indicador DCPIP em seu estado oxidado (azul). A perda da cor é monitorada por leituras de absorbâncias ao comprimento de onda de 600 nm (BIDOIA et al., 2010). Hanson et al., (1993) ao utilizarem esse método para avaliar o potencial de biodegradação de bactérias isoladas de solo contaminado com hidrocarbonetos, consideraram apenas o tempo de descoloração do DCPIP, da cor azul (estado oxidado) para incolor (estado reduzido) (figura 8). Sendo portanto, o isolado bacteriano capaz de descolorir o DCPIP em menor tempo de incubação, classificado como um bom degradador.

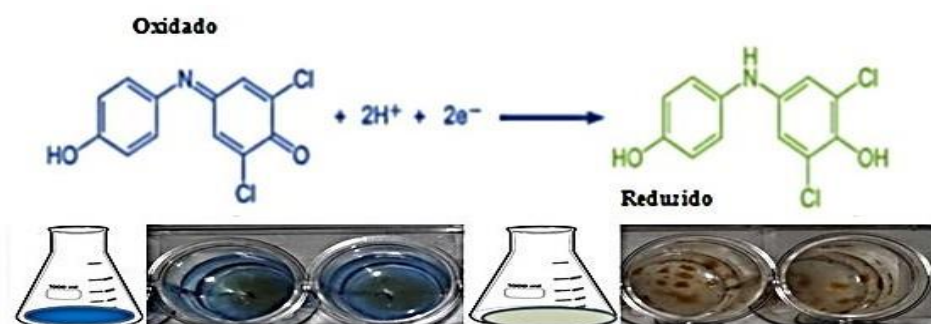


Figura 8: Estrutura química da reação de oxirredução do DCPIP. Fonte: Bidoia et. al. (2010), com modificações.

Caracterização genotípica e fenotípica de microrganismos

Existem diversas abordagens que possibilitam a identificação e caracterização de diferentes grupos microbianos. Dentre elas, destacamos as técnicas moleculares, em especial aquelas baseadas no sequenciamento do gene que codifica o RNA ribossomal da subunidade 16S (SSU rRNA), que tornou-se possível a realização de análises mais completas da diversidade bacteriana, possibilitando a classificar, identificar e definir espécies (OLSEN et al, 1986; PEIXOTO, 2009).

Os ribossomos bacterianos são constituídos por aproximadamente 65% de RNA ribossômico e aproximadamente 35% de proteínas. A subunidade maior dos ribossomos de procariontes contém duas moléculas de RNA, uma de 23S

(2.900 bases) e outra de 5S (120 bases), enquanto que a subunidade menor apresenta apenas o RNA 16S (1.540 bases) (Figura 9) (PEIXOTO, 2009). O gene que codifica o rRNA 16S, apresenta regiões conservadas entre grupos filogeneticamente relacionados, flanqueadas por regiões hipervariáveis, que tornam esse gene ideal para classificação taxonômica e inferências filogenéticas (WARD et al, 1998; MES, 2008). A classificação taxonômica pode ser obtida, alinhando-se e comparando as sequências sob análise, em relação às sequências depositadas em bancos de dados genéticos como programa *_BLAST_* (*Basic Local Alignment Search Tool*) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (LARSEN et al., 1993).

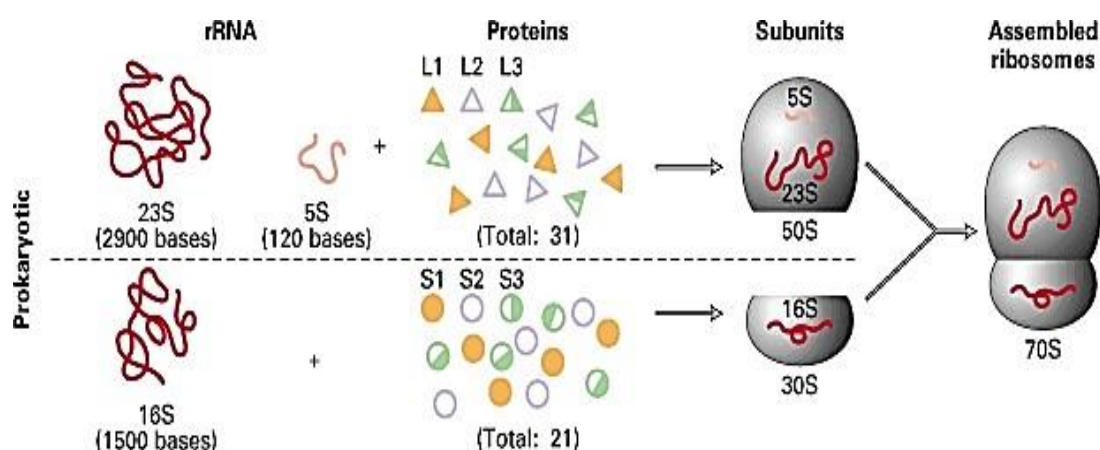


Figura 9: RNA ribossômico, ribonucleoproteínas e ribossomos de procarionte. Fonte: Griffiths et. al. (2001), com modificações.

A análise taxonômica baseada na amplificação e sequenciamento de regiões polimórficas ITS (*Internal Transcribed Spacers*) localizadas entre os genes 28S rRNA e 18S rRNA, tem sido frequentemente utilizadas na identificação, caracterização e classificação de grupos microbianos eucariontes (SOUZA, 2015; CHAVES et al., 2013; MOTA & NOBREGA, 2013; FELL, 1993; WHITE et al. 1990). Os espaçadores internos ITS1 e ITS2, estão localizados entre as sequências dos genes que codificam a subunidade maior dos ribossomos, 28S (4.800 bases) e 5.8S (160 bases), e a subunidade menor dos ribossomos 18S (1.900 bases), respectivamente (Figuras 10 e 11) (PEIXOTO, 2009).

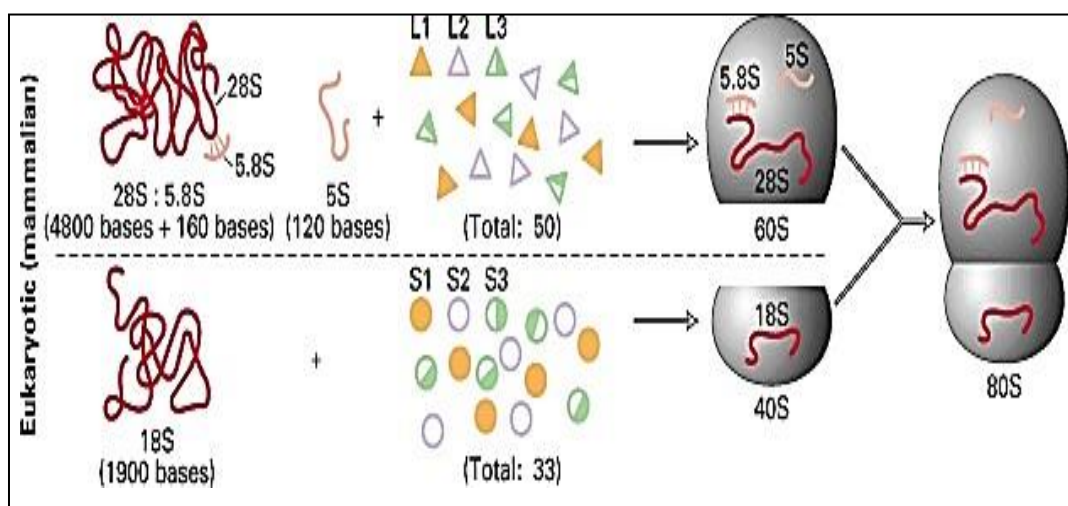


Figura 10: RNA ribossômico, ribonucleoproteínas e ribossomos de eucariontes. Fonte: Griffiths et. al. (2001) com modificações.

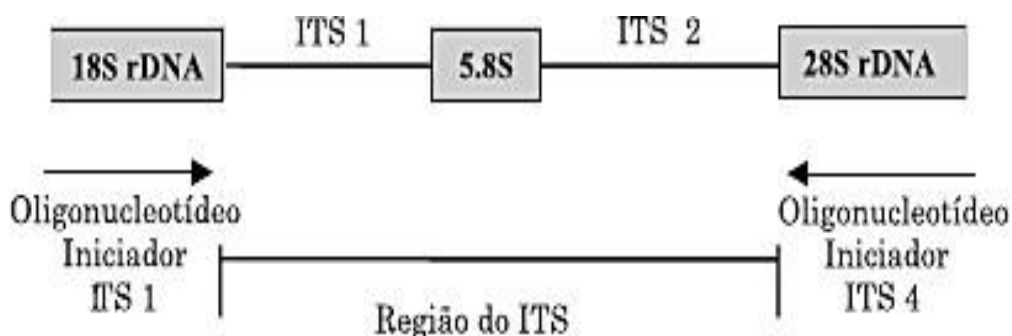


Figura 11: Região do rRNA com o espaço interno transcrito ITS1 e ITS2. Lupatini et. al., (2008) com modificações.

A técnica de RFLP-PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism /Polymerase Chain Reaction*) consiste na digestão do fragmento amplificado com enzimas de restrição (endonucleases de restrição), as quais clivam o DNA em sítios específicos (4-6 pb). Após eletroforese, o perfil polimórfico pode ser visualizado diretamente sob luz ultravioleta por meio da análise de padrões provindos da clivagem do DNA (ANCHORENA-MATIENZO, 2002, REIS JUNIOR et al., 2002). O método molecular RFLP-PCR permite diferenciar espécies microbianas por meio do padrão de fragmentos gerados após a digestão com as enzimas de restrição. Mota e Nobrega (2013) utilizaram esse método para identificar diferentes espécies de fungos de importância médica.

Os métodos fenotípicos de identificação de microrganismos têm como premissa básica diferenciar grupos microbianos, em nível de gênero e espécie, a partir da análise de características morfológicas, fisiológicas, propriedades bioquímicas e antigênicas (PEIXOTO, 2001). Assim, a caracterização fenotípica das bactérias se dá inicialmente, por observações morfológicas das colônias (forma, tamanho, elevação, bordas, superfície, estrutura, caracteres ópticos, pigmentação), acompanhada da coloração Gram. Em seguida são realizados testes bioquímicos, também denominados de biotipagem, que tem por finalidade analisar a atividade de um conjunto de enzimas metabólicas, dentre as quais definem a capacidade do microrganismo de fermentar diferentes fontes de carbono, com produção de gás (hidrogênio e dióxido de carbono) (PEIXOTO, 2001).

Existe uma infinidade de provas bioquímicas que em conjunto permitem classificar grupos bacterianos em nível de gênero e espécie. Contudo, a identificação por meio dessas provas, requer tempo e observação de um conjunto de padrões, apresentados pelos microrganismos. Desse modo, os testes bioquímicos mais utilizados na identificação de diferentes grupos bacterianos são: testes da catalase, indol, citrato de Simons, Hidrolise do amido, coagulase, urease, produção de gás sulfídrico, motilidade, Voges-Proskauer, TSI ou tríplice açúcar e ferro, protease dentre outros. Quanto ao fenótipo de sensibilidade e resistência a antimicrobianos, este pode ser observado por meio de testes de sensibilidade *in vitro* (antibiograma) (PEIXOTO, 2001). Neste ensaio, é possível medir a sensibilidade ou resistência de uma cepa bacteriana frente a um painel de agentes antimicrobianos, naturais ou sintéticos. Os métodos existentes para realização do antibiograma são denominados de método quantitativo (diluição), e método semi-quantitativo (difusão) conhecido também como o método de Kirby e Bauer.

A resistência aos antimicrobianos é considerada um fenômeno genético, em virtude da existência de genes que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas (TAVARES, 2000). Este fenômeno tem sido observado em diferentes grupos microbianos dos quais possuem a

capacidade de degradar petróleo, dentre eles os gêneros *Serratia* e *Pseudomonas*.

A caracterização taxonômica dos microrganismos requer características fenotípicas e genotípicas, tais informações permitem evidenciar relações evolutivas entre grupos microbianos, classificar, identificar e definir espécies microbianas (Woese, 1987). De acordo com Wetler-Tonini et al., (2011), a combinação de tais metodologias, podem proporcionar uma caracterização mais ampla das comunidades microbianas, evidenciam efeitos causados por fatores ambientais na composição dessas comunidades, e demonstram o comportamento desses microrganismos frente a biorremediação.

Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS)

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) tem sido muito utilizada em diversos estudos de biodegradação de hidrocarbonetos, com a finalidade de monitorar, identificar e quantificar a degradação desses compostos orgânicos por diferentes microrganismos.

Miranda et al. (2007) avaliaram a biodegradação do óleo diesel por leveduras, e detectaram por CG/MS que a espécie *C. ernobii* (UFPEDA 862) foi capaz de degradar tetradecano, 5 metil-octano e octadecano completamente, decano (60.8%) e nonano (21.4%). Já a espécie leveduriforme *Rhodotorula aurantiaca* (UFPEDA 845) apresentou percentuais de degradação de 93% para decano, 38,4% para nonane e 22,9% para dodecano.

Li et al. (2009) constataram por CG/ms que o consórcio microbiano constituído pelas espécies *Phanerochaete chrysosporium*, *Cunninghamella* sp., *Alternaria alternate*, *Penicillium chrysogenum*, e *Aspergillus niger*; e três bactérias: *Bacillus* sp., *Zoogloea* sp., e *Flavobacterium* sp., foi capaz de degradar 41,3% de HPA.

A cromatografia gasosa consiste numa técnica analítica, utilizada para separação e quantificação de diferentes compostos. Quando acoplada ao espectrômetro de massas, torna-se possível identificar esses compostos, por meio dos fragmentos iônicos produzidos pelo bombardeio das moléculas na fase vapor com um feixe de elétrons. Este modo de ionização é denominado impacto eletrônico (EI), cuja energia de bombardeamento pode variar de 12 a 100 eV. Após a ionização da amostra, as moléculas ou os seus fragmentos ionizados entram no setor de análise do espectrômetro de massas, onde serão separados de acordo com a razão massa/carga (m/z). A velocidade de varredura é grande o suficiente para permitir a obtenção de diversos espectros de massas por pico; eluído no cromatógrafo (COLLINS, 2006, BRAITHWAITE, 1999; SILVERSTEIN, 1994).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADEWALE, A. M., GOH J. K., LIM S. P., & TING A. S. Y. Antimicrobial and enzymatic activities of endophytic bacteria isolated from *Mentha spicata* (MINT). *Malaysian Journal of Microbiology*, 11(2):102-108. 2015.
- [2] ADJAPONG, G., BARTLETT, M., HALE, M., & GARRILL, A. The isolation of *Candida rugosa* and *Candida mesorugosa* from clinical samples in Ghana. *Medical Mycology*, Vol. 54, No. 3, 2016.
- [3] ALEXANDER, M. Biodegradation and Bioremediation. *Academic Press*: San Diego, 1994.
- [4] ALMEIDA, F. V., CENTENO, A. J., BISINOTI, M. C., & JARDIM, W. F. Substâncias tóxicas persistentes (STP) no Brasil. *Química Nova*, v. 30, n. 8, p. 1976-1985, 2007.
- [5] AFUWALE, C., & MODI H.A. Study of bacterial diversity of crude oil degrading bacteria isolated from crude oil. *Life Sciences Leaflets*, 6:13-23. 2012.
- [6] ANCHORENA-MATIENZO, P. *Re-identificação e Caracterização genética da levedura IZ-987 utilizando marcadores moleculares*. 65 f. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- [7] ANDRADE, Daniela M.. *Avaliação de bactérias provenientes de um biofiltro de tratamento de vapores de gasolina*. 96p. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) -Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis - SC. 2008.
- [8] ASHELFORD, K. E., FRY, J. C., B., M. J., & DAY, M. J. Characterization of *Serratia* isolates from soil, ecological implications and transfer of *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora* Grimont *et al.* 1983 to *Serratia quinivorans* corrig., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 2281-2289. 2002.
- [9] ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. *Publicação dos dados de Reserva de Petróleo e Gás Natural do Brasil em 31/12/2014*. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/>> Acessado em outubro de 2015.

- [10] ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (Brasil). *Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis (ANP)*. Rio de Janeiro. 2012.
- [11] ARAÚJO, S. P. *Produção de inóculo microbiano, obtido de macrófitas aquáticas na Amazônia, com potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo*. 158p. 2014. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas. Manaus. 2014.
- [12] ARAÚJO, H. W. C. *Caracterização Morfológica e Molecular de uma Nova Linhagem de Serratia marcescens e Potencial Biotecnológico na Produção de Biossurfactantes Prodigiosina e na Utilização de Dibenzotiofeno (DBT)*. 150p. 2010. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – RENORBIO. Recife, Brasil. 2010.
- [13] ARRUDA, Anna C. S. *Ampliação e aplicação do método semi-empírico topológico (IET) em modelos QSRR/QSPR/QSAR para compostos alifáticos halogenados e cicloalcanos*. 185p. 2008. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2008.
- [14] ATLAS, R.M., & BARTHA, R. Degradation and mineralization of petroleum in sea water: limitation by nitrogen and phosphorus. *Biotechnol. Bioeng*, 14(3): 309-318. 1972.
- [15] ATLAS, R.M. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective. *Microbiological Review*, 45: 180-209, 1981.
- [16] ATLAS, R.M. Pathways of microbial degradation of petroleum hydrocarbon: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45:180-209. 1984.
- [17] ATLAS, R. M. Microbial hydrocarbons degradation-bioremediation of soils spills. *Journal Chemical Technology and Biotechnology*. V.52, p. 149-156. 1994.
- [18] ATLAS, R. M. Biorremediation of Petroleum Pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, pp. 317-327. 1995.
- [19] AZEVEDO, Liana M. L. *Potencial de degradação do petróleo por fungos isolados de sedimentos de manguezal impactado*. 69p. 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2010.

[20] BARROSO, Hileia dos S. *Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em organismos marinhos da Baía do Almirantado, Península Antártica*. 160p. 2010. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo. São Paulo – SP, 2010.

[21] BATISTA, I. H. *Biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por resíduos de petróleo: Um estudo com bactérias isoladas de Eichornia Crassipes na Amazônia*. 184p. 2009. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, 2009.

[22] BENTO, F. M., CAMARGO, F. A. O., OKEKE, B., & FRANKENBERGER JUNIOR, W. T.. *Bioremediation of soil contaminated by diesel oil*. Brazilian Journal of Microbiology, v. 34:65-68, 2003.

[23] BENTO, Douglas M.. *Análise Química da Degradação dos Hidrocarbonetos de Óleo Diesel no Estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS*. 112p. 2005. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica) - Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande – RS. 2005.

[24] BENTO, F.M., CAMARGO, F.A.O., OKEKE, B.C., & FRANKENBERG, W.T. Comparative biorremediation of soils contaminated with Diesel oil by natural attenuation, bioestimulation and bioaugmentation. *Bioresource technology*. 96:1049-1055. 2005.

[25] BIDOIA, E.D., MONTAGNOLLI, R.N., & LOPES, P.R.M. Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. *Appl Microbiol Biotechnol*. 3(290-295):1277-88. 2010.

[26] BRITO L. *Degradação de petróleo por isolados de rizóbios da Amazônia*. 98p. 2013. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2013.

[27] BRITO, G. C. B., SOUZA, D. B., VASCONCELOS, F.C. W., & BRAGA, L. C. A importância da bioprospecção de microrganismos em áreas contaminadas com produtos derivados do petróleo. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, v.3, n.3, p. 291-310, ISSN 1981-9951. set./dez. 2010.

[28] BRITO, E. M. S.; VIEIRA, E. D. R.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. Persistent organic pollutants in two reservoirs along the Paraíba do Sul-Guandú River system, Rio de Janeiro, Brazil. *Química Nova*, v. 28, n. 6, p. 941-946, 2005.

[29] BRAITHWAITE A., & SMITH F. J., *Chromatographic Methods*. 5ª ed, Dordrecht: Ed. Kluwer Academic, 1999.

[30] BOULOUBASSI, I.; SALIOT, A.. Investigation of anthropogenic and natural organic inputs in estuarine sediments using hydrocarbon markers (NAH, LAB, PAH). *Oceanol. Acta*, v. 16, p. 145-161, 1993.

[31] BOUROTTE, C.; FORTI, M. C.; LUCAS, Y.; MELFI, A. J. Comparison of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (HPAs) concentrations in urban and natural forests soils in the Atlantic Forest (São Paulo State). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 81, n. 1, p. 127-136, 2009.

[32] CALIXTO, Eduardo. *Contribuições para plano de contingência para derramamento de petróleo e derivados no Brasil*. 301p. 2011. Tese (Doutorado em Planejamento Energético) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2011.

[33] CARUSO, M. S. F., & ALABURDA, J.. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 67(1):1-27. 2008.

[34] CELINO, J. J.; QUEIROZ, A. F. de S. Fonte e grau da contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de baixa massa molecular em sedimentos da Baía de Todos os Santos, Bahia. *Revista Escola de Minas*, v. 59, n. 3, p. 265-270, 2006.

[35] COLLINS C. H.; BRAGA G. L.; BONATO P. S., *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas: Editora Unicamp, 452p. 2006.

[36] CHAVES, G.M., TERÇARIOLI G.R., PADOVAN, A.C.B., ROSAS R.C, FERREIRA, R.C., MELO, A.S.A. & COLOMBO, A. L. *Candida mesorugosa* sp. nov., a novel yeast species similar to *Candida rugosa*, isolated from a tertiary hospital in Brazil. *Med Mycol* 51 (3): 231-242. 2013.

[37] CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G. S.; PEREIRA, D. C. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. *Ciência hoje*, v. 30, nº 179, 2002.

[38] DAS, N., & CHANDRAN, P.. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*. 13 pg. 2011.

[39]DE LA FUENTE, G., PERESTELO, F., RODRIGUEZ, P. A., & FALCON, M. A. Oxidation of aromatic aldehydes by *Serratia marcescens*. *Applied Environment Microbiology*, 57:1275-1276.1991.

[40]ENGLERT, C. J.; KENZIE, E. J.; DRAGUN, J. Bioremediation of petroleum products in soil .Principles and Practices for Petroleum Contaminated Soils. In: Calabrese, E. J.; Kostekl, P. T. (Eds.). *Boca Raton: Lewis Publishers*, 1993. p. 111-130.

[41]FELTRE, Ricardo. 2004; *Química*. Vol. 3. 6⁰ ed. São Paulo: Moderna, 2004.428pg.

[42]FELL, J. W. Rapid identification of yeast species using three primers in polymerase chain reaction.*Mol. Mar. Biology and Biotech.*, 2(3), 174-180.1993.

[43]FLOODGATE, G. The fate of petroleum in marine ecosystems, In: *Petroleum Microbiology*, R. M. Atlas, Ed., pp. 355-398, Macmillan, New York, NY, USA, 1984.

[44]FRITSCH, W; HOFRICHTER, M. Aerobic degradation by microorganisms, in *Environmental Processes- Soil Decontamination*, J. Klein, Ed., pp. 146-155, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2000.

[45]GAYLARDE, C. C., BLLINASSO, M.L., & MANFIO, G.B. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. *Biotechnology Ciência e desenvolvimento*. v.34, p. 36-46, 2005.

[46]GARGOURI, M., PARK, Jeong-Jin, HOLGUIN , F. O., KIM, Min-Jeong, WANG, H., & DESHPANDE, R.R., SHACHAR-HILL, Y., HICKS, L.M., & GANG, D.R. Identification of regulatory network hubs that control lipid metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Experimental Botany*. 2-16p.2015.

[47]GARCIA, E. A. *Petrobras na Amazônia. A história da pesquisa de combustíveis fósseis*. Manaus, AM: Norma Ed., 129 p.2008.

[48]GRIFFITHS, ANTHONY J. F., GELBART, WILLIM M., MILLER, JEFFREY H., LEWONTIN, RICHARD C. *Genética Moderna*. 1^o edição. Editora: Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2001.

[49] GRIMONT, F. & Grimont, P. A. D. The genus *Serratia*. In *The Prokaryotes*, pp. 2822-2848. Edited by A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder & K.-H. Schleifer. New York: Springer. 1992.

[50] GOOGLE MAPS. Base petrolífera de Urucu. 2017. Disponível em: <https://www.google.com.br/maps/place/4%C2%B051'50.2%22S+65%C2%B018'00.1%22W/@-4.8639393,-5.3022167,725m/data=!3m1!1e3!4m9!1m2!10m1!1e2!3m5!1s0x9222688836dbab21:0x0!7e2!8m2!3d-4.8639446!4d-65.300028>> Acessado em 30.07/2017.

[51] HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, v.169, p. 1-15, 2009.

[52] HANSON, K. G., DESAI, J. D., DESAI, A.J. A Rapid and Simple Screening Crude Oil Degrading Technique for Potential Microorganisms. *Biotechnol Tech.* 7(1):745-8. 1993.

[53] HESHAM, A.E.L., WANG, Z., ZHANG, Y., ZHANG, J., WENZHOU, L.V., YANG, M. Isolation and identification of a yeast strain capable of degrading four and five ring aromatic hydrocarbons. *Ann Microbiol.* 56(2):109-12. 2006

[54] HESHAM, A. El-Latif, ALAMRI, S.A., KHAN, S., MAHMOUD, M.E., & MAHMOUD, H.M. Isolation and molecular genetic characterization of a yeast strain able to degrade petroleum polycyclic aromatic hydrocarbons. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 8 (10), pp. 2218-2223, 18 May, 2009.

[55] HEJAZI, A., & FALKINER, F. R. *Serratia marcescens*. *Journal Medical Microbiology*, 46:903-912. 1997.

[56] HOPPER, D. J. Aspects of the Degradation of Aromatics by Microorganisms. In: *Biodegradation: Natural and Synthetic Materials*. BETTS, W.B. (ed). *Spring Verlag Limited*. London. p. 69 – 89, 1991.

[57] IEA - International Energy Agency - Key World Energy Statistics, 2017 Edition. 97p. 2017.

[58] IGUCHI, A., NAGAYA, Y., PRADEL, E., OOKA, T., OGURA, Y. KATSURA, K., & HAYASHI, T. Genome evolution and plasticity of *Serratia marcescens*, an important multidrug-resistant nosocomial pathogen. *Genome biology and evolution*, 6(8) 2096-2110. 2014.

[59] IJAH, U. J. J. Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. *Waste Management*, 18: 293-299. 1998.

[60] INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Polynuclear Aromatic Compounds, Part1, Chemical, Environmental and Experimental Data, volume 32. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 477 p.1983.

[61] JACQUES, R. J. S., BENTO, F. M., ANTONIOLLI, Z. I., CAMARGO, F. A. O.. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Cienc. Rural*. Santa Maria, v. 37, n. 4, P. 1192-1021. Aug. 2007.

[62] JAQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O. Biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Ciência e Natura*, v. 29, n. 1, p. 7-24, 2007.

[63] JAHANGEER, Vikram Kumar. An Overview on Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants. *International Journal of Engineering and Technical Research (IJETR)*, 1(8), 34-37. 2013.

[64] JAYSREE, R. C., RAJAM, C., & RAJENDRAN, N. Isolation and identification of petroleum utilizing microorganisms from different environmental sources. *International Journal of ChemTech Research*, 8(7) 260-270.2015.

[65] JIMÉNEZ, G., URDIAIN, M., CIFUENTES, A., LÓPEZ-LÓPEZ, A., BLANCH, A. R., TAMAMES, J., ... Rosselló-Mora, R. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(6):383-91. 2013a.

[66] JIMÉNEZ, G., BLANCH, A. R., TAMAMES, J., & ROSSELLÓ-MORA, R. Complete Genome Sequence of *Bacillus toyonensis* BCT-7112 T , the Active Ingredient of the Feed Additive Preparation Toyocerin. *Genome Announcements*, 1(6):1-2. 2013b.

[67] KATAOKA, A. P. A. G. Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de "landfarming". 202p. 2001. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2001.

[68]KALIVODA, E. J., STELLA, N.A., ASTON, M.A., FENDER, J.E., THOMPSON, P.P., KOWALSKI, R.P., & SHANKS, R.M. Cyclic AMP negatively regulates prodigiosin production by *Serratia marcescens*. *Research in Microbiology*, 161(2) 158-167.2010.

[69]KENNISH, M.J. Practical handbook of estuarine and marine pollution. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL. P. 524. 1996.

[70]KREISCHER, A. C., & SILVA, L. P. Bioprospecção de bactérias produtoras de biossurfactantes a partir de solo contaminado por agrotóxicos. *Revista Eletrônica Estácio Saúde*, 6 (1):35-46. 2017.

[71]KUBOTA, K., KOMA, D., MATSUMIYA, Y., CHUNG, S. Y., & KUBO, M. (2008). Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbon-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-degradation by the 2,6-DCPIP assay. *Biodegradation*, 19(5):749-57.

[72]LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*. v. 54, p. 305-315, 1990.

[73]LARSEN, N.; OLSEN, G. J.; MAIDAK, B. L.; MCCAUGHEY, M. J.; OVERBEEK, R.; MACKE, T.J.; MARSH, T. L.; WOESE, C. R. The ribosomal database project. *Nucleic Acids Res*. 21: 3021-3023. 1993.

[74]LIANG Y.T., Zhang X., WANG J.; LI G.H. Spatial variations of hydrocarbon contamination and soil properties in oil exploring fields across China. *J Hazard Mater*. 241, 371-378. 2012.

[75]LI, X. J.; LIN, X.; LI, P. J; LIU, W.; WANG, L.; CHUKWUKA, K. S. Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. *Journal Hazard Mater*. v.172, p.601-605, 2009.

[76] LIMA, J.M.S., PEREIRA, J.O., BATISTA, I.H., NETO, P.Q.C., SANTOS, J.C., ARAÚJO, S.P., PANTOJA, M.C.P., MOTA, A.J. & AZEVEDO, J.L. Potential biosurfactant producing endophytic and epiphytic fungi, isolated from macrophytes in the Negro River in Manaus, Amazonas, Brazil. *African J Biotechnol*. 2016;15(24):1217-23.

[77]LIMA, J.M.S. *avaliação do potencial de produção de biossurfactantes por micro-organismos endofíticos e epifíticos de macrófitas aquáticas coletadas em afluentes do Rio Negro contaminados por petróleo*. 119p. 2016. Tese (Doutorado

em Biodiversidade e Biotecnologia) – Rede Bionorte, Universidade Federal do Amazonas / Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2016.

[78] LUPATINI, M., MELLO, A.H., & ANTONIOLLI, Z.I. Caracterização do DNA ribossômico do isolado de scleroderma ufsmsc1 de *Eucalyptus grandis* W. Hill Ex-Maiden. R. Bras. Ci. Solo. 32:2677-2682, 2008.

[79] MACGILLIVRAY A. R, & SHIARIS M.P. Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments. *Appl Environ Microbiol.* 59(5):1613-8. 1993.

[80] MACNAUGHTON, S. J., STEPHEN, J.R., VENOSA, A. D., DAVIS, G. A., CHANG, Yun-Juan, WHITE, D.C. Microbial Population Changes during Bioremediation of an Experimental Oil Spill. *Applied and Environmental Microbiology.* V.65, No8, p. 3566-3574. Aug. 1999.

[81] MANDRI, T. & LIN, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology*, 6 (1): 023-027. 2007.

[82] MEIRE, R. O.; AZEVEDO, A.; TORRE, J. P. M. Aspectos Ecotoxicológicos de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. *Oecologia brasiliense*, v. 11, n. 2, p. 188-201, 2007.

[83] MES, T. H. M. Microbial diversity – insights from population genetics. *Environmental Microbiology.* 10 (1): 251-264. 2008.

[84] MIRANDA, R.C., SOUZA, C.S., GOMES, E.B., LOVAGLIO, R.B., LOPES, C.E., & SOUSA, M. F. V.Q. Biodegradation of Diesel Oil by Yeasts Isolated from the Vicinity of Suape Port in the State of Pernambuco -Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol.50, n. 1 : pp.147-152, January 2007.

[85] MORRISON, R., BOYD, R. *Química Orgânica*. 6ª ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1972.

[86] MORAIS, J. M.. Petróleo Em Águas Profundas: Uma história tecnológica da PETROBRAS na exploração e produção offshore. *Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Brasília, IPEA: PETROBRAS*. 424 p. 2013.

- [87] MOROHOSHI, T., SHIONO, T., TAKIDOUCHI, K., KATO, M., KATO, N., KATO, & J., IKEDA, T. Inhibition of Quorum Sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by Synthetic Analogs of N-Acylhomoserine Lactone. *Applied Environment Microbiology*, 6339-6344. 2007.
- [88] MONTANER, B., NAVARRO, S., PIQUEÉ, M., VILASECA, M., MARTINELL, M., GIRALT, ..., & PERÉZ-TOMÁS, R. Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *British Journal Pharmacology*, 131: 585-593.2000.
- [89]MOTA, A.J., NOBREGA, F.G. Unequivocal Identification of Fungi , Especially *Candida* and Related Species of Medical Interest. *Journal of Medical Diagnostic Methods*, v. 02, p. 1000142. 2013.
- [90] NAKAMURA, F. M., GERMANO, M.G., & TSAI, S. M. Capacity of Aromatic Compound Degradation by Bacteria from Amazon Dark Earth. *Diversity*, 6, 339-353. 2014.
- [91]NETTO, A. D. P., MOREIRA, J. C., DIAS, A. E.X.O.; ARBILLA, G., FERREIRA, L. F.V., OLIVEIRA, A. S., & BAREK, J. Avaliação da Contaminação Humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (Hpas) e seus derivados Nitrados (NHPAs): *Uma Revisão Metodológica*. Química Nova, 23(6). 2000.
- [92]NEFF, J.M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: Sources, fate and biological effects. *Applied Science Publishers, Ltd.*, Essex, England. 1979.
- [93]OLAJIRE A. A., & ESSIEN J.P. Aerobic Degradation of Petroleum Components by Microbial Consortia. *Petroleum & Environmental Biotechnology*. 2014.
- [94] OLIVEIRA, TEREZA C. S. *Caracterização de marcadores moleculares e uso de diferentes proxis para estudo do registro de combustão em sedimento na Amazônia Central (Coari-Manaus)*. 193p. 2007.Tese (Doutorado em Química Analítica), Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
- [95] OLSEN, G.J., LANE, D.J., GIOVANNONI, S.J., PACE, N.R., & STAHL, D.A. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 337-365. 1986.

- [96] OKOH, Anthony I. Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. Vol. 1 (2), pp. 38-50, June 2006.
- [97] OKAIYETO, K., NWODO, U. U., MABINYA, L. V., & OKOH, A. I. *Bacillus toyonensis strain AEMREG6*, a bacterium isolated from South African marine environment sediment samples produces a glycoprotein bioflocculant. *Molecules*, 20(3):5239-59. 2015.
- [98] PALITTAPONGARNPIM, M., & POKETHITIYOOK, P., UPATHAM, E.S. Biodegradation of crude oil by soil microorganisms in the tropic. *Biodegradation*. (167272):83-90.1998.
- [99] PANKAJ, K. J., & BAJPAI, V. Biotechnology of bioremediation-a review. *International Journal of Environmental Sciences*. V.3, no.1, 2012.
- [100] PAULINO, Ana A. D. *Degradação térmica e catalítica da borra oleosa de petróleo com materiais nanoestruturados Al-MCM-41 e Al – SBA-15*. 126p.2011.Tese (Doutorado. em Ciência e Engenharia de Petróleo) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal/RN. 2011.
- [101] PAVLIDOU, A., HATZIANESTIS, I., SKLIVAGOU, E., & PAPADOPOULOS, V., ZERVAKIS, V. Hydrology and pollution assessment in a coastal estuarine system: the case of the Strymonikos Gulf (North Aegean Sea). *Mediterranean Marine Science*, v. 3, n. 1, p. 65- 78, 2002.
- [102] PASSARINI, M. R. Z, SETTE, L. D., & RODRIGUES M. V. N. Improved Extraction Method to Evaluate the Degradation of Selected PAHs by Marine Fungi Grown in Fermentative Medium. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 22, No. 3, 564-570, 2011.
- [103] PÉREZ-TOMÁS, R., MONTANER, B., LLAGOSTERA, E., & SOTO-CERRATO, V. The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties. *Biochemical Pharmacology*, 66: 1447-1452. 2003.
- [104] PEIXOTO, R.S., ROSADO, A. S., & TAKETANI, R.G. Bioprospecção da diversidade microbiana cultivável e não cultivável. In MELO, Itamar S. & AZEVEDO, João L. *Microbiologia Ambiental*. 2ª Ed. Embrapa Meio Ambiente, 2008.

[105] PEIXOTO, J.C.C. *Análise da diversidade bacteriana dos Rios Negro e Solimões pela abordagem metagenômica*. 133p. 2009. Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Universidade Federal do Amazonas. Manaus-AM. 2009.

[106] PEIXOTO, J.C.C. Diferenças Genéticas entre Linhagens de *Escherichia coli* do sorogrupo O26 isoladas no Brasil e em outros países. 2001. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo. São Paulo. 2001.

[107] PETERS, K.E.; MOLDOWAN, J.M.; *The Biomarker Guide*, 1th ed., Prentice-Hall: New Jersey, 363 p. 1993.

[108] PEREIRA, D. S., GOMES, R. C., & SEMÊDO, L. T.A.S. Potencial das Actinobactérias na Biodegradação de Hidrocarbonetos. *Revista Eletrônica TECCEN*, Vassouras, v. 5, n. 2 p. 71-96, mai./ago., 2012.

[109] PETROBRAS. *Características do petróleo de Urucu*. CNPES: SEPESQ: DIQUIM: SETAV. 1997.

[110] PETROBRAS. *Amazônia: O caminho da energia no coração da floresta*. Cadernos Petrobras, Ipsis, Rio de Janeiro, 66 p. 2005.

[111] PETROBRAS. *A saga do petróleo na Amazônia*. O desafio de produzir ouro negro na Amazônia. Manaus. Luz Comunicação, Rio de Janeiro, 36 p. 2008.

[112] PETROBRÁS. Bacia do Solimões. www.petrobras.com.br. 2017. Disponível em: <http://www.petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/principais-peracoes/bacias/bacia-do-solimoes.htm> Acesso em 31/07/2017.

[113] PLAZA, G. A, WYPYCH J, BERRY C, & BRIGMON R.L. Utilization of monocyclic aromatic hydrocarbons individually and in mixture by bacteria isolated from petroleum-contaminated soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23:533-542. 2007.

[114] PRADO, Kélia L. L. *Microrganismos produtores de amilase, celulase, fosfatase, lipase, protease e urease nos solos amazônicos do Ramal do Brasileirinho (Manaus) e de Urucu (Coari)*. 71p. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais)- Universidade Estadual do Amazonas. 2009.

[115] POFFO, Í. R. F.. Vazamentos de Óleo no Litoral Norte do Estado de São Paulo: Análise Histórica (1974 a 1999). *Construindo a Ciência Ambiental*.

Abramovay, Ricardo (org.) São Paulo, SP: Annablume - FAPESP, 2002. 438p.: 235 -263p.

[116] RAMSAY, M. A., SWANNELL, R. P. J., SHIPTON, W. A., DUKE, N.C., & HILL, R. T. Effect of biorremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, v. 41, n. 7-12, p. 413-419, 2000.

[117] REIS JUNIOR, F. B., MENDES, I.C., TEIXEIRA, K. R. S., & REIS, V.M. Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002.

[118] RIMA, *Relatório de Impactos Ambientais – Gasoduto Coari-Manaus*. CCA - UFAM, 2004.

[119] RISER-ROBERTS, E. *Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical and chemical processes*. [S. l.]: Lewis Publishers 1998.

[120] RITTMANN, B.E. Innovations in biological processes for pollution control. In: MITCHELL, R. (ed.). *Environmental Microbiology*. New York : Wiley-Liss. p. 265-286.1992.

[121] ROSATO, Y. B. Biodegradação do Petróleo. In: MELO I. S; AZEVEDO, J. L. *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; Cap.14, p.307-334, 1998.

[122] SANTOS, V. L., & LINARD, V. R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents - identification and degradation potential. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1001-1006, 2004.

[123] SEABRA, P. N. *Uso da Biorremediação em Áreas Impactadas pela Indústria do Petróleo*. In: MELO, I.S., SILVA, C.M.M.S., SCRAMIN, S., & SPESSOTO, A. (Ed.) *Biodegradação*. Jaguariúna. EMBRAPA. p.41- 60. 2001.

[124] SEABRA, P.N.C. *Aplicação de biopilha na biorremediação de solos argilosos contaminados com petróleo*. 169p. 2005. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2005.

[125] SEO, J.; KEYN, Y & LI, Q.X. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research. and Public Health*. 6 (1): 278- 309. 2009.

[126][126]

[127] SMITH, M.R. The biodegradation of aromatics hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation*, 1: 191-206. 1990.

[128] SORKHOH, N.A., IBRAHIM, A.S., GHANNOUM, M.A., & RADWAN, S.S. High temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil polluted Kuwait desert. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39, 123-126. 1993.

[129] SOUTO, C. R. O., & DUARTE, H. C.. *Química da vida*. Natal, RN, : EDUFRN, 372p. 2006.

[130] SOUZA, Hilton M. L. *Isolamento e seleção de fungos filamentosos de sedimentos contaminados do rio negro com potencial para degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos*. 116p. 2015. Tese (Doutorado em biodiversidade e Biotecnologia – Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas. Manaus-AM. 2015.

[131] SOUZA FILHO, A. M. *Planos nacionais de contingência para atendimento a derramamento de óleo: análise da experiência de países representativos das américas para implantação no caso do Brasil*. 2006. 227 p. Dissertação (Mestrado em Ciências em planejamento ambiental) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

[132] STAPLETON, R. D., Savage, D.C., Sayler, G. S., & Stacey, G. Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons in an Extremely Acidic Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, p. 4180-4184. 1998.

[133] SOLOMONS, T. W. G. *Química Orgânica*. Vol I, 6ª ed., Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro, 1996.

[134] TAVARES, Walter. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 33(3):281-301, mai-jun, 2000.

[135] TING, W.T.E., YUAN, S.Y., WU, S.D., & CHANG, B.V. Biodegradation of phenanthrene and pyrene by *Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, V.65, 238-242. 2011.

- [136] UNEP (United Nations Environment Programme). Determinations of petroleum hydrocarbons in sediment. *Reference methods for marine pollution studies*. n. 20, p. 97, 1991.
- [137] UNEP (United Nations Environment Programme Chemicals). Regionally Based Assessment of Persistent Toxic Substances. *Antarctica Regional Report*, p. 86, 2002.
- [138] USBERCO, J.; SALVADOR, E. *Química - volume único*. 5ª ed. reform.– São Paulo : Saraiva, 2002.
- [139] VAN HAMME, J. D., SINGH, A., & WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol Biol Ver.* v.67, p.503-549. 2003.
- [140] WARD, D. M. FERRIS, M. J. NOLD, S. C., & BATESON, M. M. A Natural View of Microbial Biodiversity within Hot Spring Cyanobacterial Mat Communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62 (4): 1353-1370. 1998.
- [141] WETLER-TONINI, R. M. C., REZENDE, C. E., & GRATIVOL, A. D. Biodegradação Bacteriana de Petróleo e seus Derivados. *Rev. Virtual Quim.*, 2011, 3 (2), 78-87.
- [142] WHITE, T.J.; BRUNS, S.; LEE, S. Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. p. 315-22. 1990.
- [143] WOESE C. R. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*. 51 (2): 221-71. 1987.
- [144] WONGSA, P., Tanaka, M., Ueno, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I., & Okuyama, H. Isolation and Characterization of Novel Strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* Possessing High Efficiency to Degrade Gasoline, Kerosene, Diesel Oil, and Lubricating Oil. *Current microbiology*, 49: 415-422.2004.
- [145] YAKIMOV, M.M., Timmis, K.N., & Golyshin, P.N. Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18(3): 257-266. 2007.

- [146] ZAKI, M.S., MOHAMMAD, M.N.A., & HOSSAM H.H. A.. Bioremediation of Petroleum Contaminants in Aquatic Environments (Review Article). *Life Science Journal*;12(5). 2015a.
- [147] ZAKI, M.S.; FAWZI, O.M., & ABD EL-ZAHER, M.F. Bioremediation of contaminants. *Life Sci. J.*, 10(1): 3329-3332. 2013b.
- [148] ZÍLIO, E. L., & PINTO, U. B. Identificação e Distribuição dos principais grupos de compostos presentes nos Petróleos Brasileiros. *Bol. Téc. PETROBRAS*, Rio de Janeiro, 45 (1): 21-25, jan./mar. 2002.
- [149] ZINJARDE, S. S., & Pant A. A. Hydrocarbon degraders from tropical marine environments. *Mar Pollut Bull.*44(2):118-21.2002.
- [150] ZOBELL, C. E. Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol. Rev.* v.10, p.1-49, 1946.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o potencial de biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo por linhagens microbianas isoladas de ambientes aquáticos do entorno da Base Petrolífera de Urucu, Coari-AM.

Objetivos específicos

- Isolar microrganismos em cultivo puro das amostras de água dos diferentes sítios amostrais;
- Selecionar cepas com potencial de biodegradação de HPAs;
- Realizar a identificação taxonômica dos isolados;
- Analisar a biodegradação dos hidrocarbonetos promovidos pelas linhagens selecionadas;;
- Avaliar a cinética de biodegradação;
- Quantificar a degradação dos hidrocarbonetos;
- Avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos;

LISTA DE PUBLICAÇÕES

1. Petroleum biodegrading and co-resistance to antibiotics by *Serratia marcescens* strain isolated in Coari-Amazonas. **Artigo aceito para publicação revista Acta Scientiarum – Biological Science.**
2. Assessment of petroleum biodegradation for *Bacillus toyonensis* by using redox indicator 2,6 dichlorophenol indophenol . **Artigo aceito para publicação na revista Acta Scientiarum – Biological Science.**
3. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Candida mesorugosa* native to the Brazilian Amazon. **Artigo Submetido à revista - International Journal of Microbiology.**
4. Microrganismos isolados de ambientes aquáticos da Amazônia produtores de hidrolases de interesse industrial e biotecnológico. **Artigo submetido à revista - Gestão, inovação e Tecnologias (GEINTEC).**

CAPÍTULO I

Petroleum biodegrading and co-resistance to antibiotics by *Serratia marcescens* strain isolated in Coari-Amazonas

ARTIGO I

Petroleum biodegrading and co-resistance to antibiotics by *Serratia marcescens* strain isolated in Coari-Amazonas

Petroleum biodegrading *Serratia marcescens* in Amazonas

**Ferdyanne Beatriz Sabóia Peixoto¹, Jean Charles da Cunha Peixoto²,
Enedina Nogueira de Assunção³, Elise Miranda Peixoto⁴, José Odair
Pereira⁵, Spartaco Astolfi –Filho³.**

¹Rede Bionorte de Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Otávio, 6200, Coroado I, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil. ²Departamento de Parasitologia, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Otávio, 6200, Coroado I, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil. ³Centro de Apoio Multidisciplinar, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Otávio, 6200, Coroado I, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil. ⁴Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Otávio, 6200, Coroado I, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil. ⁵Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Otávio, 6200, Coroado I, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil. *Author for correspondence. e-mail: ferdyanne@gmail.com

Abstract: *Serratia marcescens* is a Gram-negative bacillus, anaerobic facultative belonging to the family Enterobacteriaceae. *S. marcescens* strains are able to grow in the presence of different xenobiotic compounds, among them, petroleum and heavy metals. Xenobiotic resistant strains develop concomitant resistance to multiple antibiotics, referred to as co-resistance. The AMS212 strain was submitted to the microplate qualitative DCPIP - redox 2,6 dichlorophenol indophenol method. The quantitative test was carried out in Erlenmeyer flasks, followed by the change of color with the absorbance readings, through the colorimetric method. The antibiotic resistance profile was evaluated by the Kirby-Bauer method. In the qualitative assay, the AMS212 strain altered the color of the DCPIP, which changed from blue to colorless, confirming that petroleum biodegradation occurred. In the quantitative test, the readings were decreasing, confirming that the concentration of DCPIP decreased as a function of the

incubation time. The susceptibility test revealed that the AMS212 strain presented multiresistance to four different antibiotics. *S. marcescens* presented high performance in the biodegradation of petroleum, opening possibility to use it in projects involving the remediation of impacted areas. The expression of the antibiotic co-resistance phenotype confirms that the AMS212 strain is able to withstand different environmental aggressions.

Keywords: Biodegradation, characterization, DCPIP, antimicrobial resistance.

Biodegradação do petróleo e corresponsabilidade a antibióticos por *Serratia marcescens* isolada em Coari-Amazonas

Biodegradação do petróleo por *Serratia marcescens* no Amazonas

Resumo: *Serratia marcescens* é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à família Enterobacteriaceae. Linhagens de *S. marcescens* são capazes de crescer na presença de diferentes compostos xenobióticos, dentre eles, petróleo e metais pesados. Linhagens resistentes a xenobióticos desenvolvem concomitante resistência a múltiplos antibióticos, denominada corresponsabilidade. A linhagem AMS212 foi submetida ao método colorimétrico com indicador DCPIP - redox 2,6 diclorofenol indofenol, qualitativo, em microplacas. O teste quantitativo foi realizado em frascos Erlenmeyer, acompanhando-se a mudança de coloração, com as leituras das absorbâncias. Avaliou-se o perfil de resistência a antibióticos pelo método de Kirby-Bauer. No ensaio qualitativo, a linhagem AMS212 alterou a cor do DCPIP, que passou de azul para incolor, confirmando que ocorreu biodegradação do petróleo. No teste quantitativo, as leituras foram decrescentes, confirmando que a concentração do DCPIP diminuiu em função do tempo de incubação. O teste de susceptibilidade revelou que a linhagem AMS212 apresenta multirresistência a quatro antibióticos diferentes. *S. marcescens* apresentou alto desempenho na biodegradação do petróleo, abrindo possibilidade de utilizá-la em projetos envolvendo a remediação de áreas impactadas. A expressão do fenótipo de corresponsabilidade a antibióticos confirma que a linhagem AMS212 é capaz de resistir a diferentes agressões ambientais.

Palavras-chave: Biodegradação, caracterização, DCPIP, resistência a antimicrobianos.

Introduction

Bacteria from *Serratia* genus, Enterobacteriaceae family, are characterized as Gram-negative, facultative anaerobic and chemotrophic bacilli (Hejazi & Falkiner, 1997; Carvalho et al., 2010). They are cosmopolitan bacteria (Ashelford, Fry, Bailey, & Day, 2002), and may be isolated from the aquatic environments, petroleum, animals, including humans and plants (Grimont & Grimont, 1992; Ashelford et al., 2002).

Serratia species have been described in the literature as being able to grow in environments containing petroleum hydrocarbons (Rojas – Avelizapa, Cervantes – Gonzalez, Cruz – Camarillo, & Rojas-Avelizapa, 2002; Wongsu et al., 2004; Ortega-González et al., 2013), and in environments saturated with heavy metals (Alzubaidy, 2012; Silva et al., 2012; Ibrahim, Syed, Shukor, & Ahmad, 2014). The *S. marcescens* specie has been reported as the most important *Serratia* species due to its ability to produce compounds, like prodigiosin, a natural red pigment, Serrawettina, a biotensioactive that gives it adherence in the process of colonization of surfaces, and also enzymes, like as proteases, nucleases, lipases, chitinases, benzonases and cloroperoxidases (Montaner et al., 2000; Pérez -Tomás, Montaner, Llagostera, & Soto-cerrato, 2003; Morohoshi et al., 2007; Kalivoda et al., 2010). Due to the metabolic capacity of *S. marcescens* strains to degrade petroleum, these strains have been used alone or in microbial consortia, aiming at the recovery of environments impacted by petroleum spills and derivatives (Wongsu et al., 2004; Ortega-González et al., 2013; Silva et al., 2015).

S. marcescens is able to survive in inhospitable environments, presenting resistance to antiseptics, disinfectants and antibiotics (Aucken & Pitt, 1998; Doi et al., 2004; Iguchi et al., 2014). The ability to metabolize different xenobiotics, produce bioactive compounds as well as colonize different environments are among the characteristics that gives to this species multiple abilities and a great biotechnological and commercial potential. In this context, the present research aimed to study *S. marcescens* AMS212 bacterial strain isolated from the aquatic environment around the Urucu Petroleum Base, Coari - Amazonas and to test its

potential to degrade petroleum, and to evaluate its antimicrobial resistance profile.

Material and methods

Area of study, enrichment and isolation

The study area comprises the natural stream (S 04°51'40.4" / W 065°17'52.7"), located near the Urucu, Coari, Amazonas-Brazil Petroleum Base. For isolating the strain, 10 mL of the water sample were incubated in Erlenmeyer flasks of 250 mL with 90 mL of Bushnell Haas (BH) broth (Difco™) commercial medium; 1% of raw petroleum as the source of carbon. The samples were in orbital shaker (Thermo Scientific™ MaxQ™ 4000), 180 rpm/min, 30 °C, during 21 days. Isolation of the microorganism consisted in the use of commercial BH agar containing petroleum as the sole source of carbon. The pure culture was transferred to commercial tryptic soy agar - TSA (Difco™). The petroleum used in the experiments came from the Petroleum Province of Coari and was previously sterilized by the filtration method in millipore® 0.22µm. The AMS212 strain is deposited in the bacterial genetics laboratory of the Federal University of Amazonas-UFAM.

Preparation of bacterial inoculum

The inoculum was previously cultured in Nutrient broth (HIMEDIA) at 30 °C for 12 hours at 180 rpm in an orbital shaker (Thermo Scientific™ MaxQ™ 4000). Cells were centrifuged for 10min, washed with saline solution (0.9%) and standardized in a UV-VIS (Thermo spectronic Biomate 3) spectrophotometer at 600_{nm} and D.O = 1 (10⁹ cells / mL⁻¹).

Biodegradability test

Qualitative analysis

The qualitative analysis of petroleum biodegradability was carried out in sterile multiwell (24 wells) microplates, incubated at 30 °C. The DCPIP redox indicator [0.01g.L⁻¹] was dissolved in sterile BH broth (Himedia). The evaluations were performed every 12 hours until the color change of the medium occurred. The test was performed as described by Hanson, Desai, and Desai, (1993) and

Bidoia, Montagnolli, and Lopes (2010), with adaptations. The assay was assembled in triplicate, according to Table 1.

Table 1. Composition of qualitative test.

Test	Composition	DCPIP [0.01 g L ⁻¹]	Petroleum	AMS212	BH
Control 1	DCPIP+BH	1.5 ml	-	-	2.5 µL
Control 2	DCPIP+BH+Petroleum	1.5 ml	10 µL	-	2.5 µL
Inoculum	DCPIP+Petroleum+AMS212	1.5 ml	10 µL	25 µL	-

Quantitative analysis

The quantitative analysis was conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks, in triplicate, incubated at 30 °C at 180 rpm in an orbital shaker (Thermo Scientific™ MaxQ™ 4000). Aliquots of 1 mL of the culture were collected to read the absorbance at 600_{nm} in a UV-VIS spectrophotometer (Thermo spectronic Biomate 3) at 24, 48, 72 hour intervals. For this test, the DCPIP solution was prepared in the concentration of 1 g.L⁻¹ in sterile BH medium (Hanson et al., 1993; Bidoia et al., 2010, with adaptations). Table 1 shows the composition of this assay.

Table 2. Composition of the quantitative assay.

Test	Composition	BH	DCPIP	Petroleum	AMS212	H ₂ O
Control 0	BH	90.000 mL	-	-	-	10.000 mL
Control 1	BH + DCPIP	90.000 mL	4.761 mL	-	-	5.239 mL
Control 2	BH+DCPIP+Petroleum	90.000 mL	4.761 mL	0.595 mL	-	4.644 mL
Control 3	BH+DCPIP+AMS212	90.000 mL	4.761 mL	-	2.380 mL	2.859 mL
Inoculum	BH+DCPIP+Petroleum+AMS212	90.000 mL	4.761 mL	0.595 mL	2.380 mL	2.264 mL

The quantitative evaluation was performed by reading the absorbance, converted to mg of DCPIP, using the standard curve ($R^2 = 0.9998$) (Figure 1), following Equation 1: $[DCPIP] = (Abs_{600} + 0.0037) / 0.154$. Where: $[DCPIP]$ = concentration of redox indicator DCPIP in mg. L⁻¹; and Abs_{600} = absorbance of the sample at wavelength 600_{nm}. The standard curve was drawn from five

dilutions of the DCPIP indicator in BH broth. Thus, absorbance readings were performed at 600_{nm} UV-VIS spectrophotometer (Thermo spectronic Biomate 3) as shown in Table 3.

Table 3: Absorbance readings at 600_{nm} and dilutions of DCPIP redox indicator.

Erlenmeyer Flasks	Volumes (mL)			[DCPIP] (mg.L ⁻¹)	Abs. _{600 nm} u.a
	BH	DCPIP [1g.L ⁻¹]	H ₂ O		
0	90.000	0.000	10.000	0.000	0.0000
1	90.000	0.595	9.405	5.950	0.0880
2	90.000	1.190	8.810	11.900	0.1730
3	90.000	2.380	7.620	23.800	0.3620
4	90.000	3.571	6.429	35.710	0.5490
5	90.000	4.761	5.239	47.610	0.7270

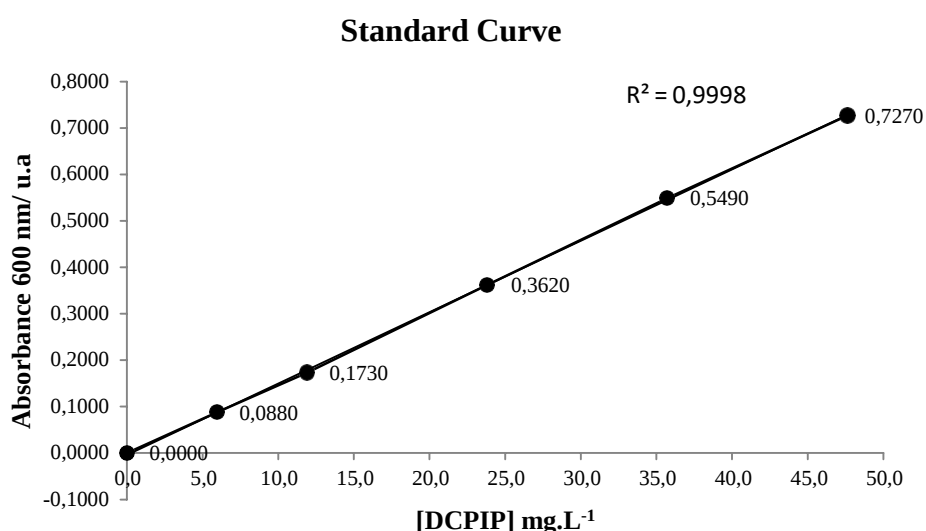


Figure 1. Standard curve - [DCPIP].

Antimicrobial sensitivity test

The sensitivity profile of the AMS212 strain was evaluated by the Kirby and Bauer method (Bauer & Kirby, 1960) using pre-loaded antibiotic disks (Laborclin[®]) according to the manufacturer's instructions. The susceptibility of the AMS212 strain was evaluated against the antibiotics: ampicillin (AMP), amikacin (AMI), amoxicillin plus clavulanate (AMC), ceftazidime (CAZ), cefepime (CPM), cefoxitin (CFO), cefuroxima (CRX), ciprofloxacin (CIP), gentamicin (GEN), meropenem (MER), cephalothin (CFL) and sulfazotrim (SUT). The antimicrobial

susceptibility test was performed in duplicate. *Escherichia coli* ATCC strain was used as negative control.

Phenotypical characterization

The bacterial isolate AMS212 was characterized morphologically and submitted to the biochemical screening system of enterobacteria (Newprov®) which allowed to identify the microorganism at the specie level, based on Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt, Krieg, Sneath, Staley, & Williams, 1994).

Amplification and sequencing of rRNA 16S gene

Genomic DNA from the AMS212 bacterium was extracted with PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, (Invitrogen™) according to the manufacturer's instructions. The amplification reaction was performed by using primers 530F (5'TGACTGACTGAGTGCCA GCMGCCGCGG3') and 1495R (5'TGACTGACTGAGAGCTCTACCTTGTTA3'). The total reaction volume was 25 µL containing (2.5 µL MgCl₂ [25 mM], 2.5 µL dNTPs [2.5 mM]; 2.0 µL of each primer [5 pMol.µL⁻¹]; 0.3 µL of Taq DNA Polymerase [5 U.µL⁻¹]; 2.5 µL of 10X buffer). In vitro amplification of the sequences belonging to the rRNA 16S gene was conducted on the thermal cycler (Thermal Cycler, Veriti® 96-Well - Applied Biosystems). The amplification was conducted in Thermal Cycler, Veriti® 96-Well - Applied Biosystems, covering 35 cycles. The thermal profile of the PCR reaction consisted of the initial denaturation cycle at 95 °C for 1 minute; 95 °C for 40 seconds, primer annealing at 58 °C for 40 seconds and polymerization at 72 °C for 40 seconds (35 cycles); and a final extension step at 72 °C for 7 minutes. For the amplicon sequencing, BigDye® Terminator v3.1 sequencing kit was used in a capillary sequencer (model 3500 ABI PRISM® Genetic Analyzer, Applied Biosystems®).

Phylogenetic analysis

The sequences generated were treated in the phred/phrap and CAP 3 available at <http://www.biomol.unb.br/phph/>, and then analyzed in the BLASTn program National Center for Biotechnology Information - NCBI. The phylogenetic

analysis was made based on the evolutionary distances calculated by the Neighbor-Joining and Jukes-Cantor algorithms, using the MEGA 7.0 program (Saitou, & Nei, 1987; Jukes, & Cantor 1969). After the construction of the phylogenetic tree, it is possible to determine the taxonomic position of the isolate in relation to the species whose corresponding sequences were obtained in NCBI (Felsenstein, 1985, Kumar & Tamura, 2016).

Results and discussion

The biodegradability test using the DCPIP redox indicator showed the potential of the AMS212 strain in using petroleum as a carbon source. The biodegradation was evinced through the chemical reactions undergone by the DCPIP during the microbial oxidation of the hydrocarbons. The qualitative analysis showed visually that the bacterial strain AMS212 was able to alter the coloration of the (oxidized) blue to colorless (reduced) medium after 16 hours of incubation. The quantitative analysis performed by absorbance reading showed a decline in the DCPIP concentration. The AMS212 inoculum demonstrated a reduction in DCPIP concentration over controls over the 24-hour period (Figure 2). The lack of carbon source in the control (3) showed a low reduction in DCPIP concentration due to low microbial activity in this assay (Table 4). It has been observed that after 48 hours, there was an increase in the concentration of DCPIP. According to Bidoia et al. (2010), DCPIP is a reversible indicator, returning to its original coloration after reduction occurs.

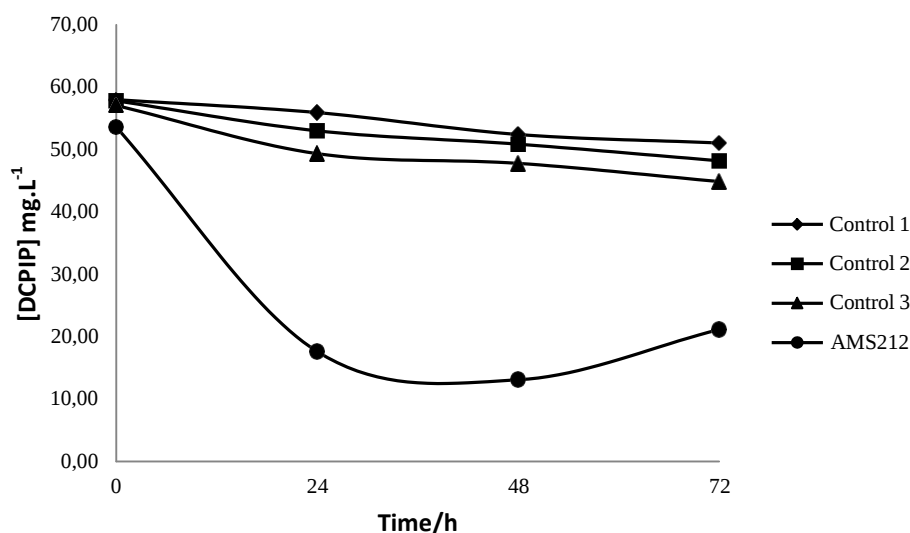


Figure 2. Concentration of DCPIP as a function of time.

Table 4. DCPIP Concentrations.

Time/h	Control 1	Control 2	Control 3	AMS212
0	57.97	57.77	57.06	53.60
24	55.89	52.97	49.33	17.60
48	52.38	50.82	47.77	13.08
72	51.02	48.16	44.85	21.13

Mariano, Bonotto, De Angelis, Pirôllo, & Contiero, (2008) evaluated the rate of biodegradation of diesel and biodiesel by the colorimetric method with the redox indicator DCPIP, establishing the final time of the experiment by altering the color of the medium, from blue (oxidized) to colorless (reduced). Varjani and Upasani (2013), when assessing the hydrocarbon degradation by a bacterial consortium, recorded the lowest discoloration time of the medium in 120 hours, out of a total of 144 hours. The selection of degrading microorganisms using DCPIP has been a trend and its efficacy has been proved by different authors (Hanson et al., 1993, Mariano et al., 2008, Bidoia et al., 2010, Luz et al., 2011). The species *S. marcescens* has been described as degrading the most diverse types of petroleum hydrocarbons and derivatives (De La Fuente, Perestelo, Rodriguez-Perez, & Falcon, 1991; Ijah, 1998, Wongsa et al., 2004; Jaysree, Rajam, & Rajendran, 2015). Wongsa et al., 2004, emphasizes that the *S. marcescens* species is capable of degrading a broad spectrum of hydrocarbons, mainly aromatic compounds, however, the authors also found the degradation of long chain alkanes. De La Fuente et al. (1991) reports the ability of *S. marcescens* to oxidize aromatic aldehyde compounds.

The antimicrobial susceptibility profile showed that the AMS212 strain was sensitive to most of the antibiotics tested, including amikacin (AMI), ceftazidime (CAZ), cefepime (CPM), cefoxitin (CFO), ciprofloxacin (CIP), gentamicin (GEN), meropenem (MER) and sulfazotrim (SUT), and was resistant to ampicillin (AMP), cefuroxime (CRX), cephalothin (CFL), with particular resistance to amoxicillin plus clavulanate (AMC) confirming the Beta Lactamase of Extended Spectrum (ESBL) (Figure 3). The problem of multiresistance to antibiotics worldwide in bacterial populations of medical importance has led the international scientific

community to consider some factors predisposing to the increase of bacterial strains resistant to these antimicrobials (Nikaido, 2009; Singer, Shaw, Rhodes, & Hart, 2016). Among the factors that may favor a greater dispersion of antimicrobial resistance genes, environmental contamination by toxic compounds, such as petroleum and other xenobiotics, tends to select bacterial strains capable of surviving high concentrations of these cytotoxic compounds (Kümmerer, 2004; Davies & Davies, 2010; Manaia, Macedo, Fatta-Kassinos, & Nunes, 2016). Moreover, these bacterial strains capable of metabolizing xenobiotics develop co-resistance to one or more antibiotics (Owolabi, & Hekeu, 2014; Thompson, Maani, Lindell, King, & McArthur, 2007), becoming reservoirs of antibiotic resistance genes (Manaia et al., 2016). There are reports in the scientific literature which correlate the ability of strains of *S. marcescens*, recognized as opportunistic pathogen, to resist the presence of heavy metals and biocides, with concomitant multiresistance to antibiotics (Jafarzade, Mohamad, Usup, & Ahmad, 2012; Nageswaran, Ramteke, Verma, & Pandey, 2012). However, the present study correlates the metabolic capacity of the AMS212 *S. marcescens* strain to degrade petroleum, expressing multiresistance to four different antibiotics, including the ESBL.

The morphological characterization of the strain was made with Gram's staining, allowing the AMS212 strain to be identified as a Gram-negative bacillus. In the biochemical tests, the strain AMS212 was negative in the tests of oxidase, L-Tryptofano desaminase, hydrogen sulfide, urease, and indole; ferments glucose, but not producing gas; not ferments lactose; was positive for motility, lysine decarboxylase, and Simmons' citrate. The tests allowed identifying the AMS212 strain as belonging to the *S. marcescens* species. Although environmental isolates of the species *S. marcescens* have been described in the literature as producers of red pigment prodigiosin (Grimont & Grimont, 1984, Hejazi & Falkiner, 1997), AMS212 strain identified in this study did not express prodigiosin production. According to Grimont and Grimont (1984) the ability to produce prodigiosin is characteristic of the *S. marcescens* species, however, the function of this pigment is still unknown, because clinical isolates are rarely pigmented. It can be deduced that the fact that the strain isolated in this study did not produce prodigiosin is related to the cultivation conditions, such as availability

of carbon and nitrogen sources, temperature, pH, oxygenation, and luminosity, as suggested by the authors Rjazantseva, Andreeva, Ogorodnikova, (1994) and Hejazi and Falkiner, (1997). Among other factors that may have contributed to the non-expression of prodigiosin by the *S. marcescens*AMS212 isolate, the strain was submitted to the mineral medium enriched with petroleum as the only source of carbon and energy, which may have caused stress to prevent it from expressing the red pigment. Kim, Lee and Yim (2009) report that the synthesis of prodigiosin in *S. marcescens* is related to the availability of inorganic salts such as sodium chloride, glycerol as carbon source and ammonium salts as a source of nitrogen.

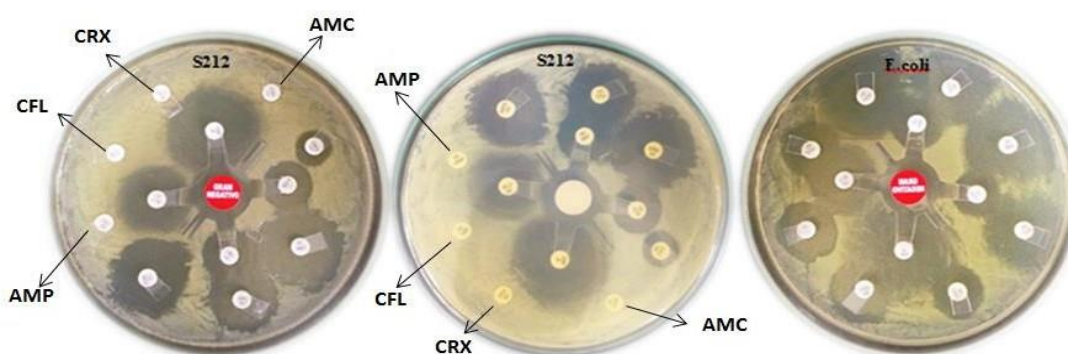


Figure 3. Antimicrobial activity profile of isolated *S. marcescens* AMS212. *E.coli* was used as control.

The amplification and sequencing of the rRNA 16S gene confirmed the identification of the AMS212 strain, after submission of the nucleotide sequences to the BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) program, as belonging to *S. marcescens* specie with 99% identity and Query cover 100% compared to *S. marcescens* strain NBRC 102204 16S ribosomal RNA gene available in the GenBank. The nucleotide sequence was deposited in GenBank database as *S. marcescens* AMS212 under accession number KX686744. Phylogenetic analysis to confirm the taxonomic position of the strain was performed in the MEGA 7.0 program (Felsenstein, 1985; Kumar & Tamura, 2016), aligning the rRNA 16S gene sequence of the isolated *S. marcescens* AMS212 strain (KX686744), along with nine other of rRNA 16S gene of different species of *Serratia* genus obtained in the Genbank. Phylogenetic analysis demonstrated on

this study is the sequence *S. marcescens* AMS212, grouped with the sequence belonging to the *S. marcescens* species (288779640_AJ233427.1) available in the GenBank - NCBI, presenting 100% *bootstrap*, when compared with the sequences of other species belonging to *Serratia* genus, as shown in Figure 2 (Saitou & Nei, 1987).

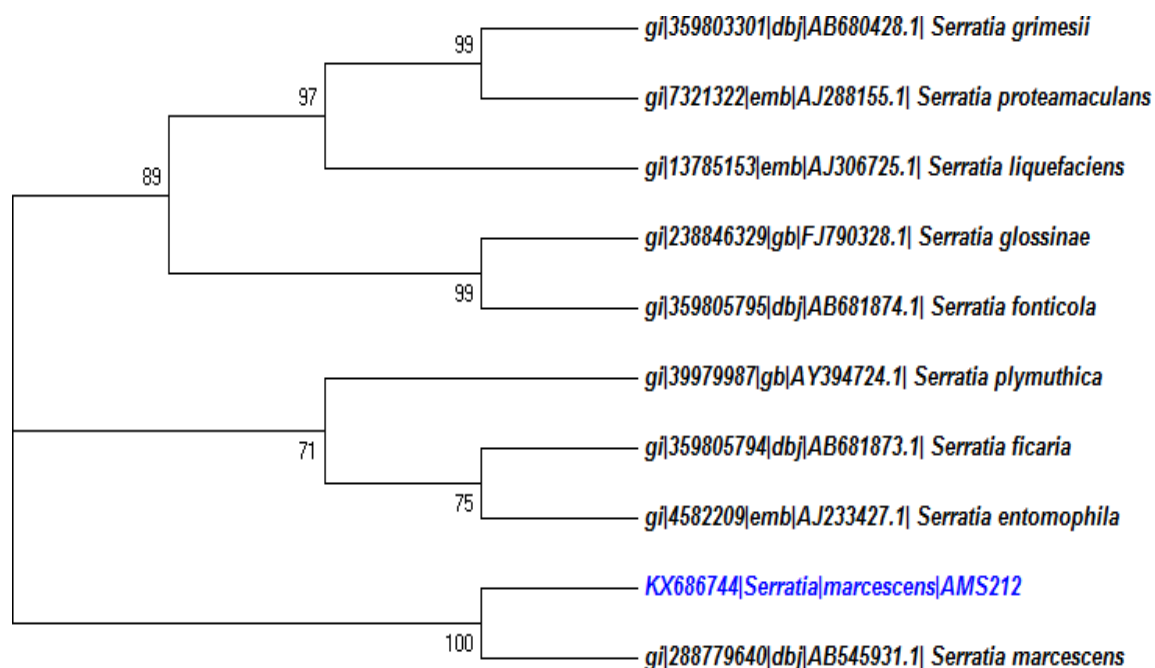


Figure 4. Phylogenetic tree showing the taxonomic location of AMS212 strain. The phylogenetic dendrogram was built by using Neighbor-Joining method, based on sequences from gene region rRNA 16S. Values of bootstrap determined for 1000 repetitions are shown at the ramifications nodes.

Conclusion

The *S. marcescens* AMS212 strain, in the quantitative analysis, decreased the concentration of DCPIP, confirming the metabolic capacity of this strain to biodegrade the petroleum. The evaluation of biodegradability using the DCPIP molecule has proved to be an effective method in the search for new bacterial strains with potential to degrade petroleum. In the antimicrobial susceptibility test, *S. marcescens* expressed multiresistance profile to four different antibiotics, confirming co-resistance with petroleum. The AMS212 strain demonstrated biodegradability potential and could be used in future biotechnologies for the remediation of contaminated environments.

Acknowledgement

The authors thank to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), to the Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES), to Research Foundation of the State of Amazonas (FAPEAM), for the financial support. The authors also thank to the Federal University of Amazonas (UFAM) - Program of Post-Graduation in Biodiversity and Biotechnology of Legal Amazonia (BIONORTE).

References

- Alzubaidy, S. K. (2012). The resistance of locally isolated *Serratia marcescens* to heavy metals chlorides and optimization of some environmental factors. *Journal of Environmental and Occupational Science*, 1(1):37-42.
- Ashelford, K. E., Fry, J. C., Bailey, M. J., & Day, M. J. (2002). Characterization of *Serratia* isolates from soil, ecological implications and transfer of *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora* Grimont *et al.* 1983 to *Serratia quinivorans* corrig., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52:2281-2289.
- Aucken, H. M., & Pitt, T. L. (1998). Antibiotic resistance and putative virulence factors of *Serratia marcescens* with respect to O and K serotypes. *Journal of Medical Microbiology*, 47:1105-1113.
- Bauer A.W., Perry D.M., Kirby W.M.M. (1960). Drug usage and antibiotic susceptibility of staphylococci. *Journal of the American Medical Association*, 173:475-480.
- Bidoia, E. D., Montagnolli R.N., & Lopes P.R.M. (2010) Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. *Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 3(290-295):1277-88.

Carvalho, R. G. C., Carneiro, I. C. R. S., Pinheiro, M. S., Pinheiro, S. C., Azevedo, P. S. R.; Santos, S. D., ... Lima, K. V. B. (2010). Phenotypic and genotypic characterization of *Serratia marcescens* from a Neonatal Unit in Belém, Pará State, Brazil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 1(1):101-106.

Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3) 417-433.

De La Fuente, G., Perestelo, F., Rodriguez, P. A., & Falcon, M. A. (1991). Oxidation of aromatic aldehydes by *Serratia marcescens*. *Applied Environment Microbiology*, 57:1275-1276.

Doi, Y., Yokoyama, K., Yamane, K., Wachino, J. I., Shibata, N., Yagi, T., & Arakawa, Y.(2004). Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring highlevel resistance to aminoglycosides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(2) 491- 496.

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.

Grimont, P. A. D. & Grimont, F. (1984). Genus VIII. *Serratia* Bizio 1823, 288AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 477-484. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.

Grimont, F. & Grimont, P. A. D. (1992). The genus *Serratia*. In *The Prokaryotes*, pp. 2822-2848. Edited by A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder & K.-H. Schleifer. New York: Springer.

Hanson, K. G., Desai J. D., & Desai A.J. (1993). A Rapid and Simple Screening Crude Petroleum Degrading Technique for Potential Microorganisms. *Biotechnology Techniques*,7(1):745-8.

Hejazi, A., & Falkiner, F. R. (1997). *Serratia marcescens*. *Journal Medical*

Microbiology, 46:903-912.

Holt, J. H., Krieg, N. R., Sneath, P. H., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology ninth edition. *European journal of paediatric neurology: EJPN: Official journal of the European Paediatric Neurology Society*, 13(6):560.

Iguchi, A., Nagaya, Y., Pradel, E., Ooka, T., Ogura, Y. Katsura, K., & Hayashi, T. (2014). Genome evolution and plasticity of *Serratia marcescens*, an important multidrug-resistant nosocomial pathogen. *Genome biology and evolution*, 6(8) 2096-2110.

Ijah, U. J. J. (1998). Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. *Waste Management*, 18: 293-299.

Ibrahim, K. K., Syed, M. A., Shukor, M. Y., & Ahmad, S. A. (2014). Effect of Heavy Metals on Cyanide Biodegradation by Resting Cells of *Serratia marcescens* strain AQ07. *Journal of environmental microbiology and toxicology*, 2 (2)58-60.

Jaysree, R. C., Rajam, C., & Rajendran, N. (2015). Isolation and identification of petroleum utilizing microorganisms from different environmental sources. *International Journal of ChemTech Research*, 8(7) 260-270.

Jafarzade, M., Mohamad, S., Usup, G., & Ahmad, A. (2012). Heavy-Metal Tolerance and Antibiotic Susceptibility of Red Pigmented Bacteria Isolated from Marine Environment. *Natural Resources*, 3: 171-174.

Jukes, T. H., & Cantor C.R. (1969). Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*, 21-132, Academic Press, New York.

Kalivoda, E. J., Stella, N.A., Aston, M.A., Fender, J.E., Thompson, P.P., Kowalski, R.P., & Shanks, R.M. (2010). Cyclic AMP negatively regulates

prodigiosin production by *Serratia marcescens*. *Research in Microbiology*, 161(2) 158-167.

Kim, S. J., Lee, H. K, & Yim, J. H. (2009). Statistical optimization of medium components for the production of prodigiosin by *Hahella chejuensis* KCTC2396. *Journal Microbiology Biotechnology*, 18:1903-7.

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33 (7): 1870-1874.

Kümmerer, K. Resistance in the environment. (2004). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* , 54: 311-320

Luz, C. C., Santos, E. A., Santos, M. O. S., Mussu, M. Y., Yamashita, M., & Bastos, W. R. (2011). Estudos de biodegradação de óleo diesel por consorcio microbiano coletado em porto velho- Ro, Amazônia. *Quimica Nova*, 34(5):775-9.

Mariano, A. P., Bonotto, D. M. , De Angelis, D. D. F., Pirôllo, M. P. S., Contiero, J. (2008) Biodegradability of commercial and weathered diesel petroleums. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1):133-42.

Manaia, C.M., Macedo, G., Fatta-Kassinos, D., & Nunes, O.C. (2016). Antibiotic resistance in urban aquatic environments: can it be controlled? *Applied Microbiology Biotechnology*, 100:1543-1557

Montaner, B., Navarro, S., Piqueé, M., Vilaseca, M., Martinell, M., Giralt, ..., Pérez-Tomás, R. (2000). Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *British Journal Pharmacology*, 131: 585-593.

Morohoshi, T., Shiono, T., Takidouchi, K., Kato, M., Kato, N., Kato, & J., Ikeda, T. (2007). Inhibition of Quorum Sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by Synthetic Analogs of N-Acylhomoserine Lactone. *Applied Environment Microbiology*, 6339-

6344.

Nageswaran, N., Ramteke, P. W., Verma, O. P., & Pandey, A. (2012). Antibiotic Susceptibility and Heavy Metal Tolerance Pattern of *Serratia Marcescens* Isolated From Soil and Water. *Bioremediation & Biodegradation*, 3:7.

Nikaido, H. (2009). Multidrug Resistance in Bacteria. *Annual Review Biochememistry*, 78: 119-146.

Ortega-González, D. K., Zaragoza, D., Aguirre-Garrido, J., Ramírez - Saad, H., Hernández - Rodríguez, C., & Jan-Roblero, J. (2013). Degradation of benzene, toluene, and xylene isomers by a bacterial consortium obtained from rhizosphere soil of *Cyperus* sp. Grown in a petroleum-contaminated area. *Folia Microbiologica*, 58:569-577.

Owolabi, J. B., & Hekeu, M. M. (2014). Heavy Metal Resistance and Antibiotic Susceptibility Pattern of Bacteria Isolated from Selected Polluted Soils in Lagos and Ota, Nigeria. *International Journal of Basic & Applied Sciences*, 14:06.

Pérez-Tomás, R., Montaner, B., Llagostera, E., & Soto-cerrato, V. (2003). The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties. *Biochemical Pharmacology*, 66: 1447-1452.

Rjasantseva, I. N., Andreeva, I. N., & Ogorodnikova, T. I. (1994). Effect of various growth conditions on pigmentation of *Serratia marcescens*. *Microbios*, 79: 155-61.

Rojas – Avelizapa, N.G., Cervantes – Gonzalez, E., Cruz – Camarillo, R., & Rojas-Avelizapa, L. I. (2002). Degradation of aromatic and asphaltenic fractions by *Serratia liquefasciens* end *Bacillus* sp. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 69: 0835-0842.

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for

reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425.

Silva, A. A. L., Carvalho, M. A. R., Souza, S. A. L., Dias, P. M. T., Filho, R. G. S., Saramago, C. S. M., ... & Hofer, E. (2012). Heavy metal tolerance (Cr, Ag AND Hg) in bacteria isolated from sewage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1620-1631.

Silva, D. S. P., Cavalcanti, D. L., Melo, E. J. V., Santos, P. N. F., Luz, E. L. P., Gusmão, N. B., & Sousa, M. F. V. Q. (2015). Bio-removal of diesel oil through a microbial consortium isolated from a polluted environment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 97:85- 89.

Singer, A. C., Shaw, H., Rhodes, V., & Hart, A. (2016). Review of Antimicrobial Resistance in the Environment and Its Relevance to Environmental Regulators. *Frontiers in Microbiology*, 7:1728.

Thompson, S. A., Maani, E. V., Lindell, A. H., King, C. J., & McArthur, J. V. (2007). Novel Tetracycline Resistance Determinant Isolated from an Environmental Strain of *Serratia marcescens*. *Applied And Environmental Microbiology*, 73(7)2199-2206.

Wongsa, P., Tanaka, M., Ueno, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I., & Okuyama, H. (2004). Isolation and Characterization of Novel Strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* Possessing High Efficiency to Degrade Gasoline, Kerosene, Diesel Oil, and Lubricating Oil. *Current microbiology*, 49: 415-422.

Varjani, S., & Upasani V. (2013). Comparative studies on bacterial consortia for hydrocarbon degradation. *Screening*, 2(10):5377-83.

CAPÍTULO II

**Assessment of petroleum biodegradation
for *Bacillus toyonensis* by using redox
indicator 2,6 dichlorophenol indophenol**

ARTIGO II

Assessment of petroleum biodegradation for *Bacillus toyonensis* by using redox indicator 2,6 dichlorophenol indophenol

Ferdynanne Beatriz Sabóia Peixoto¹, Jean Charles da Cunha Peixoto²,
Diana Cibelli Lucas Motta³, Ana Teresa Miranda Peixoto³, José Odair
Pereira⁴, Spartaco Astolfi –Filho⁵.

¹ Rede Bionorte de Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Otávio, 6200, Coroado I, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil. ²Departamento de Parasitologia, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Otávio, 6200, Coroado I, 69077-000. ³ Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Otávio, 6200, Coroado I, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil. ⁴ Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Otávio, 6200, Coroado I, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil. ⁵ Centro de apoio multidisciplinar, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Otávio, 6200, Coroado I, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil. *Author for correspondence. e-mail: ferdynanne@gmail.com.

ABSTRACT: Petroleum degrading microorganisms have been isolated from different environments with the purpose of being used in bioremediation processes in areas impacted by petroleum spills. The objective of this study was to evaluate the ability of *Bacillus toyonensis* AM07 strain to metabolize petroleum compounds. The strain was isolated from the effluent dike of the Urucu Petroleum Province, Coari - Amazonas, Brazil. The degrading activity of *B. toyonensis* was evaluated by the colorimetric method using the redox indicator 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP). Thus, the microorganism was inoculated into minimal medium with DCPIP, and with petroleum as the sole carbon source. The degradation potential of the microorganism was found by changing the DCPIP staining and absorbance readings 600_{nm}. The results obtained demonstrated that the bacterial strain was able to degrade petroleum by altering the color of the medium from blue to colorless and by reducing the concentration of the indicator in the absorbance readings.

Keywords: Amazon, bacterium, biodegradability, DCPIP.

Avaliação da biodegradação do petróleo por *Bacillus toyonensis*, usando o indicador redox 2,6 diclorofenol indofenol

RESUMO: Microrganismos degradadores de petróleo têm sido isolados de diferentes ambientes com a finalidade de serem utilizados em processos de biorremediação de áreas impactadas com derrames de petróleo. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade da linhagem de *Bacillus toyonensis* AM07, isolada do dique de efluente da Província Petrolífera de Urucu, Coari - Amazonas, Brasil, em metabolizar compostos do petróleo. A atividade degradadora do *B. toyonensis* foi avaliada pelo método colorimétrico, utilizando indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP). Assim, o microrganismo foi inoculado em meio mínimo com DCPIP e petróleo como única fonte de carbono. O potencial de degradação do microrganismo foi constatado mediante a mudança de coloração DCPIP e leituras de absorbância 600_{nm}. Os resultados obtidos demonstraram que a cepa bacteriana foi capaz de degradar petróleo, alterando a coloração do meio de azul para incolor e reduzindo a concentração do indicador nas leituras de absorbâncias.

Palavras-chave: Amazônia, bactéria, biodegradabilidade, DCPIP.

INTRODUCTION

The microorganisms capable of degrading petroleum have been isolated from different environments with the objective of being used in bioremediation processes of impacted areas (Olajire, & Essien, 2014; Das, & Chandran, 2011). The presence of hydrocarbons on the environment selects microbial populations able to use them as substrate for their maintenance and survival (Darsa, Thatheyus, & Ramya, 2014; Bujang, & Ibrahim, 2013).

The species of the genus *Bacillus* have been reported as petroleum compounds degraders, such as pyrene, naphthalene and n-alkenes (Darsa et al., 2014; Sorkhoh, Ibrahim, Ghannoum, & Radwan, 1993). In this genus, a new specie was described by Jiménez et al. (2013) as part of the phylogenetic group *Bacillus cereus*, named *B. toyonensis*. The group consists of Gram-positive, endospore-forming bacteria found in soils, covering the bacterial

species *B. cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis*, *B. toyonensis* and *Bacillus cytotoxicus* (Jiménez, Blanch, Tamames, & Rosselló-mora, 2013).

The *B. toyonensis* was isolated for the first time in Japan, in 1966, as *B. cereus* var. *toyoi* (BCT- 7112 strain), and it has been used as probiotics in the animal nutrition since 1975, when it was officially approved by Japan's Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries as Toyocerin® (Jiménez et al., 2013; Jiménez et al., 2013). Okaiyeto, Nwodo, & Mabinya (2015) recorded the occurrence of *B. toyonensis* in samples of sediments from marine environment in South Africa. Adewale, Goh, Lim, & Ting (2015) isolated *B. toyonensis*, as an endophytic bacteria, from medicinal plants *Mentha spicata*, with highlighting commercial interest for Asian communities. However, the use of *B. toyonensis* as a petroleum degrading agent has been little explored.

The method of fast selection of microorganisms that degrade petroleum by using redox indicator DCPIP has been broadly accepted, once it detects an oxidation of NADH to NAD⁺ (Hanson, Desai, & Desai, 1993; Kubota, Koma, Matsumiya, Chung, & Kubo, 2008). In practice, DCPIP molecule act as electrons acceptor, receiving them from the process of oxidation, mediated by microorganisms which use hydrocarbons as substrate. A test is considered positive when DCPIP changes the original color, from blue (oxidized state) to colorless (reduced state), in the presence of hydrocarbons (Hanson et al., 1993; Bidoia, Montagnolli, & Lopes, 2010). The present study had the aim to assess the petroleum degrading potential by a strain of *B. toyonensis*, isolated from an effluent dike of Urucu Petrol Basin, Coari – Amazonas, Brazil, by using the technique of rapid selection with redox indicator DCPIP.

MATERIAL AND METHODS

The research was performed with the strain of *B. toyonensis* isolated from samples of water from the dike effluent of Urucu Petrol Basin, located in the Municipality of Coari, Amazonas-Brazil. The bacterial strain AM07 is deposited in the culture collection of the Laboratory of Bacterial Genetics of Federal Amazon University - UFAM, Manaus.

Enrichment and isolation

The water samples were enriched in 500 ml Erlenmeyer flasks, containing 90 ml of Bushnell Haas Broth -BH mineral medium (Difco [™]) (magnesium sulphate 0.2 g.L⁻¹, calcium chloride 0.02 g.L⁻¹; potassium nitrate 1.0 g.L⁻¹, ferric chloride 0.05 g.L⁻¹, monopotassium phosphate 1.0 g.L⁻¹, diammonium hydrogen phosphate 1.0 g.L⁻¹), 10 ml of water, and 1% of petroleum as the only source of carbon. The vials were incubated at 30 °C, and at 180 rpm per minute in an orbital shaker (Thermo Scientific MaxQ [™] 4000) for 21 days. The microorganism was isolated on plates containing BH agar medium plus petroleum. The pure culture was transferred to plates containing tryptone medium soybean (TSC) (Difco [™]) (15 g.L⁻¹ casein hydrolyzate; sodium chloride 5 g.L⁻¹; papaya soybean hydrolyzate 5 g.L⁻¹; 15 g.L⁻¹ agar). The petroleum used in the experiments came from the Coari Petroleum Province, and before being used, it was previously filtered in Millipore[™] membranes of 0.22µm.

Biodegradability test using the DCPIP redox indicator

The qualitative assay was performed in sterile multiwell (24 wells) microplates in triplicate. 1.5 ml of DCPIP [0.01 g.L⁻¹ BH] was added to each well, along with 10 µl of petroleum and 25 µl of bacterial inoculum previously cultured in nutrient broth medium (HIMEDIA) at 30 °C for 12 hours, at 150 rpm in an orbital shaker (Thermo Scientific MaxQ[™] 4000). The cells were centrifuged for 10 min, washed with saline solution (0.9%), and then standardized in a UV-VIS spectrophotometer (Thermo spectronic Biomate 3) at 600_{nm} O.D = 1 (10⁹ cells.mL⁻¹). The control (1) was prepared with 1.5 ml of DCPIP and 2.5 µl of BH, the control (2) was prepared with 1.5 ml of DCPIP, 2.5 µl of BH, and 10 µl of petroleum. The plates were incubated at 30 °C, and the evaluations were performed every 12 hours until the color of the medium changed, from blue (oxidized) to colorless (reduced), indicating a positive result (Hanson et al., 1993; Bidoia et al., 2010).

Quantitative analysis

The quantitative assay was performed in 250 mL Erlenmeyer flasks, in triplicate, incubated at 30 °C at 180 rpm in an orbital shaker (Thermo Scientific MaxQ [™] 4000). Aliquots of 1 mL of the culture were collected to read the absorbance at 600 nm in a UV-VIS (Thermo spectronic Biomate 3) spectrophotometer at 24, 48 and 72 hour intervals. For this test, the DCPIP solution was prepared in the concentration of 1 g.L⁻¹ in sterile BH medium. The composition of this assay is shown in Table 1.

Table 1. Composition of the quantitative assay.

Test	Composition	BH	DCPIP	Petroleum	AM07	H ₂ O
Control 0	BH	90.000 mL	-	-	-	10.000 mL
Control 1	BH + DCPIP	90.000 mL	4.761 mL	-	-	5.239 mL
Control 2	BH+DCPIP+Petroleum	90.000 mL	4.761 mL	0.595 mL	-	4.644 mL
Control 3	BH+DCPIP+AM07	90.000 mL	4.761 mL	-	2.380 mL	2.859 mL
Inoculum	BH+DCPIP+Petroleum+AM07	90.000 mL	4.761 mL	0.595 mL	2.380 mL	2.264 mL

The quantitative analysis was performed by reading the absorbance, converted to mg of DCPIP, using the standard curve ($R^2 = 0.9998$) (Figure 1), according to Equation 1: $[DCPIP] = (Abs_{600} + 0.0037) / 0.0154$ where: $[DCPIP]$ = concentration of redox indicator DCPIP in mg. L⁻¹; Abs_{600} = absorbance of the sample at wavelength 600_{nm}. The standard curve was drawn from five dilutions of the DCPIP indicator in BH broth, which were read (Abs_{600} nm) on a UV-VIS (Thermo spectronic Biomate 3) spectrophotometer (Table 2).

Table 2. Absorbance readings at 600_{nm} and dilutions of redox indicator DCPIP.

Erlenmeyer Flasks	Volume (mL)			[DCPIP] (mg.L ⁻¹)	Abs _{600 nm} u.a
	BH	DCPIP [1 g.L ⁻¹]	H ₂ O		
0	90.000	0.000	10.000	0.000	0.0000
1	90.000	0.595	9.405	5.950	0.0880
2	90.000	1.190	8.810	11.900	0.1730
3	90.000	2.380	7.620	23.800	0.3620
4	90.000	3.571	6.429	35.710	0.5490
5	90.000	4.761	5.239	47.610	0.7270

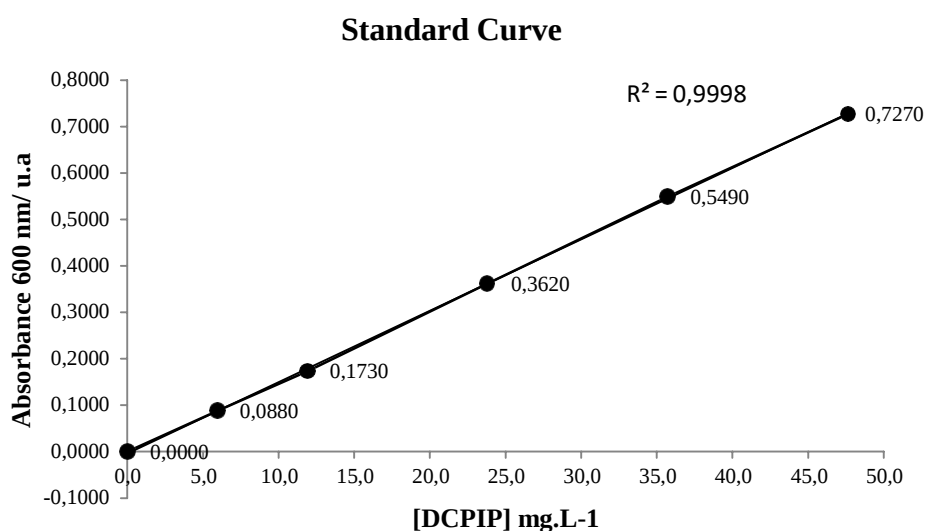


Figure 1. Standard curve [DCPIP].

Biochemical characterization of bacterial isolate

The bacterial isolated was characterized according to its morphology, tinctorial property, and then submitted to biochemical tests having as base Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt, Krieg, Sneath, Staley, & Williams, 1994).

Amplification, sequencing and phylogenetic analysis of rRNA 16S gene

A bacterial pre-inoculum from pure culture was inoculated in 20 ml of nutrient broth (HIMEDIA™) at 35 °C, at 150 rpm overnight. The isolation and purification of DNA genomic was made based on extraction kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, from Invitrogen™, using 3 mL of bacterial culture, according to the manufacturer's instructions. The reaction of amplification was performed by using primers 530F (5'-TGACTGACTGAGTGC CAGCMGCCGCGG-3') and 1495R (5' TGACTGACTGAGAGCTCTACCTTGTTA-3). The total volume of the reaction was 25 µL having (2.5 µL MgCl₂ [25 mM], 2.5 µL dNTPs [2.5 mM]; 2.0 µL of each primer [5 pMol.µL⁻¹]; 0.3 µL of *Taq* DNA polymerase [5 U.µL⁻¹]; 2.5 µL of buffer 10X). The amplification took place during 35 cycles in Thermal Cycler, Veriti® 96-Well - Applied Biosystems. The thermal profile from the reaction of PCR constituted of denaturation of initial cycle at 95 °C per 1 minute; followed by 35 cycles to 95 °C for 40 seconds, annealing of primers at 58 °C for 40 seconds, and polymerization at 72 °C for 40 seconds (35 cycles); and at final extension step at 72 °C for 7 minutes. For the sequencing of amplicon, it was used the sequencing kit named BigDye® Terminator v3.1 in a capillary sequencer (model 3500 ABI PRISM® Genetic Analyzer, Applied Biosystems). The sequences generated were treated in programs phred/phrap (Ewing, Hillier, Wendl, & Green, 1998) and CAP 3 available in <http://www.biomol.unb.br/phph/>, and then, the sequences were analyzed in the program BLASTn National Center for Biotechnology Information -NCBI. The phylogenetic analysis was undertaken based on the evolution distances calculated by algorithms Neighbor-Joining and Jukes-Cantor, by using the program MEGA 7.0. After the building of the phylogenetic tree, it is possible to determine the taxonomical position of the isolate in relation to the species whose corresponding sequences were obtained in NCBI (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016; Felsenstein, 1985).

RESULTS AND DISCUSSION

The biodegradability test using DCPIP is a low complexity and low-cost test with proved efficiency by different authors, which highlight the important role of this indicator in the detection of microorganisms, such as fungi, bacteria and yeasts with the potential for degrading petroleum and derivatives (Hanson et al., 1993; Bidoia et al., 2010; Luz, et al., 2011; Mariano, Bonotto, De Angelis, Pirôllo, & Contiero, 2008). When selecting microorganisms with the purpose of using them in bioremediation processes, the DCPIP assay allows the confirmation of the degradation capacity, and in this study, the degradation activity of the bacterial strain AM07 can be observed in the qualitative test, after 16 hours of incubation (Figure 2). The quantitative test of the biodegradability of petroleum, carried out by absorbance readings, showed a reduction in the concentration of DCPIP due to the degrading activity of the bacterial strain AM07 after 24 hours of incubation (Figure 3, Table 3). The controls were stable due to the lack of carbon source and/or bacterial inoculum. The results obtained represent a remarkable activity when compared to the results described in Varjani and Upasani, (2013). The authors tested the efficiency of the use of petroleum by 69 bacterial strains isolated from enrichment of soil samples. Among the isolates tested, fifteen strains discolored the medium, and six strains recorded the shortest discoloration time of the medium in 120 hours, out of a total of 144 hours. Afuwale and Modi (2012) found hydrocarbon degradation in seven of the 36 bacterial isolates tested, and two of these completely discolored the DCPIP containing medium.

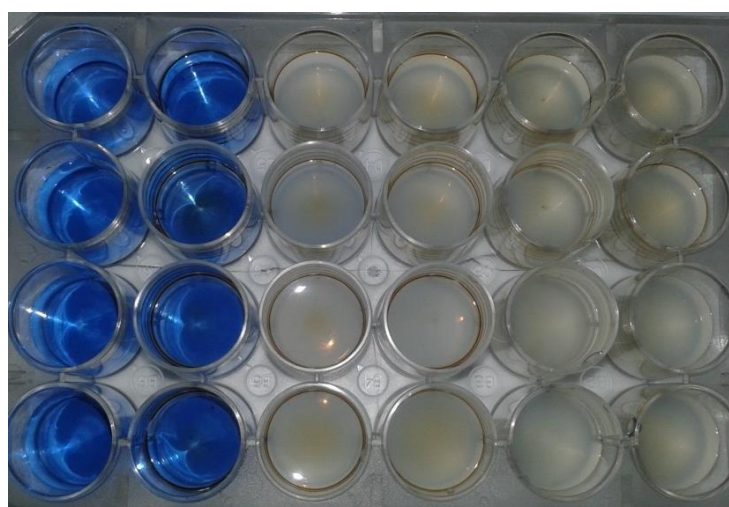


Figure 2. Biodegradation test with DCPIP - plate after 16 hours of incubation.

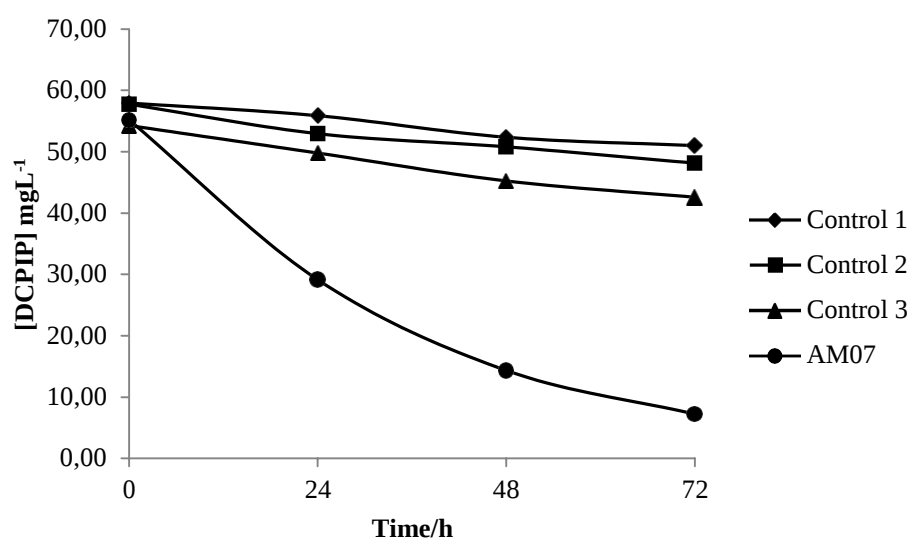


Figure 3. Concentration of DCPIP as a function of time.

Table 3. DCPIP Concentrations.

Time/h	Control 1	Control 2	Control 3	AM07
0	57.97	57.77	54.27	55.20
24	55.89	52.97	49.79	29.16
48	52.38	50.82	45.24	14.35
72	51.02	48.16	42.58	7.23

The bacterial isolate showed Gram-positive staining, endospore formation, cell diameter > 1µm, hydrolysis in the starch tests , positive Voges-Proskauer reaction, motility, positive activity for catalase, and its growth patterns in blood agar presented the β-hemolytic pattern. In view of the presented results, the microorganism was classified as *B. cereus*. To confirm the species, the 16S rRNA gene was sequenced, which classified the microorganism as belonging to *B. toyonensis* species with 99% identity and 100% coverage when compared to the *B. toyonensis* sequence (BCT-7112) available in the database from GenBank. The nucleotide sequence was deposited on GenBank as *B. toyonensis* AM07 under accession number KX686603. In order to confirm the taxonomic position of this strain, the phylogenetic analysis of the MEGA 7.0 program (Felsenstein, 1985; Kumar, et al., 2016; Saitou, & Nei 1987), aligning the 16S rRNA gene sequence of the strain isolated in this study, *B. toyonensis* AM07, along with eight other sequences of the 16S rRNA gene, obtained in Genbank, from different species belonging to the genus *Bacillus*. The phylogenetic analysis showed that the sequence belonging to the strain isolated in this study, KX686603 *B. toyonensis* AM07, grouped with robustness to the strain 972704713 in LN995772.1 *B. toyonensis*, presenting 100% bootstrap, when compared to the sequences of the other species belonging to the Group *B. cereus*, as shown in Figure 4.

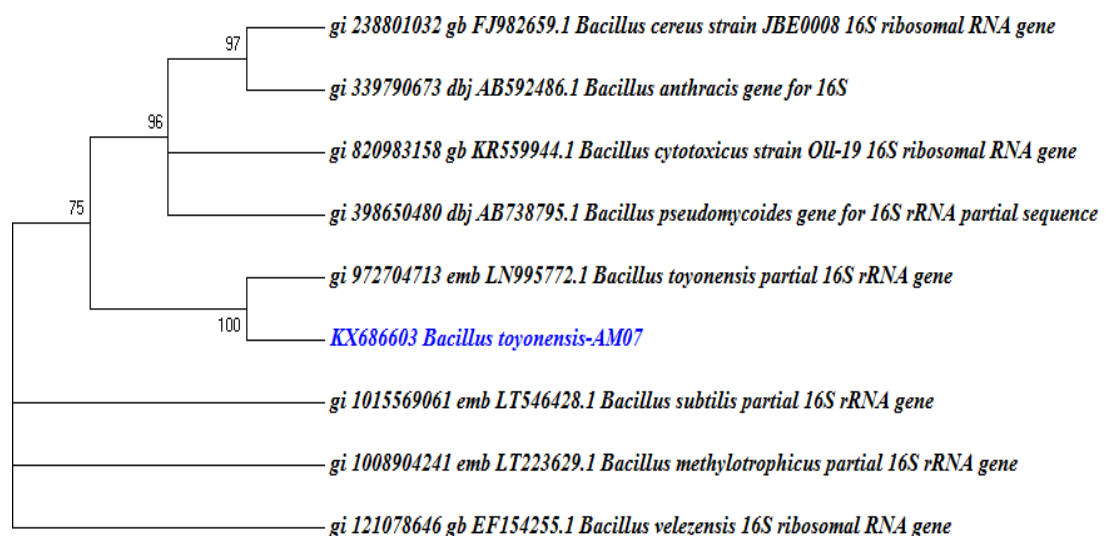


Figure 4. Phylogenetic analysis of the species *B. toyonensis* AM07 by using partial sequences from gene rRNA 16S bacterial strains from the GenBank-NCBI.

Species belonging to the genus *Bacillus* isolated from different environments have often been described as degrading hydrocarbons (Darsa et al., 2014; Sorkhoh et al., 1993). Rajasekar et al. (2007) reported the biodegradation of diesel oil and manganese oxidation by *B. cereus*. Bidoia et al. (2010) verified the potential of isolated strain of *B. subtilis* in degrading lubricating oil, using the DCPIP colorimetric method. Liu, Liu, Ju, Li, and Yu (2016) isolated strains belonging to the species *B. licheniformis* that demonstrated their ability to degrade petroleum and produce biosurfactant. Kreischer and Silva (2017) isolated *B. toyonensis* from soil samples contaminated with agrochemicals and verified the production of biosurfactant. The production of biosurfactant by microorganisms is of paramount importance in the process of biodegradation, as it assists in emulsification, reducing recalcitrance and facilitating the oxidation of hydrocarbons. The present study carried out a preliminary analysis that verified by the colorimetric method with the redox indicator DCPIP the potential of *B. toyonensis* in degrading petroleum, however no previous records of the association of this related species degradation of this carbon source were found.

CONCLUSION

The present study demonstrated, through the colorimetric method with DCPIP indicator, the potential of the *B. toyonensis* strain isolated from an effluent dike, to use petroleum as a single source of carbon with the possibility of using this strain in remediation technologies of environments impacted with hydrocarbons.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), to the Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES) and to the Research Foundation of the State of Amazonas (FAPEAM), for the financial support. The authors are also grateful to the Federal University of Amazonas (UFAM) / Program of Post-Graduation in Biodiversity and Biotechnology of Legal Amazonia (BIONORTE).

REFERENCES

Adewale, A. M., Goh J. K., Lim S. P., & Ting A. S. Y. (2015). Antimicrobial and enzymatic activities of endophytic bacteria isolated from *Mentha spicata* (MINT). *Malaysian Journal of Microbiology*, 11(2):102-108.

Afuwale, C., & Modi H.A. (2012). Study of bacterial diversity of crude oil degrading bacteria isolated from crude oil. *Life Sciences Leaflets*,6:13-23.

Bidoia, E. D., Montagnolli R.N., & Lopes P.R.M. (2010). Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. *Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 3(290-295):1277-88.

Bujang, M., Ibrahim, N. A., & Eh Rak, A. (2013). Biodegradation of oily wastewater by pure culture of *Bacillus cereus*. *ARPJ Journal of Agricultural and Biological Science*, 8 (2): 108-115.

Darsa, K. V., Thatheyus, A. J., & Ramya, D. (2014). Biodegradation of petroleum compound using the bacterium *Bacillus Subtilis*. *Science International*, 2(1):20-5.

Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, 1-13.

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M., & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces usingPhred. I. Accuracy assessment. *Genome research*, 175-85.

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4):783-91.

Hanson, K. G, Desai, J. D., & Desai, A. J. (1993). A Rapid and Simple Screening Crude Oil Degrading Technique for Potential Microorganisms. *Biotechnology Techniques*,7(1):745-8.

Holt, J. H., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J.T., & Williams, S. T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology ninth edition*. Baltimore:

Williams & Wilkins. Maryland, USA.

Jiménez, G., Urdiain, M., Cifuentes, A., López-López, A., Blanch, A. R., Tamames, J., ... Rosselló-Mora, R. (2013). Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(6):383-91.

Jiménez, G., Blanch, A. R., Tamames, J., & Rosselló-mora, R. (2013). Complete Genome Sequence of *Bacillus toyonensis* BCT-7112 T , the Active Ingredient of the Feed Additive Preparation Toyocerin. *Genome Announcements*, 1(6):1-2.

Jukes, T. H., & Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. *Mammalian Protein Metabolism*, 21-123.

Kubota, K., Koma, D., Matsumiya, Y., Chung, S. Y., & Kubo, M. (2008). Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbon-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-degradation by the 2,6-DCPIP assay. *Biodegradation*, 19(5):749-57.

Kreischer, A. C., & Silva, L. P.. (2017). Bioprospecção de bactérias produtoras de biossurfactantes a partir de solo contaminado por agrotóxicos. *Revista Eletrônica Estácio Saúde*, 6 (1):35-46.

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7):54.

Liu, B., Liu, J., Ju, M., Li, X., & Yu, Q. (2016). Purification and characterization of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* Y-1 and its application in remediation of petroleum contaminated soil. *Marine Pollut Bulletin*, 107: 46-51.

Luz, C. C., Santos, E. A., Santos, M. O. S., Mussy, M. Y., Yamashita, M., & Bastos, W. R. (2011). Estudos de biodegradação de óleo diesel por consorcio microbiano coletado em Porto Velho- Ro, Amazônia. *Quimica Nova*, 34(5):775-9.

Mariano, A. P., Bonotto, D. M., De Angelis, D. D. F., Pirôllo, M. P. S., & Contiero, J. (2008). Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1):133-42.

Olajire, A. A., & Essien, J. P. (2014). Aerobic Degradation of Petroleum Components by microbial Consortia. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 5(5):1-22.

Okaiyeto, K., Nwodo, U. U., Mabinya, L. V., & Okoh, A. I. (2015). *Bacillus toyonensis* strain AEMREG6, a bacterium isolated from South African marine environment sediment samples produces a glycoprotein biofloculant. *Molecules*, 20(3):5239-59.

Rajasekar, A., Babu, G., Pandian, S. K., Maruthamuthu, S., Palaniswamy, N., & Rajendran, A. (2007). Biodegradation and corrosion behavior of manganese oxidizer *Bacillus cereus* ACE4 in diesel transporting pipeline. *Corrosion Science*, 49 (6): 2694-2710.

Sorkhoh, N. A., Ibrahim, A. S., Ghannoum, M. A., & Radwan, S. S. (1993). High-temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-polluted Kuwaiti desert. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39(1):123-6.

Saitou, N., & Nei, M. (1987) The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4):406-25.

Varjani, S., & Upasani, V. (2013). Comparative studies on bacterial consortia for hydrocarbon degradation. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 2(10):5377-83.

CAPÍTULO III

**Biodegradation of polycyclic
aromatic hydrocarbons by
Candida mesorugosa native to the
Brazilian Amazon**

Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Candida mesorugosa* native to the Brazilian Amazon

**Ferdyanne Beatriz Sabóia Peixoto¹, Jean Charles da Cunha Peixoto²,
Enedina Nogueira de Assunção¹, Hiléia dos Santos Barroso³, Adolfo José
Mota⁴, Ieda Hortêncio Batista⁴, Samara Ferreira Santos⁴, José Odair
Pereira⁴, Spartaco Astolfi-Filho¹**

¹ Centro de Apoio Multidisciplinar, Universidade Federal do Amazonas, 69.080-900 Manaus - AM Brazil. ² Departamento de Parasitologia, Universidade Federal do Amazonas, 69.080-900, Manaus, Amazonas, Brazil. ³ Escola superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, 69065-001 Manaus, Amazonas, Brazil. ⁴ Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, 69.080-900 Manaus - AM Brazil. Correspondence should be addressed to Jean Charles da Cunha Peixoto; jean.metagenoma@gmail.com.

ABSTRACT

The search is ongoing for new strains of microorganisms with potential to degrade recalcitrant petroleum compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Hydrocarbon degrading yeasts have been isolated from several sources, including impacted or pristine terrestrial and marine environments. The objective of this work was to evaluate the capacity of the *Candida mesorugosa* AM15 strain, isolated from the Urucu-AM Petroleum Province Effluent Pond, to degrade PAHs in diesel oil. The degrading activity of the isolate was verified by qualitative methods using the redox indicator 2,6-dichlorophenol Indophenol-DCPIP, and by quantitative analysis using gas chromatography and mass spectrometry. The strain was identified as *C. mesorugosa* based on the sequences of the polymorphic regions ITS1/ITS2 and D1/D2 on the 28S rRNA gene, and according to the size polymorphism of the restriction fragments generated by PCR and RFLP. This yeast was able to grow

in a minimal volume of petroleum medium, and in the qualitative assay with DCPIP indicator color change occurred in less than 24 hours. GC-MS analysis showed that the strain degraded 79.4% of the PAHs present in the diesel over the 21-day study period. These results demonstrate the potential of *C. mesorugosa* strain AM15 for bioremediation of environments impacted by petroleum residues and derivatives.

KEYWORDS: Degradation, GC-MS, Petroleum, Bioremediation, Yeast, DCPIP.

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous organic compounds which occur naturally and as a result of anthropogenic activity. PAHs are extremely toxic, mutagenic and carcinogenic pollutants which are of global concern due to potential harmful impacts upon humans, animals, and the environment [1-5]. Among the available and well established technologies used to restore environments impacted by PAHs, bioremediation has proven to be highly effective method with good outcomes in terms of cost-benefit balance [6,7]. Biodegradation of PHAs occurs due to compound hydrophobicity and high dissolution in water; the lower the molecular weight of the PAH, the more easily it will be degraded. However, higher molecular mass yields lower solubility and higher stability, and thus a more recalcitrant compound [8,9].

Much effort has been expended towards the search for new strains of microorganisms with potential to degrade recalcitrant petroleum compounds such as PAHs. In recent years, yeasts capable of metabolizing hydrocarbons to acquire carbon and energy have been isolated from various terrestrial and marine environments, both anthropogenically impacted and pristine [4,9,10]. MacGillivray and Shiaris [11] evaluated the capacity of *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, and *Trichosporon* yeasts isolated from coastal sediments for degrading HPAs. Hassanshahian et al. [12] reported the capacity of a *Yarrowia lipolytica* strain to efficiently degrade and oxidize petroleum hydrocarbons. Gargouri et al. [13] found lineages of the genera *Candida* and *Trichosporon* isolated from industrial refinery effluents capable of degrading phenanthrene, anthracene, and fluoranthene. According to Wongsat et al. [14] and Mishra et al. [15], PAHs are more resistant to biodegradation than aliphatic

compounds, creating a major challenge for establishment of an effective bioremediation model. The objective of this work was to evaluate the capacity of the *Candida mesorugosa* AM15 strain isolated from an effluent pond in the Petroleum Province of Urucu, Coari, Amazonas State (AM) to degrade PAHs in diesel oil.

2. Materials and Methods

2.1 Study Area

The study area surrounds the Petroleum Province of Urucu in the municipality of Coari, AM, Brazil, which is 653 km directly southwest of the city of Manaus (4°30' S, 64°30' W). Water samples were collected from the effluent pond (S 04°51'50.4" / W 065°18'00.3"). Samples were taken at a depth of 50 cm at the edge of the pond, and at a depth of 2 meters in the center of the pond. The samples were conditioned in previously sterilized glass bottles and kept refrigerated in thermal boxes during transfer to the Urucu/Coari Petroleum Province. Processing was done at the Laboratory of recombinant DNA Technology at the Federal University of Amazonas (UFAM) in Manaus.

2.2 Enrichment and isolation

The *Candida mesorugosa* AM15 strain was isolated from water samples enriched with Buschnell Haas medium (BH) (Difco™) and petroleum in the following proportions: 10 mL water sample, 90 mL BH, and 1% petroleum (in 250 mL sterile Erlenmeyer flasks). The flasks were incubated at 300 °C in a rotary shaker at 180 rpm for 21 days. Isolation was performed in Petri dishes containing minimal BH medium plus 1% petroleum. The pure colonies were selected and seeded in potato agar dextrose (BDA) medium (HIMEDIA™). The petroleum used in the experiments came from the Urucu Petroleum Production Base. The petroleum was sterilized by membrane filtration (0.22 µm millipore™) prior to use.

2.3 Biodegradation assay using DCPIP

The isolated yeasts were subjected to a qualitative biodegradation test as described by Hanson et al. [16]. For the DCPIP assay, 24-well plates were

prepared with 10 μ L of petroleum, 1.5 mL BH medium, 1.5 μ g DCPIP allocated to each well. Standardized microbial culture (25 μ L) was then inoculated at a wavelength of 600_{nm} (10^9 cells/mL) with cell density (D0) = 1.0. Sterile distilled water (25 μ L) was used as a negative control. Plates were kept at 30 °C in a B.O.D incubator and observed until color changed from blue (oxidized) to colorless (reduced), indicating the degrading potential of the isolate. The same procedure was repeated using commercial diesel oil.

2.4 Molecular Identification and phylogenetic analysis

Yeasts identification was accomplished using restriction fragment length polymorphism [17], followed by confirmation through sequencing of the ITS1/ITS2 polymorphic regions and the D1/D2 polymorphic domains located on the 26S rRNA gene. Genomic DNA was prepared using the Plant/Fungi DNA Isolation Kit (NORGEN BIOTEK CORP™). PCR was performed using the Platinum Taq DNA Polymerase Kit (Invitrogen by Thermo) and PCR products were purified using PuriLink (R) PCR Purification Kit (Invitrogen). The sequencing reaction was performed with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems by Thermo), and the sequences were determined using the ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems by Thermo). The primers used in both PCR and sequencing were: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG) [18], and Uni-R (5' GGTCCGTGTTTCAAGACG) [19]. Sequence editing and assembly of the contigs were performed using the SeqManPro™ program (DNAS[®]Star^(R)). The search for species-level similarity in the INSDC databases was carried out using BLAST program (BLASTn) available at the *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model [20]. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates was taken to represent the evolutionary history of the analyzed taxa [21]. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. A

discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 0.3465)). The analysis involved 10 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 2460 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6 [22].

2.5 Biodegradation assay for PAHs

The assays to evaluate the biodegradation of PAHs in diesel oil (naphthalene, 2-methyl naphthalene, 1-methyl naphthalene, dimethyl naphthalene, trimethyl naphthalene, and phenanthrene) were conducted in 125 mL Erlenmeyer flasks containing 40 mL of BH medium supplemented with 1% commercial diesel oil and 1 mL standard inoculum at 600 nm wavelength (10^9 cells/mL), cell density OD = 1.0. The experiments were performed in triplicate and incubated at 30 °C at 150 rpm. The degrading activity of the AM15 strain was evaluated and quantified after 7, 14, and 21 days.

2.5.1 Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)

PAH extraction was performed using methylene chloride and hexane. Briefly, 50 mL of methylene chloride and hexane solution was added to each flask. The material was transferred to a 125 mL separatory funnel and subjected to vigorous agitation for 1 minute. The organic phase was collected and the aqueous phase was extracted twice more by addition of 50 mL methylene chloride and hexane solution. The end of the extraction was monitored by thin layer chromatography (TLC). Anhydrous sodium sulfate was added to the collected organic phase, and after filtration the samples were subjected to vacuum roto-evaporation at 40 °C until sample volume was reduced to approximately 25 mL. The sample was then transferred to 1 mL vial containing 20 µg of the internal standard. One µL of the sample was injected into the GC/MS.

2.5.2 Analysis of biodegradation data

The internal standard was fluoranthene-d10 (Flu-d10) and surrogate solution was phenanthrene-d10 (Phe-d10) and naphthalene d8 (Nap-d8) with

purity $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, 98 %), solubilized in hexane grade HPLC. The internal standard (Flu-d10) was inserted into the samples and diluted in a volumetric flask before injection into the GC-MS. The surrogate solution (Phe-d10 and Nap-d8) was added to the samples before beginning the extraction process. These methods are used to realize possible losses during the extraction process. The chromatographic areas of the analytes were corrected by extraction recovery rate, obtained by the following formula: $[CA_s/CA_{is}] \times 100$, where CA_{is} is the chromatographic area of the internal standard, and the CA_s is the chromatographic area of the surrogate. The fraction analyzed in the diesel were aromatic hydrocarbons (PAH), and the main analytes were: naphthalene, 2-methyl naphthalene, 1-methyl naphthalene, dimethyl naphthalene, trimethyl naphthalene and phenanthrene. Analyte concentrations were obtained from a calibration curve using different concentrations of a mix of PAH standard (Sigma-Aldrich): 50, 55, 60, 65, 70 and 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The degradation percentage for PAH in the diesel was calculated by the sum of the analytes (ΣPAH), using the following formula: $[(CD - CS) / CD] \times 100$, where CD is the PAH concentration of the diesel in the control group, and CS is the concentration of PAH of the diesel obtained in the sample after the experiment. Finally, the mean and standard deviation of the biodegradation rate were calculated.

2.5.3 GC-MS analysis

Analyses were performed on a gas chromatograph (Shimadzu 2010) (Tokyo, Japan) coupled to a mass spectrometer (Shimadzu QP 2010 Plus) and equipped with a Restek fused silica capillary column (RTX-5MS 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) (Bellefonte, PA, USA). The injector temperature was 270 $^{\circ}\text{C}$ and was in the *splitless* injection mode, with helium as a carrier gas at a rate of 1.56 mL min^{-1} . Mass fragments were recorded by selective ion monitoring (SIM). The ions used were as follows: naphthalene (m/z 228, 227), 2-methyl naphthalene (m/z 142, 141), 1-methyl naphthalene (m/z 142, 141), dimethyl naphthalene (m/z 156, 141), trimethyl naphthalene (m/z 170, 155), and phenanthrene (m/z 178, 179). The GC temperature program started at 40 $^{\circ}\text{C}$ for 1 minute, followed by a heating rate of 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ until reaching 60 $^{\circ}\text{C}$, then a heating rate of 5 $^{\circ}\text{C}$

min⁻¹ until reaching 260 °C, and finally 10 °C min⁻¹ until reaching 280 °C, where it remained for 1 minute.

3. Results

3.1 Biodegradation assay using DCPIP

This assay demonstrated that the AM15 strain of *C. mesorugosa* (GenBank accession no. KY464166) was able to metabolize hydrocarbons present in both petroleum and diesel. The change in DCPIP from blue to colorless indicated degradation activity after 16 hours of incubation at 30 °C for petroleum, and after 10 hours for diesel.

3.2 Molecular Identification and phylogenetic analysis

Due to the phenotypic plasticity commonly observed in yeasts, we identified the AM15 isolate using a two-step process. First, we verified the size polymorphism of the fragments generated by the *DdeI* enzyme from 2,622 bp amplicons containing part of the 18S and 28S rRNA genes, the full sequence of 5.8S rRNA gene, and the complete sequence of ITS1 and ITS2. The restriction pattern is identical to the pattern of *Candida mesorugosa* L96D (Figure 1).

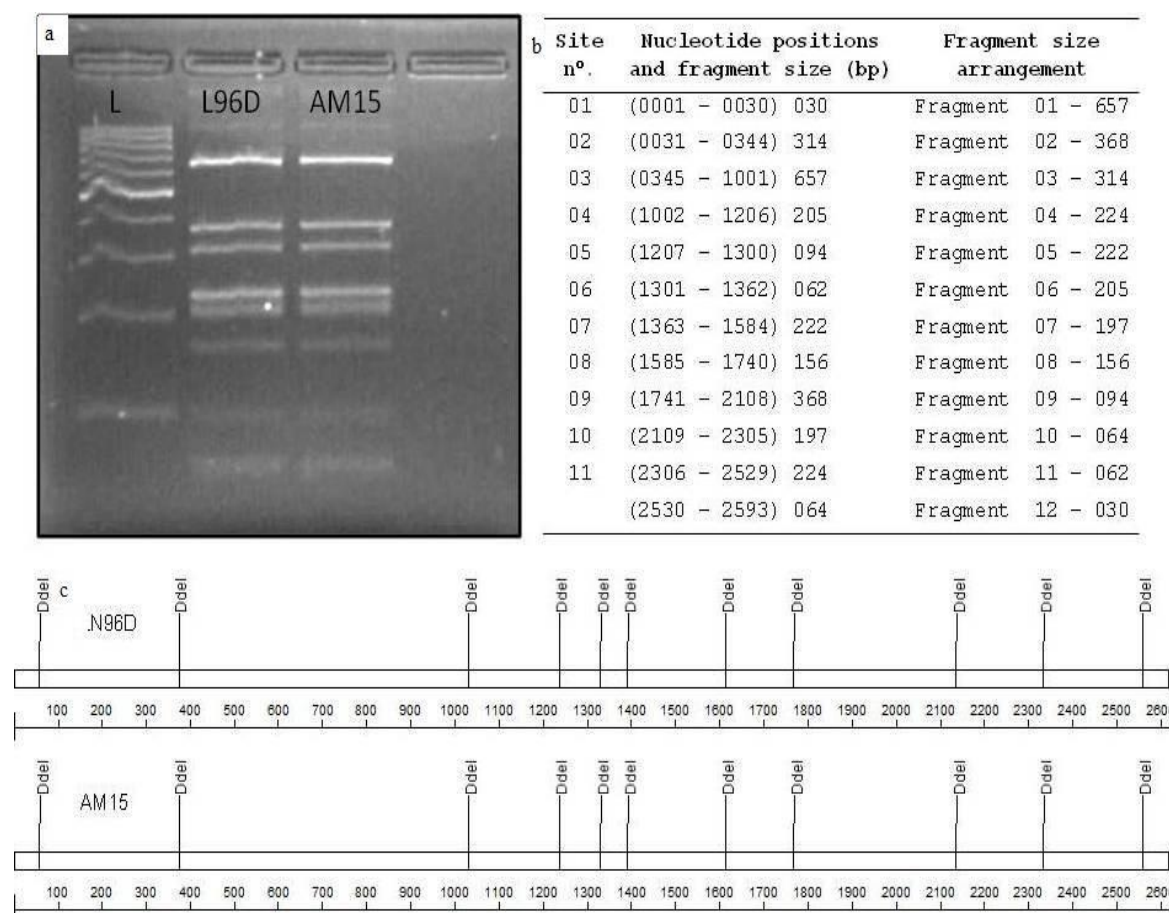


FIGURE 1: PCR-RFLP yeast identification method. The 2,622 bp was digested with the *Ddel* restriction enzyme and produced the same pattern as *Candida mesorugosa* L96D (**a**). The arrangement of restriction fragments in the 2% agarose gel can be compared with the *in silico* prediction table (**b**). Fragments 222 and 224 are collapsed, as well as fragments 205 and 197 due to having similar sizes. In (**c**) the restriction map shows the position of the 11 cut sites of *Ddel*. L 100 bp DNA Ladder.

Second, the same 2,622 bp amplicon was sequenced and revealed a 99% identity with the L96D sequence (Figure 2). The nucleotide sequence of the AM15 isolate was deposited in GenBank as *Candida mesorugosa*-AM15 under accession number KY464166. Phylogenetic analysis confirmed that the strain is associated with the *Candida rugosa* group, forming a clade with *Candida mesorugosa* L96D (Figure 3).

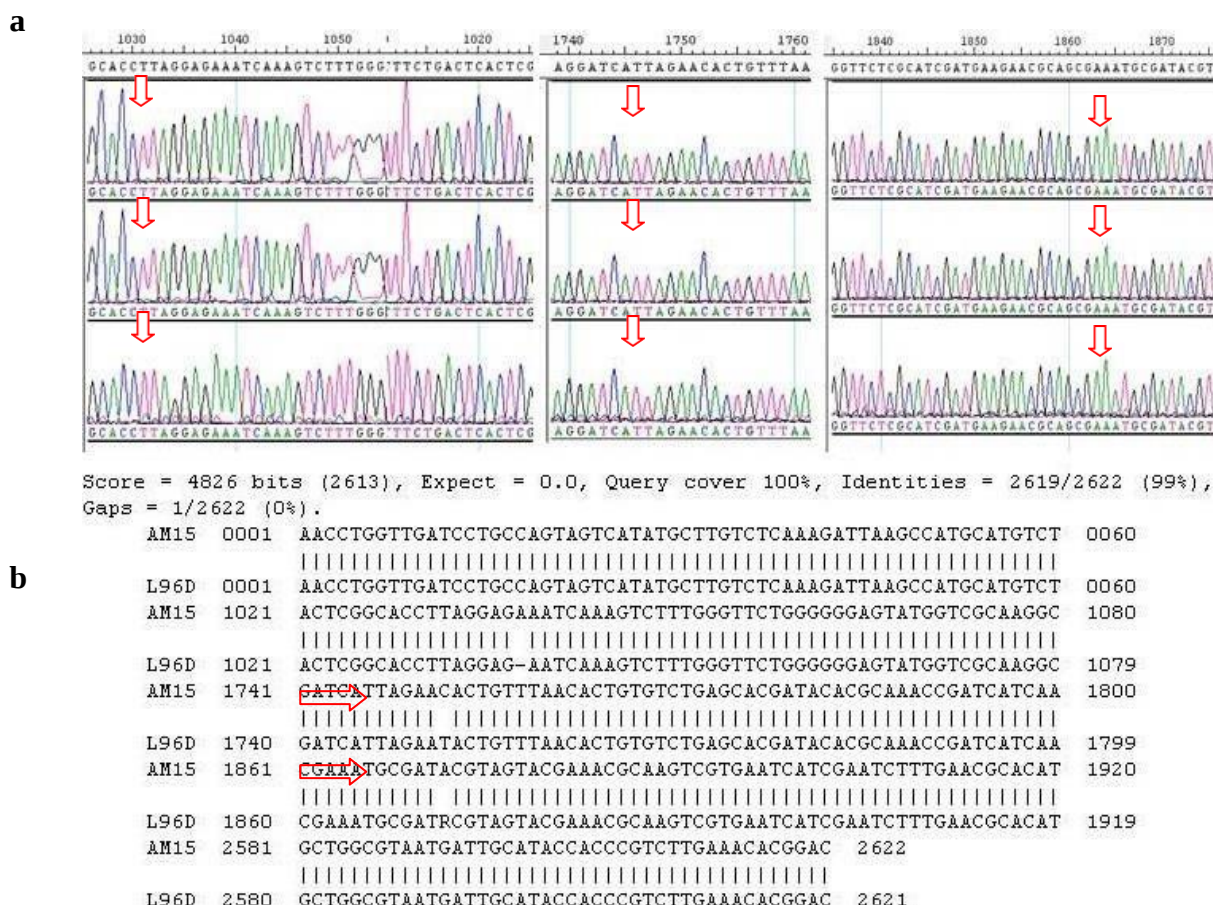


FIGURE 2: Sequence analyses. The 2,622 bp amplicon was sequenced using the Sanger method and the sequence alignment showed 3 SNPs, indicated by red arrows. (a) Eletropherogram showing the position of the SNP observed in (b) the blast2sequence analyses. Numbers represents the position of each nucleotide in the sequence.

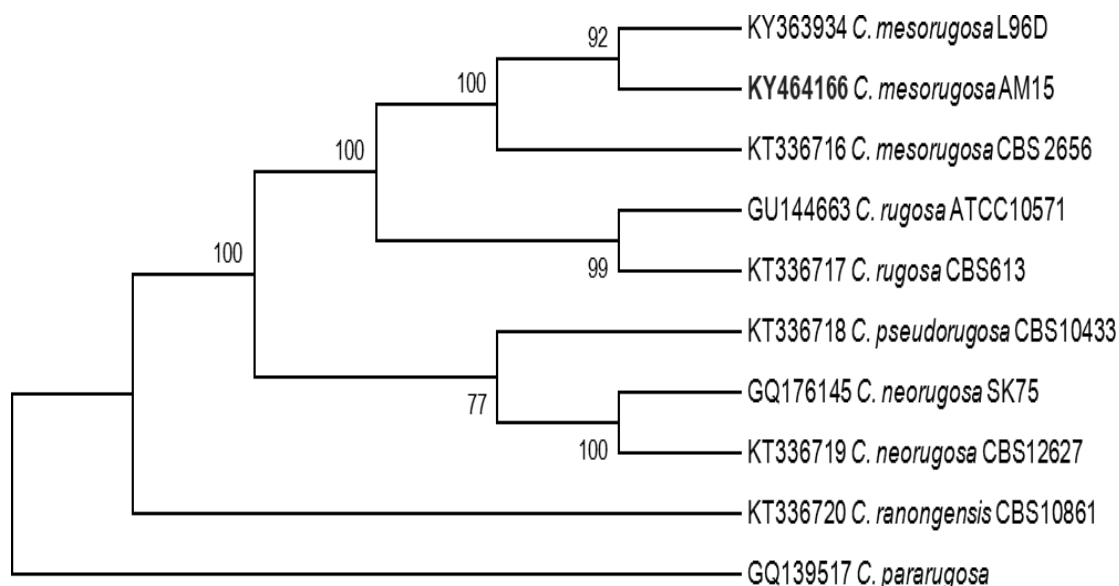


FIGURE 3: Molecular phylogenetic analysis. The evolutionary history was inferred by using the maximum likelihood method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test are shown next to the branches. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 2,460 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6.

3.3. Quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (HPAs)

GC-MS analysis revealed that *C. mesorugosa* AM15 was able to degrade PAHs in diesel oil, including naphthalene, 2-methyl naphthalene, 1-methyl naphthalene, dimethyl naphthalene, trimethyl naphthalene, and phenanthrene. The total degradation rate presented by the lineage was $21.8 \pm 3.8\%$ after seven days, $72.3 \pm 6.3\%$ after 14 days, and $79.4 \pm 2.2\%$ after 21 days (Figure 4 AB). Figure 5 shows the PAH degradation spectrum of diesel by *C. mesorugosa* AM15 over 14 days.

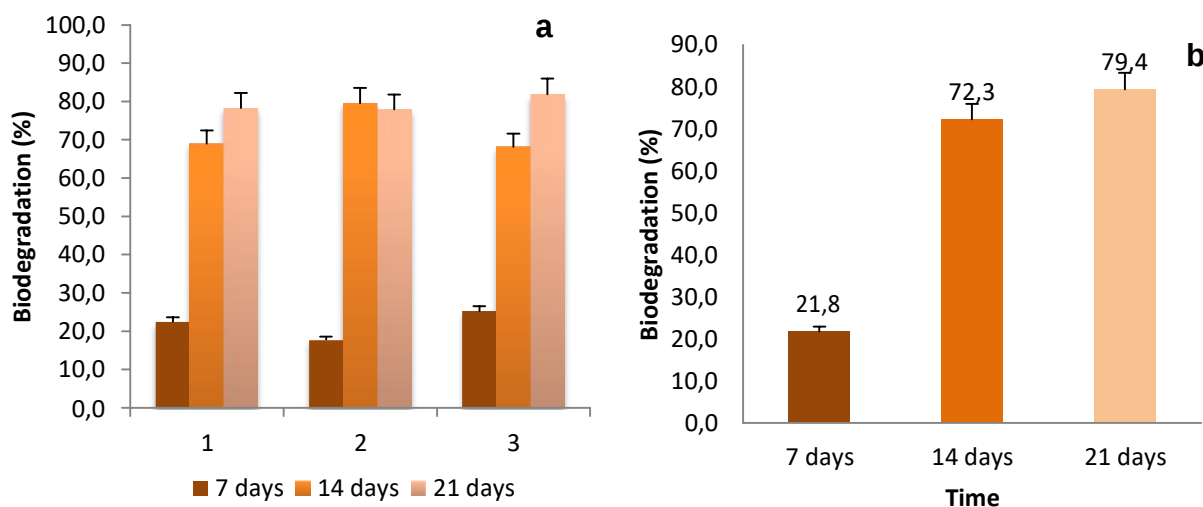


FIGURE 4: Biodegradation of PAH from diesel 3 - naphthalene, 2 - methyl naphthalene, 1 - methyl naphthalene, dimethyl naphthalene, trimethyl naphthalene, and phenanthrene by the *Candida mesorugosa* line, strain AM15 (a) Individual biodegradation rates by replicate. (b) Percentage of total PAH degradation.

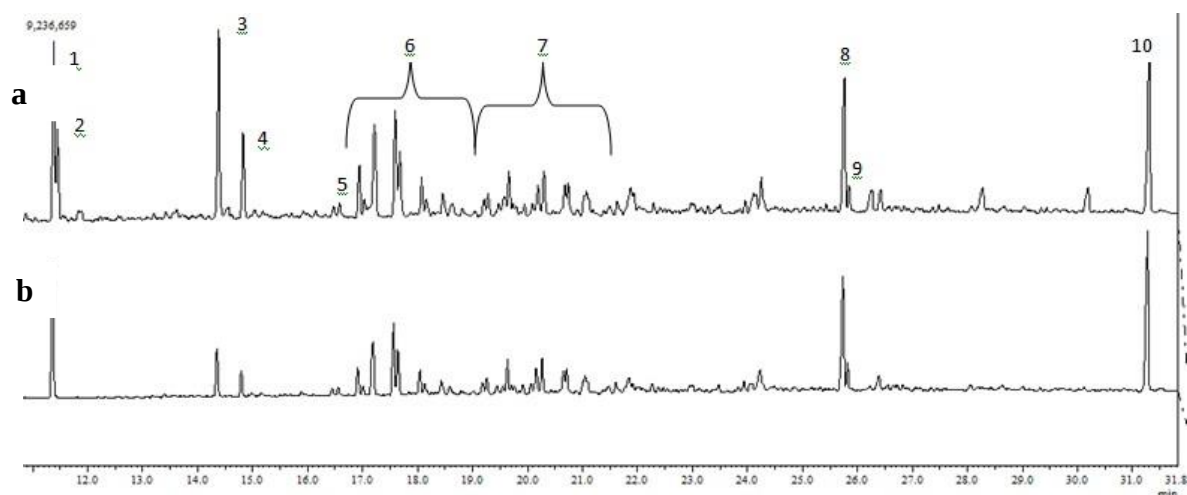


FIGURE 5: a) Reaction controls. Numbered chromatographic peaks correspond to the following compounds: 1) Naphthalene D-8 * (Surrogate); 2) Naphthalene; 3) 2-methylnaphthalene; 4) 1-methylnaphthalene, 5) Biphenyl; 6) Alkylnaphthalenes; 7) Trimethylnaphthalenes 8) Phenanthrene D-10 * (Surrogate); 9) Phenanthrene; 10) Fluoranthene D-10 * (Internal Standard). D-8

and D-10 *: Deuterated Compounds. b) Mass Spectrum demonstrating the degradation of PAHs by *C. mesorugosa* AM15 after 14 days of incubation

4. Discussion

Several approaches have been adopted for selection of microorganisms to metabolize recalcitrant compounds in petroleum and its derivatives [13,16,23-25]. Preliminary selection using DCPIP allowed evaluation of the potential of the isolated *C. mesorugosa* AM15 to degrade hydrocarbons. The colorimetric method in this study has been used by other authors as a preliminary test for selection of degrading microorganisms, because it is a low cost, qualitative approach [16,23,25,26]. The speed with which a certain number promotes a color change during the experiment defines the capacity of degradation. The *C. mesorugosa* AM15 lineage showed change in DCPIP color after 14 hours of incubation when using petroleum, and after 10 hours of incubation using diesel. Diesel is a product derived from the distillation of petroleum, and the consequent lower viscosity favors the entry of hydrocarbon degrading microorganisms; this causes color changes in DCPIP to occur faster than in petroleum. Comparison of our results with other studies indicate better degradation performance of *C. mesorugosa* AM15 compared to other isolates. For example, Ferrari et al. [27] report color change in DCPIP after three weeks of incubation with fungal isolates, while Lima et al. [28] reported DCPIP change with Amazonian fungi after 24 hours of incubation.

The genera *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula* and *Saccharomyces* have a broad diversity of species reported to be capable of PAH degradation [9,11,29-33]. However, the current study is the first to describe such activity in *C. mesorugosa* for PAH decomposition in petroleum and diesel. The species was first described by Chaves et al. [34] and was initially isolated from a hospital environment, which contrasts our methods of isolation from water samples drawn from the Urucu Petroleum Province effluent pond. The current study is also first report of this species in the Amazon biome. Although there are no previous reports of *C. mesorugosa* metabolizing PAH in petroleum and diesel in the literature, other species of the *Candida* genus have been described as hydrocarbon degraders, including *C. tropicalis*, *C.*

digboiensis, *C. viswanathii*, *C. catenulate*, and *C. ernobii* [4,24,35-38]. We demonstrated that *C. mesorugosa* AM15 was able to degrade a PAH mixture of naphthalene, 2-methylnaphthalene, 1-methylnaphthalene, dimethylnaphthalene, trimethylnaphthalene, and phenanthrene, with 21.8% total degradation in 7 days, 72.3% in 14 days, and 79.4% in 21 days (Fig. 4a,b; 5a,b). Gargouri et al. [13], Hesham et al [4], Sood & Lal [36], and Farag & Soliman [24] in studies of degradation efficiency for the different petroleum compounds, found rates in the same order of magnitude in lineages of *Candida* sp. [13] *C. viswanathii* [4], *C. digboiensis* [36], and *C. tropicalis* [24].

The results obtained in the present study demonstrate the potential of *C. mesorugosa* lineage AM15 to be used in bioremediation approaches for impacted environments with petroleum and derivatives. However, future mesoscale experiments that simulate impacted ecosystems should be conducted to analyze the performance of *C. mesorugosa* AM15 in an experimental design that is closer to the natural environment.

5. Conclusion

The *Candida mesorugosa* AM15 strain isolated in the present study has demonstrated efficiency in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel oil, and may be a promising resource for use in recovery projects involving petroleum and its derivatives in impacted areas of the Amazon region.

6. Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

7. Acknowledgements

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) for financial support. We also thank the Universidade Federal do Amazonas (UFAM) /Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Bionorte Network). We are

grateful to Alzira Frota and Vanderlei Sabóia for assistance with the extraction procedures and GC-MS.

8. References

- [1] Passarini MRZ, Sette LD, Rodrigues MVN. Improved extraction method to evaluate the degradation of selected PAHs by marine fungi grown in fermentative medium. *J Braz Chem Soc.* 2011;22(3):564-70.
- [2] Ting WTE, Yuan SY, Wu SD, Chang B V. Biodegradation of phenanthrene and pyrene by *Ganoderma lucidum*. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2011;65(1):238-42.
- [3] Haritash AK, Kaushik CP. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J Hazard Mater.* 2009;169(1-3):1-15.
- [4] Hesham AE, Alamri SA, Khan S, Mahmoud ME, Mahmoud M. Isolation and molecular genetic characterization of a yeast strain able to degrade petroleum polycyclic aromatic hydrocarbons. *African J od Biotechnol.* May, 2009;8(10):2218-23.
- [5] Stapleton RD, Savage DC, Sayler GS, Stacey G. Biodegradation of aromatic hydrocarbons in an extremely acidic environment. *Appl Environ Microbiol.* November, 1998;64(11):4180-4.
- [6] Olajire AA, Essien JP. Aerobic Degradation of Petroleum Components by Microbial Consortia. *J Pet Environ Biotechnol.* 2014;5(5):1-22.
- [7] Schippers C, Geßner K, Müller T, Scheper T. Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. *J Biotechnol.* October, 2000;83(3):189-98.

- [8] Ulrich Vasconcelos; Francisca P. França; Fernando J.S. Oliveira. Removal of High-Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Quim Nova*. 2011;34(2):218-21.
- [9] Zinjarde SS, Pant AA. Hydrocarbon degraders from tropical marine environments. *Mar Pollut Bull*. 2002;44(2):118-21.
- [10] Palittapongarnpim M, Pokethitiyook P, Upatham ES. Biodegradation of crude oil by soil microorganisms in the tropic. *Biodegradation*. 1998;(167272):83-90.
- [11] MacGillivray a. R, Shiaris MP. Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments. *Appl Environ Microbiol*. 1993;59(5):1613-8.
- [12] Hassanshahian M, Tebyanian H, Cappello S. Isolation and characterization of two crude oil-degrading yeast strains , *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32 , from the Persian Gulf. *Mar Pollut Bull*. 2012;64(7):1386-91.
- [13] Gargouri B, Mhiri N, Karray F, Aloui F, Sayadi S. Isolation and Characterization of Hydrocarbon-Degrading Yeast Strains from Petroleum Contaminated Industrial Wastewater. *Biomed Res Int*. 2015; (11p). <http://dx.doi.org/10.1155/2015/929424>
- [14] Wongs P, Tanaka M, Ueno A, Hasanuzzaman M, Yumoto I, Okuyama H. Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. *Curr Microbiol*. 2004;49(6):415-22.
- [15] Mishra S, Jyot J, Kuhad RC, Lal B. In situ bioremediation potential of an oily sludge-degrading bacterial consortium. *Curr Microbiol*. 2001;43(5):328-35.
- [16] Hanson KG, Desai JD, Desai AJ. a Rapid and Simple Screening Crude Oil

Degrading Technique for Potential Microorganisms. *Biotechnol Tech.* 1993;7(1):745-8.

[17] Mota AJ, Nobrega FG. Unequivocal Identification of Fungi , Especially *Candida* and Related Species of Medical Interest. *Journal of Medical Diagnostic Methods*,2013; v. 02, p. 1000142.

[18] White TJ, Bruns S, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* 1990. p. 315-22.

[19] Fell Jack W. Rapid identification of yeast species using three primers in polymerase chain reaction.*Mol. Mar. Biology and Biotech.*1993 2(3), 174-180.

[20] Tamura K, Nei M. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.*1993; 10 (3): 512-526.

[21]Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution(N Y)*.1985;39(4):783-91.

[22]Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, Arabia S, et al. MBE Brief Communication MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol.and evolution.* 2013;1-12.

[23]Bidoia ED, Montagnolli RN, Lopes PRM. Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;3(290-295):1277-88.

[24] Farag S, Soliman NA. Biodegradation of crude petroleum oil and environmental pollutants by *Candida tropicalis* strain. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2011;54(4):821-30.

- [25] Mariano AP, Tomasella RC, Oliveira LM De, Conteiro J, Angelis DDF De. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. *African J Biotechnol.* 2008;7(9):1323-8.
- [26] Luz CC, Santos EA, Santos MOS, Mussu MY, Yamashita M, Bastos WR, et al. Estudos de biodegradação de óleo diesel por consorcio microbiano coletado em Porto velho- Ro, Amazônia. *Quim Nova.* 2011;34(5):775-9.
- [27] Ferrari BC, Zhang C, Dorst J Van. Recovering greater fungal diversity from pristine and diesel fuel contaminated sub-Antarctic soil through cultivation using both a high and a low nutrient media approach. *Front. Microbiol.* 2011;2:1-14.
- [28] Lima JMS, Pereira JO, Batista IH, Neto PQC, Santos JC, Araújo SP, Pantoja MCP, Mota AJ and Azevedo JL. Potential biosurfactant producing endophytic and epiphytic fungi, isolated from macrophytes in the Negro River in Manaus, Amazonas, Brazil. *African J Biotechnol.* 2016;15(24):1217-23.
- [29] Tunalı Boz, Dıgdem, Husniye Tansel Y, Cengiz Çorbacı, Fusun BU. Screening and molecular characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons degrading yeasts. *Turk J Biochem* 2015; 40(2):105-110 .
- [30] Shumin Y, Na N, Zhaoyang X, Jingliang T. Screening and identification of halotolerant yeast for hydrocarbon degrading and its properties studies. *African J Microbiol Res.* 2012;6(8):1819-28.
- [31] Das N, Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol Res Int.* 2011;2011:941810.
- [32] Hesham AEL, Wang Z, Zhang Y, Zhang J, Wenzhou LV, Yang M. Isolation and identification of a yeast strain capable of degrading four and five ring aromatic hydrocarbons. *Ann Microbiol.* 2006;56(2):109-12.
- [33] Romero MC, Cazau MC, Giorgieri S, Arambarri AM. Phenanthrene

degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream. *Environ Pollut.* 1998;101(3):355-9.

[34] Chaves GM, Arioli GRTERÇ, Padovan ANACB, Rosas RC, Ferreira RC, Melo ASA, et al. *Candida mesorugosa* sp . nov ., a novel yeast species similar to *Candida rugosa* , isolated from a tertiary hospital in Brazil. *Med Mycol* (2013) 51 (3): 231-242

[35] Junior JS, Mariano AP, Angelis DDF De. Biodegradation of biodiesel/diesel blends by *Candida viswanathii*. *African J Biotechnol.* 2009;8(12):2774-8.

[36] Sood N, Lal B. Isolation of a novel yeast strain *Candida digboiensis* TERI ASN6 capable of degrading petroleum hydrocarbons in acidic conditions. *J EnvironManage*,2009;90(5):1728-36.

[37]Joo HS, Ndegwa PM, Shoda M, Phae CG. Bioremediation of oil-contaminated soil using *Candida catenulata* and food waste. *Environ Pollut.* 2008;156(3):891-6.

[38] Miranda RDC, De Souza CS, Gomes EDB, Lovaglio RB, Lopes CE, Sousa MDFVDQ. Biodegradation of diesel oil by yeasts isolated from the vicinity of Suape Port in the State of Pernambuco -Brazil. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2007;50(1):147-52.

CONCLUSÕES

- 1- Pode-se constatar que tanto no ambiente impactado com petróleo como no ambiente não impactado, há ocorrência de microrganismos com capacidade para degradar petróleo;
- 2- A abordagem metodológica utilizando meio mínimo acrescido de petróleo como única fonte de carbono demonstrou ser um método eficiente no enriquecimento de microrganismos com potencial degradador;
- 3- O ensaio com indicador redox 2,6- diclorofenol indofenol confirmou a expectativa na triagem de isolados com potencial degradador;
- 4- A taxa de degradação expressada pela linhagem *C. mesorugosa* AM15, no ensaio de CG-MS confirmou estar na mesma ordem de grandeza que as outras espécies do mesmo gênero citadas na literatura;
- 5- As linhagens *C. mesorugosa* e *B. toyonensis*, são referidos pela primeira vez, neste trabalho, como degradadores de petróleo e derivados;
- 6- O fato da linhagem de *S. marcescens* isolada neste trabalho ter expressado capacidade de degradar petróleo reafirma o papel dessa espécie bacteriana como degradadora de xenobióticos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Considerando-se os resultados obtidos, parece-nos promissora a proposição de se utilizar as três linhagens num consórcio microbiano, capaz de degradar porcentagens mais elevadas de hidrocarbonetos do petróleo, tendo em vista as taxas de degradação obtidas em separado, pela linhagem *C. mesorugosa*. Além disso, serão realizados ensaios de toxicidade, genotoxicidade, patogenicidade, e produção de biossurfactante.

APÊNDICE I: Artigo 4

**MICRORGANISMOS ISOLADOS DE AMBIENTES AQUÁTICOS DA
AMAZÔNIA PRODUTORES DE HIDROLASES DE INTERESSE INDUSTRIAL
E BIOTECNOLÓGICO**

**ISOLATED MICROORGANISMS OF AMAZON AQUATIC ENVIRONMENTS
PRODUCERS OF HYDROLASES OF INDUSTRIAL AND
BIOTECHNOLOGICAL INTEREST**

¹Ferdyanne Beatriz Sabóia Peixoto; Jean Charles da Cunha Peixoto²; Ana Beatriz Farias Saraiva³; Marelis Margarita Ruiz⁴, Ana Teresa Miranda Peixoto⁵; José Odair Pereira⁶; Spartaco Astolfi-Filho⁷

¹Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia-
PPGBIONORTE
Universidade Federal do Amazonas - UFAM - Manaus/AM - Brasil
ferdyanne@gmail.com

^{2,3,5} Departamento de Parasitologia/ Laboratório de Genética Bacteriana
Universidade Federal do Amazonas - UFAM - Manaus/AM - Brasil
jean.metagenoma@gmail.com
abfsaraiva@gmail.com
anateresamirandapeixoto@hotmail.com

^{4,6}Faculdade de Ciências Agrárias - FCA
Universidade Federal do Amazonas - UFAM - Manaus/AM - Brasil
joseodairpereira@yahoo.com.br
marelisruiz7@hotmail.com

⁷Centro de Apoio Multidisciplinar -CAM
Universidade Federal do Amazonas - UFAM - Manaus/AM - Brasil
spartaco.biotec@gmail.com

Resumo

Enzimas são catalisadores biológicos responsáveis pela condução de reações bioquímicas fundamentais ao metabolismo e equilíbrio homeostático de células eucariontes e procariontes. Há uma demanda crescente de catalisadores biológicos em detrimento a catalisadores químicos, para utilização em processos de produção industrial, dado o alto grau de especificidade, melhor rendimento da reação e baixo custo final e também por sua baixa toxicidade. O objetivo deste estudo foi realizar uma busca direcionada de produção de hidrolases – amilases, proteases, lipases e celulasas, por isolados microbianos de ambientes aquáticos do entorno da Província Petrolífera de Coari – AM. Foram empregados meios de

cultivo contendo substratos específicos que estimularam a expressão das enzimas – alvo. Os resultados foram obtidos mediante leitura dos halos de degradação em torno das colônias microbianas crescidas em placas. Os Índices Enzimáticos (IE) foram estabelecidos pela medida do diâmetro médio do halo de degradação dividido pelo diâmetro médio da colônia microbiana. Do total de 39 isolados microbianos, bactérias e leveduras, obteve-se em percentuais, para atividade lipolítica, 61,53%, com IE máximo entre 2,0 e 6,98; para atividade amilolítica, 64,10% com IE máximo entre 2,0 e 2,5; atividade enzimática para celulase em 35,89% dos isolados, com IE entre 2,0 e 3,5; e finalmente, atividade de protease foi observada em 46,15% dos isolados, apresentando IE máximo entre 2,0 e 8,15. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios com destaque para as lipases e proteases, encorajando análises futuras visando sua utilização em processos industriais.

Palavras-chave: Prospecção, Microrganismos, Lipase, Protease, Amilase, Celulase.

Abstract

Enzymes are biological catalysts responsible for the conduction of biochemical reactions fundamental to the metabolism and homeostatic balance of eukaryotic and prokaryotic cells. There is a growing demand for biological catalysts rather than chemical catalysts for use in industrial production processes, given the high degree of specificity, better reaction yields and lower final cost, and also because of their low toxicity. The objective of this study was to conduct a targeted search for the production of hydrolases - amylases, proteases, lipases and cellulases, by microbial isolates from aquatic environments in the vicinity of the Coari - AM Petroleum Province. Culture media containing specific substrates were used which stimulated the expression of the target enzymes. The results were obtained by reading the degradation halos around the microbial colonies grown in plates. The Enzymatic Indices (EI) were established by measuring the mean diameter of the degradation halo divided by the mean diameter of the microbial colony. Of the total of 39 microbial isolates, bacteria and yeasts, 61.53% were obtained in percentage, for lipolytic activity, with a maximum EI between 2.0 and 6.98; For amylolytic activity, 64.10% with maximum EI between 2.0 and 2.5; Enzymatic activity for cellulase in 35.89% of the isolates, with EI between 2.0 and 3.5; And finally, protease activity was observed in 46.15% of the isolates, with a maximum IE between 2.0 and 8.15. The results obtained were very satisfactory with emphasis on the lipases and proteases, encouraging future analyzes aiming their use in industrial processes.

Key-words: Prospecting, Microorganisms, Lipase, Protease, Amylase, Cellulase.

1. Introdução

As enzimas são catalisadores biológicos que atuam em diversos processos bioquímicos celulares promovendo a adaptação dos microrganismos ao meio (LITTLECHILD *et al*, 2015). São utilizadas em diferentes setores da economia mundial, tendo uma vasta aplicação na biotransformação de diferentes substratos, agregando valor a produtos têxteis, alimentícios, medicamentos, cosméticos, e produtos de uso científico e biotecnológico (ORLANDELLI *et al.*, 2012). As enzimas de origem microbiana têm sido amplamente utilizadas em diferentes setores industriais, devido a sua fácil manipulação genética, possibilidade de produção enzimática em larga escala, diminuição de tempo, e redução dos custos de produção (LITTLECHILD *et al*, 2015; MAKI *et al*, 2009; OLIVEIRA, *et. al.*, 2006).

Os avanços nos processos de purificação e recuperação de proteínas com o auxílio da biotecnologia tem aprimorado a tecnologia enzimática, visando à melhoria dos processos envolvendo biocatalisadores (ORLANDELLI *et al.*, 2012). No cenário atual são conhecidas aproximadamente 4000 enzimas, das quais cerca de 200 são comercializadas, e 20 são produzidas em larga escala. Dentre as enzimas comercializadas, 75% são hidrolases, e desse total, 90% são de origem microbiana (LI *et.al*, 2012; MESSIAS *et al*, 2011). A demanda crescente do setor industrial por catalisadores biológicos com propriedades que se adequem a condições específicas de processos industriais, tem aumentado a busca por microrganismos produtores de enzimas (MALAJOVICH, 2012, MONTEIRO & SILVA, 2009).

As lipases, proteases, amilases e celulasas são enzimas hidrolíticas de grande interesse comercial. Atualmente, as proteases estão em primeiro lugar no mercado mundial de enzimas microbianas utilizadas pela indústria, seguidas pelas amilases (ORLANDELLI *et al.* , 2012). As proteases respondem por aproximadamente 40% das vendas totais, e as amilases por 25 a 33% da produção mundial de enzimas (TIWARI, 2014; CARVALHO, 2008; PANDEY *e.t al.*, 2005; GUPTA *et. al.*, 2003). As lipases, classe de enzimas de destacada relevância para a indústria de detergentes, são empregadas, ainda, nas áreas farmacêutica, alimentícia, de laticínios, de papel, de couro, produtos químicos, tratamento de águas residuais, dentre outras (MASOMIAN, 2016; SACCO,

2013). Finalmente, as celulasas, grupo de enzimas sintetizadas por diferentes microrganismos principalmente fungos e bactérias, são amplamente utilizadas nas indústrias de papel, de alimentos, têxtil, de detergentes, de couro e na produção de biocombustível (GUPTA *et al.*, 2011). Contextualmente, esse uso crescente deve-se à facilidade de obtenção, por técnicas de melhoramento genético, levando vantagem em comparação aos catalisadores químicos, como maior especificidade, menor consumo energético mais amistosos ao meio ambiente e maior velocidade de reação, e redução dos custos de laboratório e de equipamentos. Nesse contexto, o foco central deste trabalho foi estabelecer uma busca direcionada de enzimas hidrolases, de origem microbiana, de ambientes aquáticos amazônicos pré-selecionados em meio contendo petróleo como única fonte de carbono.

2. Material e Métodos

2.1.1 Área de estudo

A área de estudo compreende a base de operações da Petrobrás Geólogo Pedro de Moura localizada Município de Coari/AM - Brasil, situado a 653 km em linha reta a sudoeste de Manaus (4°30'S/64°30'W), (PETROBRAS, 2008).

2.1.2 Coleta e processamento das amostras

As amostras de água foram coletadas no dique de efluente localizado no entorno da base petrolífera de Urucu. O local de estudo corresponde ao dique de efluente (S1), o dique é uma lagoa artificial, onde são descartados resíduos de petróleo processados na base, sua localização geográfica georefenciada corresponde a (S 04°51'50.4" / W 065°18'00.3"). A coleta foi realizada a margem da lagoa a uma profundidade de 50 cm e no meio da lagoa a uma profundidade de 2 metros. O segundo sítio de coleta trata-se do Igarapé natural (S2), sem contato com o dique de efluente, e sem indícios de contaminação/poluição (S 04°51'40.4" / W 065°17'52.7"). A água foi coletada a margem do igarapé a uma profundidade de 20 cm. O terceiro sítio de coleta corresponde ao Igarapé após o encontro com o dreno do dique de efluente (S 04°51'40.9" / W 065°17'50.4"). A coleta foi realizada a 20 cm de profundidade. Em seguida, as amostras de água

foram acondicionadas em garrafas de vidro esterilizadas, e mantidas refrigeradas em caixa térmicas durante o traslado da Província Petrolífera de Urucu/ Coari até o seu processamento no laboratório de Tecnologia do DNA recombinante na Universidade Federal do Amazonas-UFAM em Manaus.

2.1.3 Isolamento

As amostras de água foram enriquecidas em meio mineral *Buschnell Haas* (BH) (DIFCO™), 90 ml, e 1% de petróleo cru como única fonte de carbono, utilizando *Erlenmeyers* de 250 mL, tendo-se inoculado 10 mL de água, de cada sítio amostrado, em foram incubadas a 30⁰ C, sob agitação de 180 rpm/min em *shaker* rotativo durante 21 dias. Os microrganismos foram isolados em meio mínimo BH ágar contendo petróleo previamente esterilizado pelo método de filtração em membranas milipore 0,22µm. As cepas selecionadas foram cultivadas em meio ágar triptona soja (TSA - DIFCO™). Após o enriquecimento foi realizadas diluição seriada com as amostras de água, de 10⁻¹ a 10⁻⁵ em placas contendo ágar triptona soja (TSA). A contagem das UFC's totais, foi feita distribuindo-se 1 mL de cada diluição em placas de Petri contendo meio TSA. As placas foram incubadas a 30⁰ C e a contagem foi realizada após 24 horas.

2.1 Identificação parcial dos isolados

Os isolados foram caracterizados quanto à morfologia das colônias e sua propriedade tintorial pelo método de GRAM.

2.2 Atividade enzimática dos isolados microbianos

Os ensaios laboratoriais utilizados para estimular a expressão de enzimas, pelos isolados microbianos, foram conduzidos em meios específicos (em triplicata) para produção de lipase, protease, amilase e celulase respectivamente.

2.2.3 Determinação da atividade Lipolítica - Para testar a habilidade dos isolados em produzir lipase em meio sólido, as colônias isoladas em cultivo puro foram transferidas para placas contendo (0,002g/L de rodamina B, 2% de azeite de oliva, 3g/L de peptona, 2g/L extrato de levedura, 2g/L de fosfato de potássio

monobásico, 2g/L de cloreto de cálcio, 1g/L de sulfato de magnésio, 18g/L de ágar, 1% de tween 80). As placas foram incubadas por 48 horas em estufa B.O.D a 37°C. A atividade enzimática foi visualizada pela presença de um halo transparente em volta da colônia em contraste com o meio rosa.

2.2.4 Determinação da atividade Amilolítica - A produção de amilase foi avaliada em placas contendo meio comercial ágar amido (Himedia) com 8g/L de amido de milho. Após 48 horas de incubação a 37 °C em estufa B.O.D, adicionou-se ao meio 50 mL de tintura de iodo o qual revelou um halo claro em volta da colônia indicando a atividade Amilolítica.

2.2.5 Determinação da atividade Proteolítica - A capacidade dos isolados microbianos em expressar protease foi avaliada em meio sólido contendo (2g/L de extrato de levedura, 10g/L de leite desnatado, 2,5g/L de gelatina, 15g/L de ágar). Após 48 horas de incubação a 37 °C em estufa B.O.D, foram verificados os halos transparentes, em volta da colônia indicando a atividade proteolítica.

2.2.6 Determinação da atividade Celulolítica - A atividade celulolítica foi detectada em meio contendo (1% de carboximetilcelulose, 2,5g/L de peptona, 2,5g/L de NaCl, 1,25g/L de extrato de levedura, 15g/L de ágar), as placas foram incubadas a 37 °C em estufa B.O.D. Após 24 horas foi adicionado 5.0 mL de solução reveladora de *congo red* a 0,25% (2,5g/L), a atividade enzimática foi observada pelo halo claro em volta da colônia.

2.2.7 Avaliação do índice enzimático dos isolados (IE) - A atividade enzimática dos microrganismos isolados nos meios específicos para produção de lipase, protease, amilase e celulase, foi determinada pelo índice enzimático (IE), onde, diâmetro médio do halo de degradação foi dividido pelo diâmetro médio da colônia conforme a equação abaixo. O resultado é considerado satisfatório quando o IE for = ou < 2.0 o que indica atividade enzimática (SILVA, *et al.*, 2015; FLORENCIO *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2006; STAMFORD *et al.*, 1998).

Equação 1:
$$IE = \frac{\text{Diâmetro do halo (mm)}}{\text{Diâmetro da colônia (mm)}} = IE(\text{mm})$$

2.2.8 Análise estatística - As atividades enzimáticas dos microrganismos foram analisadas estatisticamente utilizando um delineamento experimental casualizado, com três repetições, os índices obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), onde foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade. A análise foi realizada no programa *Assistat 7.7 beta*, pacote de assistência estatística, desenvolvido pelo Prof. Dr. Francisco de S. de A.S. e Silva da Universidade Federal de Campinas Grande (SILVA & AZEVEDO, 2009).

3 Resultados e discussão

Foram isolados 39 microrganismos, sendo 17 cepas do dique de efluente; 12 do igarapé natural e 10 do Igarapé após a confluência com o efluente. A estimativa das populações microbianas foi realizada com base no NMP em UFC's/mL. Os resultados para os três ambientes estão dispostos na tabela 1.

Tabela 1: Número de UFC's por ponto de coleta

Código	Pontos de coleta	Profundidade	UFC's/mL
S1	Dique de efluente	50 cm	6400x10 ²
		2 m	495x10 ²
S2	Igarapé natural	20 cm	127x10 ²
S3	Igarapé após o encontro com o dreno do dique de efluente	20 cm	1950x10 ²

Dos 39 isolados microbianos analisados pelo método de Gram, 3 foram identificados como leveduras, com propriedade tintorial Gram-positiva; 22 como Bacilos Gram-negativos; e 14 são Bacilos Gram-positivos (tabela 2).

A expressão da atividade enzimática dos isolados foi avaliada em meios específicos para detecção da produção de amilase, celulase, protease e lipase (tabela 2). A atividade enzimática foi determinada pela medida do raio em meio sólido, onde o índice enzimático (IE) foi considerado satisfatório quando se apresentou igual ou maior que 2.0 mm conforme previamente descrito em outros estudos (SILVA, *et al.*, 2015; FLORENCIO *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2006;

STAMFORD *et al.*, 1998). Considerando as médias dos índices enzimáticos (IE) de cada isolado obtidos neste estudo, verifica-se que não houve diferenças significativas ao nível de $p < 0.01$ (tabelas 3, 4, 5 e 6).

Tabela 2: Identificação morfotintorial e resultados dos testes enzimáticos dos microrganismos isolados do Dique de Efluente (S1); Igarapé Natural (S2) e Igarapé após a confluência com o efluente (S3)

ISOLADO	IDENTIFICAÇÃO MORFOTINTORIAL		RESULTADOS DOS TESTES ENZIMÁTICOS			
	Morfologia	Propriedade tintorial	Amilase	Lipase	Protease	Celulase
S1-01	Bacilo	Gram - negativo	+	+	+	+
S1-02	Levedura	Gram - positivo	+	-	+	-
S1-03	Levedura	Gram - positivo	+	-	-	-
S1-04	Levedura	Gram - positivo	-	+	+	-
S1-05	Bacilo	Gram - positivo	+	+	-	+
S1-06	Bacilo	Gram - positivo	+	+	-	+
S1-07	Bacilo	Gram - positivo	+	-	+	+
S1-08	Bacilo	Gram - negativo	-	-	-	-
S1-09	Bacilo	Gram - negativo	+	+	-	-
S1-10	Bacilo	Gram - positivo	+	-	+	+
S1-11	Bacilo	Gram - negativo	-	-	-	-
S1-12	Bacilo	Gram - positivo	-	+	+	-
S1-13	Bacilo	Gram - negativo	-	+	-	-
S1-14	Bacilo	Gram - negativo	-	-	-	-
S1-15	Bacilo	Gram - negativo	+	-	-	-
S1-16	Bacilo	Gram - positivo	+	-	+	+
S1-17	Bacilo	Gram - positivo	+	-	+	-
S2-01	Bacilo	Gram - negativo	-	-	-	-
S2-02	Bacilo	Gram - negativo	+	+	-	-
S2-03	Bacilo	Gram - positivo	+	+	+	+
S2-04	Bacilo	Gram - negativo	+	+	-	-
S2-05	Bacilo	Gram - negativo	-	+	+	-
S2-06	Bacilo	Gram - positivo	-	+	-	+
S2-07	Bacilo	Gram - negativo	+	+	-	+
S2-08	Bacilo	Gram - negativo	+	+	+	-
S2-09	Bacilo	Gram - negativo	-	+	+	-
S2-10	Bacilo	Gram - negativo	+	+	-	-
S2-11	Bacilo	Gram - negativo	-	+	-	-
S2-12	Bacilo	Gram - negativo	+	+	+	-
S3-01	Bacilo	Gram - negativo	-	+	+	+
S3-02	Bacilo	Gram - negativo	-	+	-	-
S3-03	Bacilo	Gram - positivo	+	-	-	-
S3-04	Bacilo	Gram - positivo	+	-	+	-
S3-05	Bacilo	Gram - positivo	+	+	-	+
S3-06	Bacilo	Gram - negativo	-	+	-	-
S3-07	Bacilo	Gram - negativo	+	+	-	-
S3-08	Bacilo	Gram - positivo	+	-	+	+
S3-09	Bacilo	Gram - negativo	+	+	+	+
S3-10	Bacilo	Gram - positivo	+	-	+	+

No teste de atividade da lipase (pH entre 8,0 e 8,5) 24 isolados microbianos, o equivalente a 61,53% do total de isolados (tabela 7) mostraram-se positivos, sendo 7 isolados do Dique de efluente, 11 do Igarapé natural e 6 do Igarapé após confluência com o vertedouro. Quanto à morfologia, 17 são Bacilos Gram – negativos; 6 são Bacilos Gram – positivos e 1 levedura. Os índices enzimáticos variaram entre **2,0 e 6,98mm** (tabela 3). Se levarmos em conta o IE como parâmetro para avaliar o potencial de utilização das lipases, nota-se que o maior índice de atividade lipolítica, obtido neste trabalho, representa quase o dobro quando comparado ao descrito por Carrim *et al.* (2006), IE de 3,7 (22,22%); é três vezes maior quando confrontado a Oliveira, *et al.*, (2006), IE de 2,0 (4,9%); e quase 3 vezes em relação aos IE obtidos por Stamford *et al.*, (1998), IE máximo de 2,89 (4,41%). O percentual dos microrganismos ativos para expressão de lipases no presente estudo extrapola em magnitude de mais de 10 vezes, os isolados microbianos descritos nos trabalhos aqui citados – percentual entre parênteses. Essa diferença elevada pode ser explicada pelo fato de que lipídios são dispersos de modo mais facilitado em meio aquoso do que em solos, aumentando o contato entre microrganismos produtores de lipases e substrato lipídico. Os isolados microbianos obtidos neste estudo demonstraram elevado potencial de produção de lipase, encorajando a utilização dos mesmos em processos de produção de lipases para uso industrial.

Tabela 3: Análise estatística semiquantitativa da produção de lipase.

Isolados	Médias de tratamento	Índices Enzimáticos Lipase
S1-01	1.8fg	2.00 2.00 1.50
S1-04	3.0c	3.12 3.00 3.00
S1-05	2.6d	2.50 2.60 2.70
S1-06	2.06ef	2.00 2.00 2.20
S1-09	1.5gh	1.50 1.50 1.50
S1-12	1.5gh	1.40 1.50 1.60
S1-13	2.08ef	2.25 2.00 2.00
S2-02	0.58i	.66 .60 .50
S2-03	1.5gh	1.50 1.50 1.70
S2-04	2.6d	2.50 2.50 2.80
S2-05	2.63d	2.66 2.60 2.70
S2-06	1.53gh	1.50 1.60 1.50
S2-07	2.5d	2.50 2.40 2.60
S2-08	2.0ef	2.00 2.00 2.00
S2-09	0.567i	.50 .50 .70
S2-10	5.0b	5.00 5.00 5.00
S2-11	0.64i	.66 .60 .66
S2-12	2.31de	2.33 2.30 2.30
S3-01	6.8a	6.98 6.50 6.92
S3-02	0.53i	.50 .60 .50
S3-05	1.31h	1.33 1.30 1.30
S3-06	1.62gh	1.66 1.60 1.60
S3-07	2.0ef	2.00 2.00 2.00
S3-09	2.08ef	2.14 2.10 2.00

Médias de três repetições: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.01$) nível de 1% de probabilidade; DMS (Tukey) = 0.35.

A produção de amilase foi expressa por um total de 25 cepas microbianas (64,10%) sendo, 11 do dique de efluente, 7 do igarapé natural e 7 do igarapé após o vertedouro (tabela 7). Entre os isolados microbianos, 12 são Bacilos Gram – positivos, 2 leveduras com propriedade tintorial Gram – positiva e 11 Bacilos Gram – negativos. Os maiores IE expressos ficaram entre **2,0 e 2,5 mm** (tabela 4), demonstrando maior atividade, e percentual de isolados superior quando comparado aos resultados obtidos por Oliveira *et al.*, (2007), que avaliaram a produção de amilase por isolados de rizóbios, e observaram que dos 19 isolados testados em meio sólido YMA modificado, 7 (36,8%) expressaram atividade com índice de 2,1 mm. No entanto, o maior IE de atividade amilolítica foi inferior ao descrito em Baratto *et al.*, (2011), os quais isolaram

microrganismos a partir de fontes agroindustriais e solos, com atividade amilolítica variando entre 1,0 e 4,19 mm, no entanto o percentual de isolados amilolíticos, obtidos por esses autores foi menor (51,4%) em relação ao nossos achados.

Tabela 4: Análise estatística semiquantitativa da produção de amilase.

Isolados	Médias de tratamento	Índices Enzimáticos Amilase
S1-01	1.6 cd	1.50 1.66 1.66
S1-02	1.9abc	1.75 2.00 2.00
S1-03	1.55cd	1.66 1.50 1.50
S1-05	1.4d	1.20 1.50 1.50
S1-06	2.16a	2.50 2.00 2.00
S1-07	1.43d	1.30 1.50 1.50
S1-09	1.01e	1.04 1.00 1.00
S1-10	0.54f	.62 .50 .50
S1-15	1.56cd	1.50 1.60 1.60
S1-16	1.66bcd	1.60 1.70 1.70
S1-17	1.56cd	1.70 1.50 1.50
S2-02	1.43d	1.50 1.40 1.40
S2-03	1.44d	1.33 1.50 1.50
S2-04	1.99ab	1.99 2.00 2.00
S2-07	0.53f	.60 .50 .50
S2-08	0.57f	.52 .60 .60
S2-10	1.5d	1.52 1.50 1.50
S2-12	1.55cd	1.66 1.50 1.50
S3-03	1.44d	1.33 1.50 1.50
S3-04	2.0ab	2.00 2.00 2.00
S3-05	1.4d	1.25 1.50 1.50
S3-07	2.16a	2.50 2.00 2.00
S3-08	1.5d	1.50 1.50 1.50
S3-09	1.4d	1.20 1.50 1.50
S3-10	1.55cd	1.66 1.50 1.50

Médias de três repetições: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. (p < 0.01) nível de 1% de probabilidade; DMS (Tukey) = 0.38.

A atividade celulolítica foi expressa por 14 (35.89%) isolados, sendo 6 do Dique de efluente; 3 do Igarapé natural e 5 do Igarapé após o vertedouro (tabela 7). São eles, 10 Bacilos Gram – positivos e 4 Bacilos Gram – negativos. Os maiores índices enzimáticos expressos variaram entre **2,0 e 3.51mm** (tabela 5). Não obstante os índices enzimáticos obtidos para atividade celulolítica estarem

dentro do índice mínimo, no entanto, estão abaixo daqueles descritos por Queiroz *et al.*, (2002), os quais reportaram variação de IE entre 5,0 e 31,7 mm para atividade celulolítica e de lacases em 27 cepas bacterianas isoladas de efluente de fábrica de papel, e desse total 63% degradaram celulose. No entanto, isso pode ser explicado pelo fato de que a amostra foi obtida de efluente de indústria de celulose, onde os microrganismos estão submetidos a uma única fonte de carbono, conferindo alto grau de especialização frente a ambiente saturado por resíduos de celulose.

Tabela 5: Análise estatística semiquantitativa da produção de celulase.

Isolados	Médias de tratamento	Índices Enzimáticos Celulase
S1-01	2.0cd	2.00 2.00 2.00
S1-05	2.2c	2.40 2.00 2.20
S1-06	1.3e	1.34 1.30 1.30
S1-07	2.0cd	2.00 2.00 2.00
S1-10	0.91f	.84 1.00 .90
S1-16	0.84fg	.73 1.00 .80
S2-03	2.6b	2.74 2.50 2.70
S2-06	0.37hi	.33 .50 .30
S2-07	1.7d	1.71 1.70 1.70
S3-01	3.43a	3.51 3.50 3.30
S3-05	0.58gh	.66 .60 .50
S3-08	0.2i	.20 .30 .10
S3-09	0.52h	.57 .50 .50
S3-10	1.69d	1.77 1.80 1.50

Médias de três repetições: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. (p < 0.01) nível de 1% de probabilidade; DMS (Tukey) = 0.31.

Foram selecionados 18 (46,15 %) isolados microbianos com atividade proteolítica (pH 7,0) sendo 8 do Dique de efluente, 5 do Igarapé natural e 5 do Igarapé após o vertedouro (tabela 7). Desses, 9 são Bacilos Gram - positivos; 7 são Bacilos Gram - negativos e 2 leveduras. Os melhores índices enzimáticos foram registrados entre **2,0 e 8,15 mm** (tabela 6). Comparando com os maiores IE para atividade proteolítica e percentual dos isolados – relacionados entre parênteses, descritos em Bueno *et al.*, (2009), IE entre 0,75 e 0,92 (22,2%); Oliveira, *et al.*, (2006), IE entre 2,0 e 6,7 (35,9%); e Stamford *et al.*, (1998), IE

entre 1,30 e 4,0 (5,8%), a descoberta dessas bactérias produtoras de protease, abre perspectiva de serem realizadas pesquisas visando determinar o potencial desses microrganismos para uso em indústrias.

Tabela 6:Análise estatística semiquantitativa da produção de protease.

Isolados	Médias de tratamento	Índices Enzimáticos Protease
S1-01	1.5e	1.50 1.50 1.50
S1-02	1.66e	1.60 1.60 1.80
S1-04	1.9d	1.80 2.00 2.00
S1-07	1.62e	1.66 1.60 1.60
S1-10	1.56e	1.50 1.50 1.70
S1-12	0.45g	.46 .40 .50
S1-16	3.0b	3.00 3.00 3.00
S1-17	1.5e	1.50 1.50 1.50
S2-03	2.5c	2.33 2.50 2.70
S2-05	1.06f	1.00 1.00 1.20
S2-08	2.0d	2.00 2.00 2.00
S2-09	2.5c	2.50 2.50 2.50
S2-12	2.08d	2.06 2.00 2.20
S3-01	8.08a	8.15 8.10 8.00
S3-04	0.097h	.09 .10 .10
S3-08	0.59g	.57 .60 .60
S3-09	1.5e	1.50 1.50 1.50
S3-10	0.08h	.05 .10 .10

Médias de três repetições: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. ($p < 0.01$) nível de 1% de probabilidade; DMS (Tukey) = 0.23.

Os isolados que se destacaram pela habilidade múltipla e versatilidade foram **S1-01**, **S2-03**, **S3-09** os quais apresentaram atividade enzimática para os testes de celulase, amilase, lipase e protease respectivamente. As cepas, **S1-05**, **S1-06**, **S2-07** e **S3-05** expressaram atividade enzimática para amilase, lipase e celulase. As amostras **S1-07**, **S1-10**, **S1-16**, **S3-08** e **S3-10**, apresentaram atividade positiva quando submetidas aos testes de produção de amilase, protease e celulase. Os isolados, **S2-08**, **S2-12**, hidrolisam, amido, lipídio e proteínas. A amostra **S3-01** foi positiva nos testes para lipase, protease e celulase. A atividade enzimática expressa pelos 39 isolados está apresentada na (Tabela 7).

Tabela 7: Atividade enzimática expressa por isolados do Dique de Efluente (S1); Igarapé Natural (S2) e Igarapé após a confluência com o efluente (S3)

Testes enzimáticos	Isolados positivos / total de isolados S1	Isolados positivos / total de isolados S2	Isolados positivos / total de isolados S3	Nº de isolados positivos/ total de isolados	Total de isolados positivos (%)
Amilase	11/17	7/12	7/10	25/39	64.10%
Lipase	7/17	11/12	6/10	24/39	61.53%
Protease	8/17	5/12	5/10	18/39	46.15%
Celulase	6/17	3/12	5/10	14/39	35.89%

4 Conclusão

Considerando as condições experimentais empregadas neste estudo, pode-se verificar um percentual elevado de isolados microbianos que expressaram atividade enzimática para amilases, proteases, lipases, e celulases, com IE superior à média relatada em trabalhos anteriores, o que demonstra elevada capacidade catalítica. Destacam-se neste estudo a atividade das lipases e proteases, que extrapolaram IE descritos na literatura científica recente. Testes de estabilidade de pH, temperatura e atividade catalítica deverão ser conduzidos para a seleção visando a utilização em processos industriais e biotecnológicos.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo a pesquisa do Amazonas (FAPEAM) e à Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro. À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) / Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Rede Bionorte).

6 Referências

- BARATTO, Cesar Milton; SALAMONI, Sabrina Pinto; COSTA, Ricardo; OLIVEIRA, Carolina Borges de; LOCATELLI, Gabriel Olivo. **Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil**. Evidencia, Joacaba v. 11 n. 2, p. 15-28, julho/dezembro 2011.
- BUENO, César Júnior; Ivan Herman Fischer; Daniel Dias Rosa; Edson Luiz Furtado. **Produção de enzimas extracelulares por *Fusarium solani* de maracujazeiro amarelo**. Tropical Plant Pathology 34 (5) September - October 2009.
- CARRIM, Aysha Jussara Ivonilde; Edweis Cândida Barbosa; José Daniel Gonçalves Vieira. **Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo)**. Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol.49, n. 3 : pp. 353-359, May 2006.
- CARVALHO, R. V. **Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima**. Ciênc. Tecnol. Aliment. vol. 28, n. 2, p. 380-386. 2008.
- FLORENCIO, C., COURI, S., FARINAS, C. S. **Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains**. Enzyme Research, p.1-7, 2012.
- GUPTA .R., Khasa Y.P., & Kuhad R.C. **Evaluation of pretreatment methods in improving the enzymatic saccharification of cellulosic materials**. Carbohydrate Polymers 84: 1103-1109. 2011.
- GUPTA, R. ; MOHAPATRA, H. ; GOSWAMI, V.K. ; CHAUHAN, B. **Microbial α -amylases: a biotechnological perspective**. Process Biochemistry, v. 38, p. 1599-1616. 2003.
- LI, Shuang , Xiaofeng Yang; Shuai Yang; Muzi Zhu; Xiaoning Wang. **Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering**. Computational and structural biotechnology Jornal. Volume No: 2, Issue: 3, September 2012.
- LITTLECHILD, J. A. **Review Article: Archaeal Enzymes and Applications in Industrial Biocatalysts**. Hindawi Publishing Corporation Archaea. 2015. vol. pag. 10. 2015
- MAKI, M.; LEUNG, K. T.; QIN, W. **The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass**. Int. J. Biol. Sci. vol.5, n. 5, p. 500-516. 2009.
- MASOMIAN, M. et al. **Analysis of Comparative Sequence and Genomic Data to Verify Phylogenetic Relationship and Explore a New Subfamily of Bacterial Lipases**. PLoS ONE. vol. 11, n. 3, pag. 20. 2016.

MALAJOVICH M, A. **Biotecnologia 2011**. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.

MESSIAS, Josana Maria; Bruna Zucoloto da Costa; Valéria Marta Gomes de Lima; Ellen Cristine Giese; Robert Frans Huibert Dekker; Aneli de Melo Barbosa. **Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas**. Semina: Ciências Exatas e tecnológicas, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MONTEIRO, Valdirene N.; Roberto do Nascimento Silva. **Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática**. Revista Processos Químicos, Goiânia. 2009.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JUNIOR, A. F. **Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 27, n. 1, p. 61-66, 2007.

OLIVEIRA, Arlem Nascimento; Luís Antonio de Oliveira; Jerusa Souza Andrade; Aloísio Freitas Chagas Júnio. **Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central crescendo em diferentes níveis de acidez**. Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas, 26 (1): 204-210, jan-mar. 2006.

OLIVEIRA, Arlem Nascimento.; Luís Antonio de Oliveira; Jerusa Souza Andrade; Aloísio Freitas Chagas Júnio. **Enzimas Hidrolíticas Extracelulares de Isolados de Rizóbia Nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil**. Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas, 26 (4): 853-860, out.-dez. 2006.

ORLANDELLI, Ravelly Casarotti, Vânia Specian, Aretusa Cristina Felber, João Alencar Pamphile. **Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações**. SaBios: Rev. Saúde e Biol. v.7, n.3, p.97-109, set.-dez., 2012.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 760p. 2005.

PETROBRAS. **A saga do petróleo na Amazônia. O desafio de produzir ouro negro na Amazônia. Manaus**. Luz Comunicação, Rio de Janeiro, 36 p. 2008.

QUEIROZ, G. O, JORDÃO, R. C. C., SALGUEIRO, A. A. **Seleção de microrganismos produtores de celulasas e de lacases a partir de efluente de fábrica de papel**. Revista Química & Tecnologia, v.1, n.1, p.7-10, 2002.

SACCO, L. P. **Isolamento de Bactérias Produtoras de Enzimas de Interesse em Processos Biotecnológicos**. 2013. 57 f. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Campus de Jaboticabal, 2013.

SILVA, Valéria Maria Araújo, Claudia Miranda Martins²; Suzana Claudia Silveira Martins. **Atividade celulolítica de actinobactérias de região semiárida do**

Ceará. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.21; p. 2026. 2015.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. **Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance.** In:WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN GRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

STAMFORD, Tânia. L. Montenegro; J. Magali Araújo.; N. Pereira Stamford. **Atividade Enzimática de Microrganismos isolados do Jacatupé (Pachyrhizus erosus L. Urban).** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 18, p. 382-385, 1998.

TIWARI, S. et al. **Enhanced Production and Characterization of a Solvent Stable Amylase from Solvent Tolerant *Bacillus tequilensis* RG-01: Thermostable and Surfactant Resistant.** The Scientific World Journal. Pg 11. 2014.

ANEXOS

Anexo I: Coleta das amostras de água



Figura 1: Sítios de coleta. A-B Igarapé natural - livre de contaminação com petróleo. C-D) Dique de efluente. E) Igarapé após o encontro com o dreno do dique de efluente. Foto: Marelis Ruiz.

Anexo II: Enriquecimento das amostras e seleção de microrganismos degradadores de petróleo.

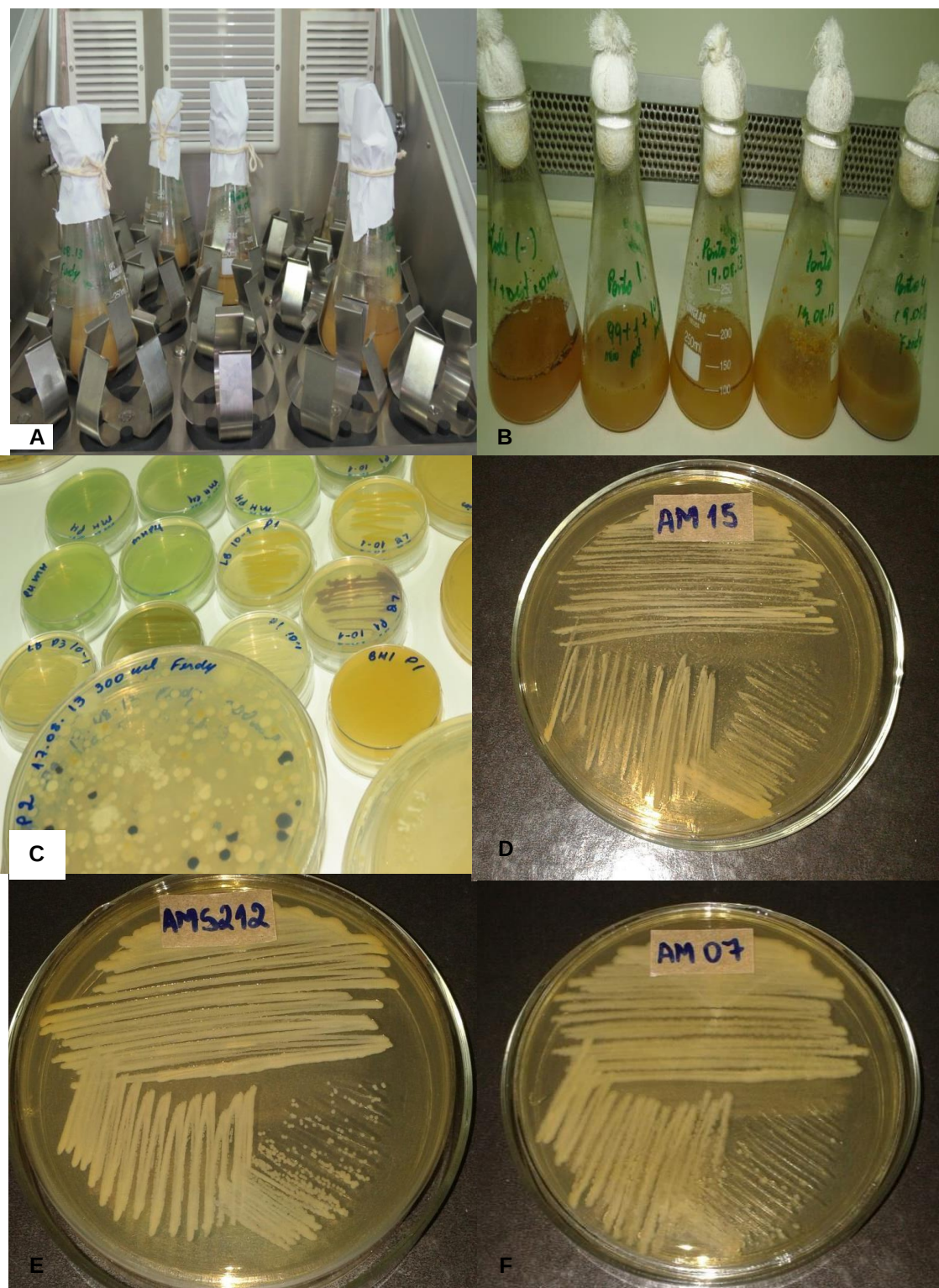


Figura 2: Seleção de microrganismos. A-B) Enriquecimento das amostras. c) Isolamento de microrganismos. D) *C. mesorugosa*. E) *S. marcescens*. F) *B. toyonensis*.

Anexo III: Testes bioquímicos das linhagens bacterianas degradadoras de petróleo isoladas de ambientes aquáticos da Amazônia.

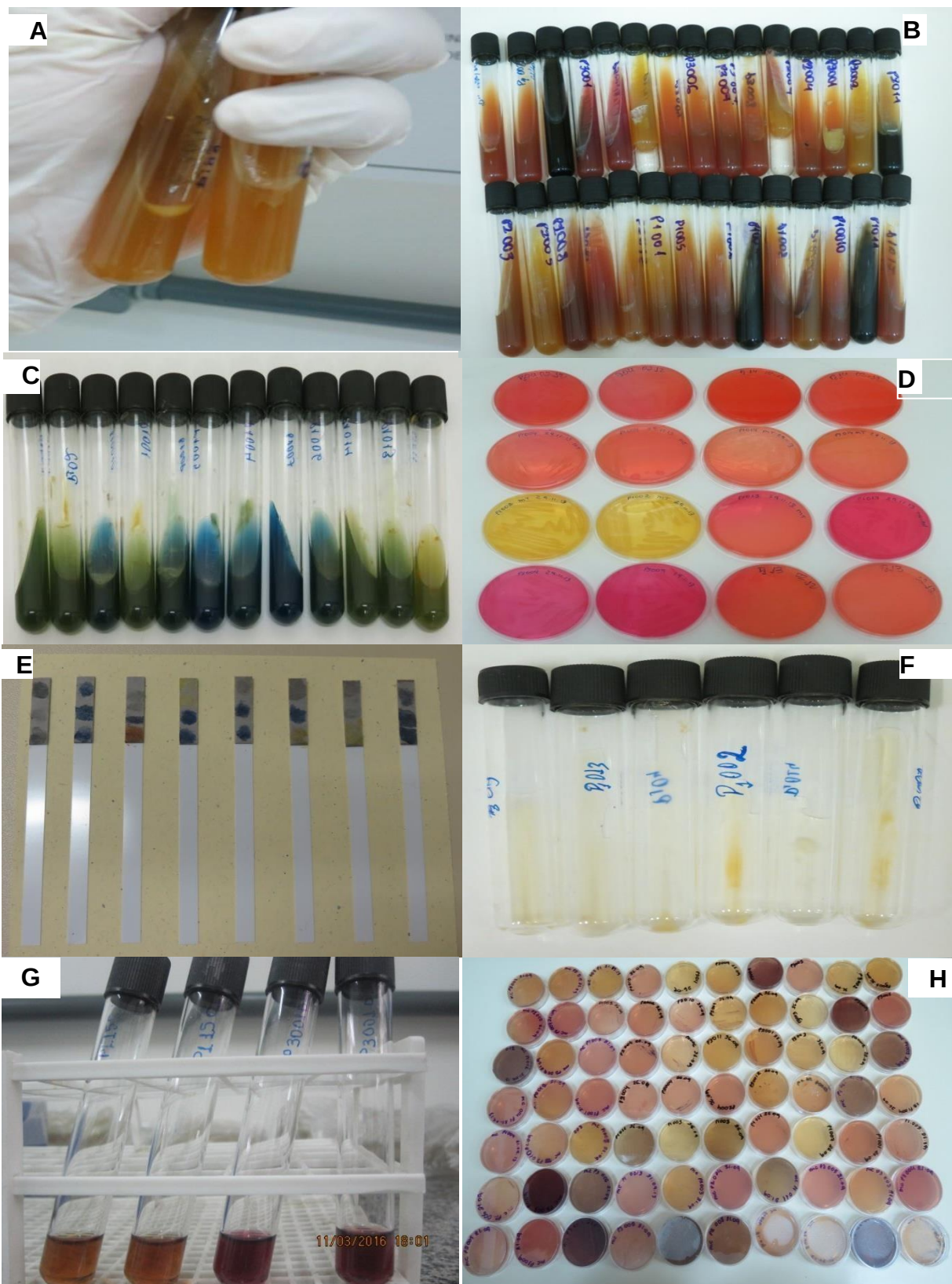


Figura 3: Caracterização fenotípica. A-B) Tríplex açúcar ferro (TSI). C) Citrato de Simons. D) Manitol. E) Oxidase. F) Coagulase. G) Voges-Proskauer. H) Fermentação da lactose.

Anexo IV: Avaliação do potencial de biodegradação do petróleo por linhagens microbianas isoladas de ambientes aquáticos do entorno da Base petrolífera de Coari -AM, utilizando o indicador redox DCPIP.



Figura 4: Microrganismos degradadores de petróleo. A-B) *Candida mesorugosa*. C-D) *Bacillus toyonensis*. E-F) *Serratia marcescens*. G-H) Ensaio em placas de cultura de células com 24 poços.

Anexo V: Avaliação do crescimento microbiano em meio BH suplementado com 1% de óleo diesel como única fonte de carbono.



Figura 5: Crescimento microbiano em meio BH suplementado com 1% de óleo diesel. (SM) *Serratia marcescens*. (C) *Candida mesorugosa*. (BT) *Bacillus toyonensis*.

Anexo VI: Avaliação da produção de biossurfactante por linhagens microbianas com potencial para degradar petróleo.

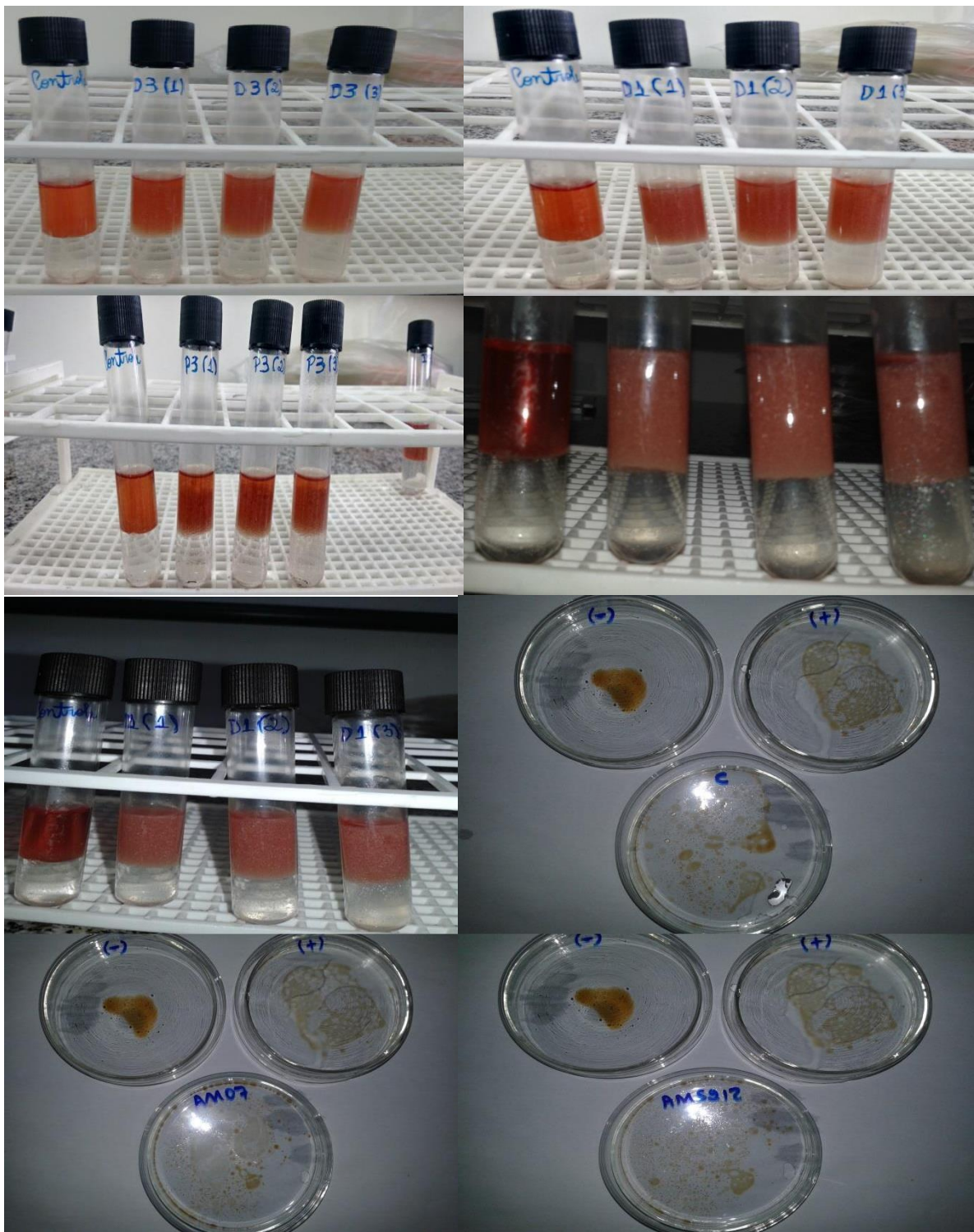


Figura 6: A-B-C-D-E) Avaliação do índice de emulsificação. Ensaio do colapso da gota e dispersão do petróleo.

Anexo VII: Perfil de sensibilidade a antimicrobianos das linhagens bacterianas degradadoras de petróleo.

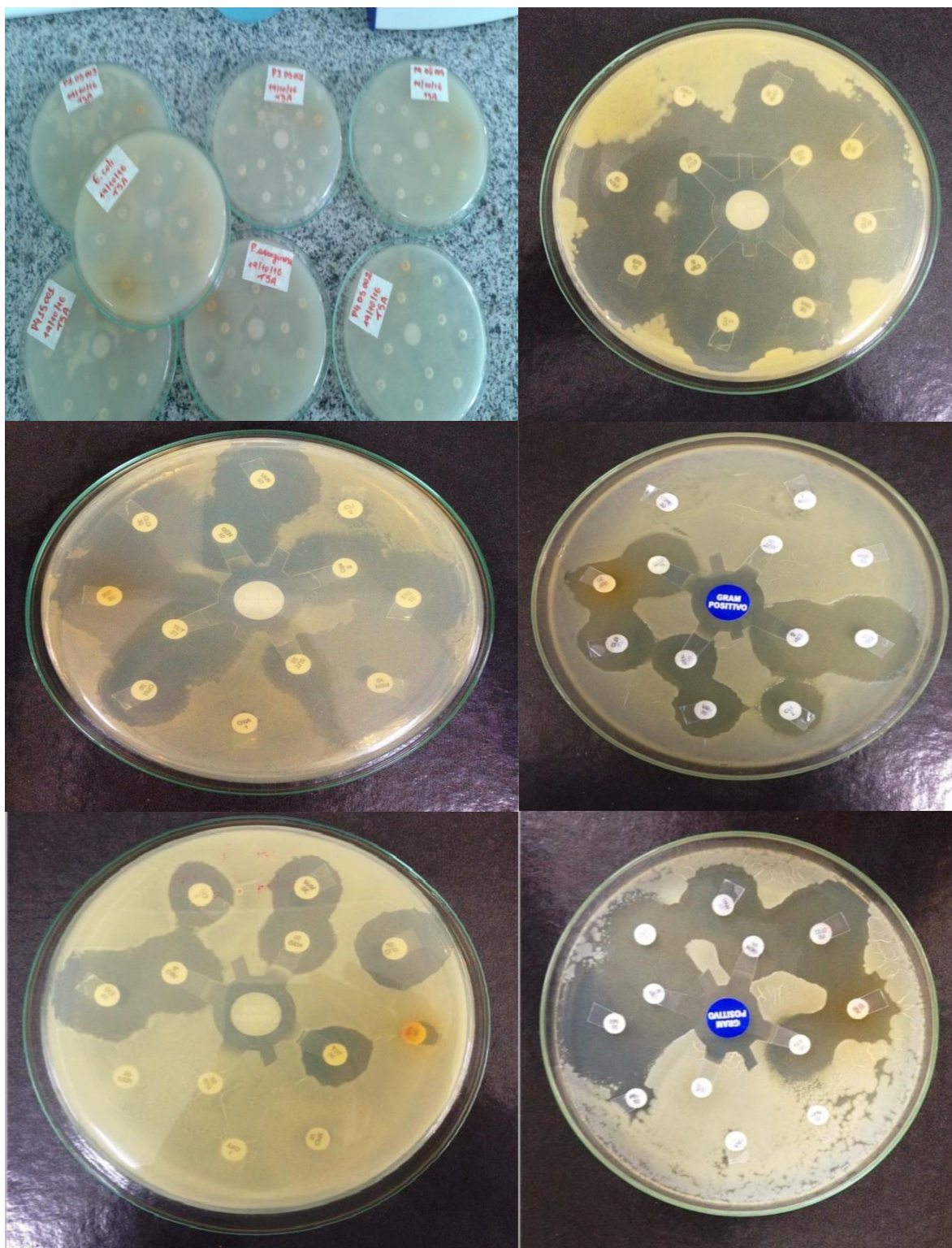


Figura 7: Resultados dos antibiogramas realizados com linhagens bacterianas degradadoras de petróleo.