

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



**DIVERSIDADE BACTERIANA DO SOLO DE *LANDFARM* DA
REFINARIA DE PETRÓLEO LANDULPHO ALVES**

ANA CÁCIA FREIRE DOS SANTOS

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2007

ANA CÁCIA FREIRE DOS SANTOS

DIVERSIDADE BACTERIANA DO SOLO DE *LANDFARM* DA
REFINARIA DE PETRÓLEO LANDULPHO ALVES

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração:
Bioprospecção e Biotecnologia.

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2007

S237

Santos, Ana Cácia Freire dos.

Diversidade bacteriana do solo de Landfarm da Refinaria de Petróleo Landulpho Alves / Ana Cácia Freire dos Santos. – Ilhéus, BA : UESC, 2007.
xii, 94f. : il.

Orientadora: Rachel Passos Rezende.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.
Inclui bibliografia e apêndice.

1. Microorganismos. 2. Solos – Microbiologia. 3. Biotecnologia. 4. Biorremediação. 5. Biodegradação. 6. Diversidade genética. 7. Indústria Petroquímica. I. Título.

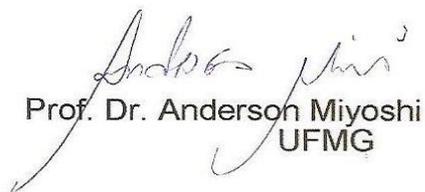
CDD 579

DIVERSIDADE BACTERIANA DO SOLO DE LANDFARM DA REFINARIA DE PETRÓLEO LANDULPHO ALVES

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa
Cruz, como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre
em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração:
Bioprospecção e Biotecnologia.

Aprovada: 28 de fevereiro de 2007


Prof. Dr. Anderson Miyoshi
UFMG


Prof. Dr. Eduardo Gross
UESC


Prof. Dr. João Carlos T. Dias
UESC


Prof. Dra. Rachel Passos Rezende
UESC – Orientador

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Acássia Freire e José dos Santos, assim como, aos meus irmãos Quézia, José, Quérem, Jonatas e Ellen, e minha avó Carmen Salvador.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A todos meus familiares, em especial aos meus pais, por estarem sempre ao meu lado apoiando e mostrando-me o melhor caminho a ser seguido. Que apesar de todas as dificuldades, confiaram em mim e dedicaram grande parte de suas vidas em função de meu crescimento intelectual e sucesso pessoal.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e à Coordenação do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade da realização do curso e pelo apoio logístico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela concessão da bolsa.

Ao CNPq pelo suporte financeiro para a compra de materiais e reagentes utilizados nos trabalhos.

Desejo expressar minha homenagem aos professores que contribuíram de forma direta ao desenvolvimento deste trabalho:

- à Profa. Rachel Passos Rezende (mãe científica), que me deu oportunidade de trabalhar na pesquisa científica, acreditando em meu potencial. Agradeço também pela orientação no decorrer do trabalho, amizade e pelo apoio recebido.
- ao Prof. Júlio Cascardo, pela coorientação fundamentais ao sucesso desse trabalho.
- ao Prof. João Dias, pelas sugestões e críticas construtivas.

Ao Robson, pela amizade e contribuição no processo de seqüenciamento do DNA neste trabalho.

Ao Ramon Vidal pelo carinho, amizade, companhia, incentivo e pelas análises de bioinformática das seqüências.

À Fernanda Cupertino pela amizade, troca de conhecimentos para ingressarmos no programa e as reuniões na churrascaria.

Ao Fabrício Juchum, pela amizade e pelos momentos de descontração na hora do cafezinho.

Aos amigos e colegas Danilo, Aline Clara, Juliana clara (*in memorian*), Mylene e Balbino, pelos grandes momentos que passamos juntos.

Aos amigos do Laboratório de Monitoramento Ambiental, Bianca Maciel, Alexander Birbrair, Gislaine Silva, Ronaldo Argolo, Adriana Reis, Tharcilla Silva, Cleidianne Rodrigues e Miguel Santos e, pela contribuição na execução dos experimentos.

À todos os colegas do mestrado e laboratório de genética, pela troca de experiências, ajuda, convívio e descontração.

Às secretarias do Programa de Pós-Graduação (Andréa e Luciana), pela eficiência e disponibilidade.

E aos que nesse momento passaram pelo lapso de memória, saibam que expresse minha gratidão por estarem direta e indiretamente ligados ao desenvolvimento e êxito deste trabalho.

ÍNDICE

EXTRATO	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. Petróleo e seus derivados	16
2.1.1. Benzeno	18
2.1.2. Tolueno	18
2.1.3. Xileno	20
2.2. Biodegradação	21
2.3. Biorremediação	22
2.4. Landfarming	23
2.5. Evidências das vias de clivagem do catecol	25
2.6. Os microrganismos e o solo.....	28
2.7. Diversidade genética dos microrganismos do solo	30
2.8. 16S rDNA (DNA ribossomal) como marcador molecular para inferir filogenia bacteriana	31
2.9. Principais divisões bacterianas presentes em solos	35
2.10. Extração de DNA e métodos moleculares para análise de amostras ambientais	36
3. CAPÍTULO 1	39
MICRORGANISMOS UTILIZADORES DE TOLUENO COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO ISOLADOS DE UM LANDFARM DE BORRAS OLEOSAS	40
1. Resumo.....	40
2. Introdução	40
3. Material e Métodos.....	42

4. Resultados e Discussões.....	44
5. Conclusões	48
6. Referências Bibliográficas	49
4. CAPÍTULO 2	52
SIMPLE DNA EXTRACTION PROTOCOL FROM BRAZILIAN LANDFARM SOIL FOR 16S RDNA STUDY OF MICROBIAL DIVERSITY	53
1. Abstract	54
2. Introduction	54
3. Material and Methods	56
4. Results.....	60
5. Discussion.....	61
6. Acknowledgements	65
7. References	66
8. Supplements	69
6. CONCLUSÕES GERAIS	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
8. APÊNDICE A	86
IDENTIFICATION OF FUNGI FROM LANDFARM SOIL	86

EXTRATO

SANTOS, Ana Cácia Freire, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2007. **Diversidade bacteriana do solo de Landfarm da Refinaria de Petróleo Landulpho Alves.** Orientadora: Rachel Passos Rezende. Co-orientador: Júlio Cezar de Mattos Cascardo.

Ambientes naturais ou modificados exibem uma grande diversidade de comunidades microbianas. A composição e a relativa abundância de espécies nessas comunidades são determinadas pelas condições ambientais as quais estão sujeitas. A capacidade dos microrganismos para mineralizar formas de matéria orgânica tem aplicações na recuperação de locais contaminados com poluentes tóxicos fazendo deles excelentes agentes para a biorremediação. Porém, os microrganismos presentes na manutenção desse processo biológico ainda são pouco conhecidos e estudados. Dessa forma, o presente trabalho teve o objetivo de estudar a diversidade microbiana em solo de *Landfarm* capaz de utilizar compostos tóxicos e, ou sobreviver sob as condições estressantes de um ambiente poluído com petróleo e seus derivados através do uso de metodologias tradicionais de cultivo e de ferramentas da biologia molecular para análise da diversidade total. A partir do solo de *Landfarm* de borras oleosas da Refinaria de Petróleo Landulpho Alves, São Francisco do Conde - BA foram isoladas sessenta linhagens microbianas capazes de utilizar petróleo como única fonte de carbono. Destas, dez foram capazes de crescer na presença de tolueno como única fonte de carbono. Também foram identificados quatro fungos biodegradadores de petróleo. No presente trabalho, um protocolo de extração simples de DNA total de solo de *Landfarm* associado à amplificação do 16S rDNA por PCR, clonagem e sequenciamento foi o método utilizado para avaliar a diversidade bacteriana do solo. Das sequências analisadas, observou-se que 41% puderam ser classificadas dentro de 5 filos do grupo eubacteria, sendo eles: *Proteobacteria* (γ e α equivalentes a 21% dos clones identificados), *Actinobacteria* (12%), *Planctomyces* (4), *Firmicutes* (2%) e *Bacteroidetes* (2%). Apenas 10% dos clones eram similares a sequências de 16S rRNA conhecidas de organismos cultiváveis

ou clones ambientais, sendo assim, capazes de serem classificados em seis gêneros: *Acetovibrio*, *Caldilinea*, *Isophaera*, *Planctomyces*, *Porphyrobacter*, *Mycobacterium*, . Somente um dos clones foi classificado como duplicado. A análise sugere que se trata de um grupo filogeneticamente diverso, com representantes de pelo menos cinco filos diferentes de bactérias. A análise baseada no 16S rDNA revelou uma ampla diversidade bacteriana que excede o que foi observado com o isolamento de biodegradadores de petróleo. Ou seja, menos de 20% das sequências encontradas foram classificadas como de bactérias cultiváveis. Por se tratar de um ambiente onde a principal fonte de carbono disponível são as borras de petróleo, conclui-se que existe uma grande diversidade de microrganismos presentes e estes são potenciais biodegradadores de hidrocarbonetos. Portanto, o *Landfarm* atende aos pressupostos quanto a sua capacidade biorremediativa.

Palavras-chave: Diversidade microbiana, Solo, Landfarm, Biodegradação.

ABSTRACT

SANTOS, Ana Cácia Freire, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2007. **Bacterial diversity from *Landfarm* soil of the Refinaria de Petróleo Landulpho Alves.** Advisor: Rachel Passos Rezende. Advisor Committee Member: Júlio Cezar de Mattos Cascardo.

Natural or modified environments exhibit a great diversity of microbial communities. Composition and relative abundance of species in these communities are determined by the environmental conditions which are subject. The capacity of the microorganisms to mineralize forms of organic matter has applications in the recovery of polluted places with toxic pollutants doing of them excellent agents for the bioremediation. However, the function and the microorganisms present in maintenance of that biological process are still little known and studied. This work had the objective of studying the microbial diversity capable to use toxic compositions and, or to survive under stressful conditions of an environmental polluted with petroleum and flowed through the use of traditional methodologies of cultivation and molecular biology techniques for the total diversity analysis. Starting from the *Landfarm* soil of oily dregs of the Refinaria Landulpho Alves were isolated 60 microbial lineages capable to use petroleum as the only source of carbon. Of those, 10 were capable to grow in the toluene presence as only source of carbon. Were also isolated and identified four fungi biodegraders of petroleum. In this study a simple extraction of total DNA of soil of *Landfarm* associated to the amplification of the 16S rDNA for PCR, cloning and sequencing was the method used to evaluate the bacterial diversity of the soil. Of the analyzed sequences, it was observed that 41% could be classified inside of 5 phylum of the eubacteria group, being them: *Proteobacteria* (γ and equivalent α to 21,56% of the identified clones), Actinobacteria (11,76%), Planctomyces (3,92), Firmicutes (1,96%) and Bacteroidetes (1,96%). Only 9,8% of the clones were similar to known sequences of 16S rRNA of cultivable organisms or environmental clones, being like this, capable of be classified in gender. Only one of the clones was classified as having duplicated or almost identical sequence. The analysis suggests a diversified group, with representatives of at least five different phylums

of bacteria. The analysis revealed a wide diversity that exceeds what was observed with the isolation of biodegraders of petroleum. In other words, only less than 20% of the found bacteria were classified as cultivable. Treating of an place in which are available petroleum wastes as carbon source, was concluded that a great diversity of present microorganisms exists and these are potential hydrocarbons biodegraders. Therefore, *Landfarm* assists to the presuppositions as its capacity of biorremediation.

Key words: Microbial Diversity, Soil, Landfarm, Biodegradation.

1. INTRODUÇÃO

Durante todo o seu período de existência, o planeta Terra sempre passou por inúmeras catástrofes naturais que, de uma forma ou outra, sempre causaram desequilíbrios ao meio ambiente. Contudo, os acidentes naturais eram ao longo do tempo superados através de processos de equilíbrio dinâmico (COELHO, 2006).

Por muito tempo a presença do homem tem deixado marcas neste planeta devido as transformações radicais que este provoca ao ambiente em que vive. Desta forma, a Terra passa por danos ambientais significativos e constantes, os quais, a torna incapaz de absorvê-los e conseqüentemente equilibrar-se em um curto período de tempo. Essas mudanças causadas ao meio ambiente cresceram exponencialmente em função da intensificação da atividade industrial ocorrida no século XVIII - surgimento da revolução industrial e do crescimento das formas de produção, consumo e riscos a estes associados (COELHO, 2006). Por quase 200 anos um grande número de abusos à natureza ocorreram, pois não havia nenhum controle por parte das autoridades quanto ao que se produzia e ao que se rejeitava diretamente no ambiente (contaminantes). Somente em torno de 1960, após alguns graves acidentes com produtos químicos, é que surgiu o interesse da sociedade em diminuir os danos causados ao meio ambiente.

Em geral, as diversas formas de contaminações apresentam-se como uma grande ameaça ecológica, são causadoras de danos consideráveis para a saúde e gera uma grande preocupação pública. Desse modo, o conceito de proteção ambiental começa a despertar como uma proposta nas políticas e legislações ambientais.

Como disse Lavoisier ao enunciar a Lei de Conservação das massas, "Na natureza nada é criado e nada é perdido, tudo é transformado", o que faz com que fique evidente que a natureza oferece alternativas para transformação de resíduos poluentes em não poluentes. Experimentos com microrganismos parecem indicar que estes podem usar praticamente qualquer substância como alimento ou fonte de energia. Alguns compostos, apesar de serem altamente tóxicos para um certo microrganismo, podem ser um substrato para outro. Estes organismos participam de processos ecológicos bastantes importantes, tais como

a fotossíntese oxigênica, ciclagem de matéria orgânica, ciclos biogeoquímicos, e manutenção da fertilidade e estrutura de solos (TRÜPER, 1992). Desse modo, podemos inferir que a existência de seres vivos no planeta terra está intimamente ligada à diversidade e atividade metabólica de microrganismos na natureza.

Ambientes naturais geralmente exibem uma grande diversidade de comunidades microbianas. A composição e a relativa abundância de espécies nessas comunidades são determinadas pelas condições ambientais as quais elas estão sujeitas, incluindo fatores químicos e físicos, bem como as condições bióticas. Dessa forma, mudanças nas características de alguns ambientes provocados pela ação antropogênica, em função da intensificação da atividade industrial, têm gerado mudanças na estrutura das comunidades microbianas, dando lugar ao aumento daquelas mais adaptadas (FULTHORPE et al., 1998; LINDSTROM et al., 1999).

A capacidade dos microrganismos para transformar formas de matéria orgânica (natural ou sintética) faz deles excelentes agentes para a biorremediação. Porém o papel dos microrganismos na manutenção dos processos biológicos ainda é pouco conhecido e estudado. Alguns dos componentes da biodiversidade dos solos e ambientes aquáticos têm aplicações na recuperação de sítios contaminados pela presença de poluentes tóxicos, processo conhecido por biorremediação. A biorremediação, do ponto de vista prático, fundamenta-se em três aspectos principais: a existência de microrganismos que possuam a capacidade catabólica para degradar o contaminante; o contaminante deve estar disponível ou acessível ao ataque microbiano ou enzimático; existência de condições ambientais adequadas para o crescimento e a atividade do agente biorremediador (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). No Brasil, existem alguns exemplos de processos de remediação biológica de poluentes no solo, em setores específicos da indústria. Como exemplo, a indústria petrolífera tem realizado experimentos com a avaliação dos efeitos dos derivados do petróleo em populações bacterianas através de *Landfarms*. Este termo refere-se a unidade de tratamento onde está sendo empregada uma tecnologia de remediação conhecida por *Landfarming*. Este processo consiste na aplicação do resíduo na superfície do solo, de modo a reduzir ou eliminar as concentrações dos constituintes do poluente por meio da biodegradação microbiana (PAULA et al., 2006). O estudo

do solo de *Landfarm* chamou muita atenção desde que se mostrou uma fonte natural de organismos que possuem a habilidade para degradar hidrocarbonetos derivados do petróleo, deles retirando sua fonte de energia (BEWLEY, 1996).

A análise das comunidades microbianas que desempenham atividades de biodegradação de hidrocarbonetos no solo tem sido um desafio aos microbiologistas, uma vez que menos de 1% das células observadas por contagem direta é recuperada através dos métodos de cultivo (COURTOIS et al., 2003, LILES et al. 2003).

Técnicas microbiológicas tradicionais e de microscopia convencional podem não elucidar algumas perguntas relativas às comunidades microbianas complexas, pois não permitem estudos da diversidade dos microrganismos não cultiváveis e/ou desconhecido (AMANN et al., 1995; ROOSE-AMSALEG et al., 2001). O uso de métodos independentes de cultivo para a detecção e identificação filogenética de microrganismos desconhecidos e/ou não cultiváveis necessita de fragmentos de DNA relativamente grandes extraídos de amostra de solo (BERTRAND et al., 2005). Métodos de clonagem e sequenciamento, e de “fingerprints”, como o ARDRA (amplified rDNA restriction analysis), T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism), DGGE/TGGE (denaturing/temperature gradient gel electrophoresis) baseados na amplificação dos fragmentos do 16S rDNA por PCR (polimerase chain reaction) permitem uma visualização direta da diversidade filogenética de uma gama de ambientes diferentes (BERTRAND et al., 2005; JUCK et al., 2000).

Por se tratar de um país que é produtor e grande consumidor de petróleo e derivados, pesquisas precisam ser direcionadas no aprimoramento dos métodos de biorremediação, a partir do estudo da microbiota presente em áreas degradadas. Os objetivos desse estudo foram: i. verificar a habilidade biodegradativa de isolados microbianos frente ao petróleo e seus derivados; ii. avaliar a diversidade microbiana do solo de *Landfarm*, levando em consideração a dificuldade de isolamento e cultivo de certos grupos de microrganismos e a possibilidade de se encontrar novos táxons ainda não descritos na literatura, através do emprego de metodologias de caracterização direta de populações em amostras ambientais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Petróleo e seus derivados

A poluição, causada por acidentes de derramamento de óleo, tem se tornado cada vez mais freqüente provocando catástrofes ecológicas e sociais (SHAW, 1992; BURNS et al., 1993). Ambientes contaminados incluem solos superficiais ou subsolos, lençóis freáticos, rios, lagos e oceanos.

O petróleo, formado por processos biogeoquímicos, é uma substância oleosa, inflamável, menos densa que a água, com cheiro característico e de cor variando entre o negro e o castanho escuro, constituído por uma mistura bastante complexa de hidrocarbonetos, e em menores quantidades, de compostos não hidrocarbônicos. Sua composição varia em função de sua localização geográfica e das condições físico-químicas e biológicas que o originaram. Em geral, petróleo é uma mistura bastante complexa de hidrocarbonetos alifáticos, alicíclicos, aromáticos e, em proporções menores, de compostos não hidrocarbônicos, como os ácidos naftênicos, fenóis, tióis, porfirinas e compostos nitrogenados e sulfurados (ATLAS, 1981). Na composição do petróleo, as moléculas menores, com um a quatro átomos de carbono, formam os gases; moléculas maiores (de quatro a cerca de dez átomos de carbono) constituem a gasolina; moléculas de até cinquenta átomos de carbono são as dos combustíveis leves e óleos lubrificantes; e moléculas de várias centenas de átomos de carbono, compõem combustíveis pesados, ceras e asfaltos. Junto aos hidrocarbonetos gasosos há até 15% de nitrogênio, dióxido de carbono e ácido sulfídrico, além de pequena porção de hélio e outros gases. Nos hidrocarbonetos líquidos em geral se encontram traços de oxigênio, enxofre e nitrogênio, combinados com as moléculas de hidrocarbonetos ou na forma elementar (CRAPEZ et al., 2002; <http://www.cepa.if.usp.br/energia/energia1999/Grupo1A/composicao.html>).

Admite-se que sua origem esteja ligada à decomposição bacteriana dos seres que constituem o plâncton sob situações de hipóxia. Estes seres decompostos foram, ao longo de milhões de anos, se acumulando no fundo dos mares e dos lagos, sendo pressionados pelos movimentos da crosta terrestre, transformando-se no petróleo. Este se desloca, saindo da rocha matriz, chegando

a terrenos denominados bacias sedimentares, onde se concentra. Estas bacias são formadas por camadas ou lençóis porosos de areia, arenitos ou calcários. O petróleo aloja-se ali, ocupando os poros rochosos, onde se acumula, formando jazidas, onde se encontra o gás natural, na parte mais alta, e petróleo e água nas mais baixas (http://www.cepetro.unicamp.br/petroleo/index_petroleo.html).

Compostos como benzeno, tolueno e xilenos, chamados compostos BTX, causam danos ao organismo humano e de outros seres vivos (LEE; LIN, 2006; TIBURTIUS et al., 2005). Anualmente, milhões de toneladas de resíduos de diversas naturezas são produzidos pelas indústrias e acumulados no meio ambiente, representando uma grande ameaça à qualidade de vida da população mundial (ALEGRETTI et al., 2004).

Os hidrocarbonetos monoaromáticos, benzeno, tolueno e os três xilenos orto, meta e para são os constituintes da gasolina que têm maior solubilidade em água e, portanto, são os contaminantes que primeiro irão atingir o lençol freático (TIBURTIUS et al., 2005). Os hidrocarbonetos aromáticos (BTX e outros alquilbenzenos) são encontrados em uma considerável proporção na gasolina, perfazendo cerca de 10 a 59% desta, enquanto que os hidrocarbonetos alifáticos compreendem 41 a 62%. Os hidrocarbonetos aromáticos são geralmente mais tóxicos que os compostos alifáticos, com o mesmo número de carbonos e possuem maior mobilidade em água, em função da sua solubilidade em água ser da ordem de 3 a 5 vezes maior. Esta solubilidade aumenta ainda mais com a adição de etanol à gasolina, uma vez que o etanol é completamente miscível à água, a presença deste aumenta a solubilidade do BTX por co-solvência (TIBURTIUS et al., 2005; CORSEUIL et al., 1998; CORSEUIL; ALVAREZ, 1996). Hidrocarbonetos aromáticos têm também maior mobilidade em sistemas solo-água, além de migrarem mais rapidamente através das águas atingindo mananciais de abastecimento, os compostos aromáticos apresentam uma toxicidade crônica mais significativa do que os hidrocarbonetos alifáticos (TIBURTIUS et al., 2005; CORSEUIL et al., 1998; CORSEUIL; ALVAREZ, 1996).

Estudos sobre a poluição por hidrocarbonetos aromáticos no ar destacam os danos provocados à saúde, principalmente, devido à toxicidade, mutagenicidade e, ou carcinogenicidade do BTX. A contaminação atmosférica, responsável pela intoxicação por via inalatória, resulta principalmente das

emissões e da evaporação dos BTXs de produtos em que são usados como solventes.

A água constitui o segundo veículo com maior importância na mobilização do poluente e na sua dispersão a partir da fonte de emissão, características devidas à reciclagem contínua da hidrosfera (RICHARDSON et al., 1988).

O solo é o vetor com a cinética de degradação mais lenta e aquele em que ocorre um maior grau de acumulação (RICHARDSON et al., 1988). Este elemento cumulativo permite a recontaminação de todos os outros, daí que seja o de maior perigo.

2.1.1. Benzeno

O benzeno (Figura 1) é um hidrocarboneto aromático que se apresenta como um líquido incolor, lipossolúvel, volátil, inflamável, de odor característico. É um irritante das mucosas e sua aspiração em altas concentrações pode provocar distúrbios à saúde. (TIBURTIUS et al., 2005; CORSEUIL; ALVAREZ, 1996).

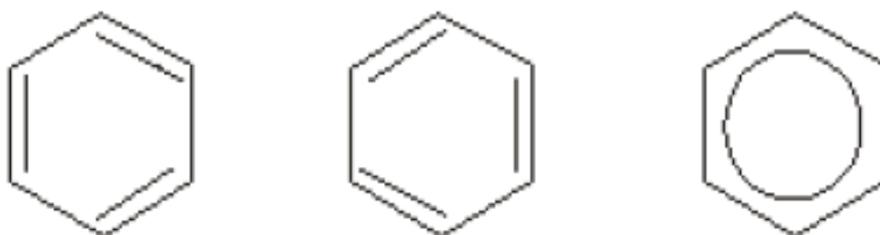


Figura 1 - Representações da fórmula molecular do benzeno. Fonte: www.Wikipedia.org

2.1.2. Tolueno

O tolueno, segundo Hallier-Soulier et al. (1996), é um componente orgânico

isolado do petróleo, amplamente utilizado na indústria como solvente, que vem sendo categorizados como um dos poluentes prioritários para a Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos, ministérios do meio ambiente e organizações mundiais de saúde. Este pertence a uma família de organopoluentes carcinogênicos e neurotóxicos que freqüentemente contaminam o solo e ambientes aquáticos como consequência de vazamentos, e é conhecido por ser extremamente tóxico as células, mesmo em baixas concentrações (SMITH, 1990; BONT, 1998). Ao se acumular, ele rompe a membrana celular, assim afetando a estrutura e função da célula.

Também conhecido como: toluol, metilbenzeno, metilbenzol e fenilmetano, e apresenta características idênticas às de outros hidrocarbonetos aromáticos derivados do petróleo, como o xileno, o naftaleno e o benzeno, ocorrendo em maiores quantidades que este último.

A estrutura molecular do tolueno é derivada da do benzeno, devido à substituição de um átomo de hidrogênio por um grupo metil. Assim sendo, a sua fórmula molecular é $C_6H_5CH_3$.

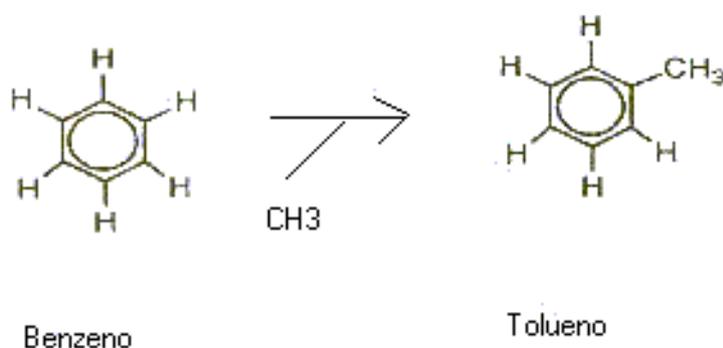


Figura 2 - Esquema de substituição do H por um grupo metil, originando o tolueno. Fonte: www.wikipedia.org

Segundo Irwin (1997), o tolueno é produzido, na sua maior parte, a partir do petróleo ou de processos petroquímicos e, numa escala menor, pode derivar da manufatura metalúrgica do carvão de coque. A combustão, presente nos processos de queima de madeiras e de lixo, é também responsável pela liberação de alguma quantidade deste tóxico.

Ao contrário de outros hidrocarbonetos, a degradação do tolueno contribui para a formação da camada de ozônio (fotólise oxidativa), mas, paradoxalmente, acarreta efeitos negativos à saúde (HARTE et al., 1991).

2.1.3. Xileno

Segundo o manual de produtos químicos perigosos da CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo) o xileno, também é conhecido como dimetilbenzeno ou xilol; e possui três isômeros: *orto*, *meta* e *para* (Figura 3). Caracteriza-se por ser um líquido aquoso, sem coloração, com um odor doce. Esta substância flutua na água e produz vapor irritante e inflamável (<http://www.cetesb.sp.gov.br>). Este produto é largamente utilizado pelas indústrias de tintas e vernizes; possui grande utilização como solvente para resinas acrílicas; dissolve a dibenzil celulose, o óleo de mamona, óleo de linhaça e borracha. É também bastante empregado pelos fabricantes de *thinner* e redutores como diluente. É utilizado ainda nas formulações de tintas de impressão e tintas têxteis. Pela grande capacidade de dissolver altas concentrações de princípios ativos e sua alta volatilidade, o xileno é, ainda, muito utilizado nas formulações de pesticidas (TRINDADE et al., 2003).

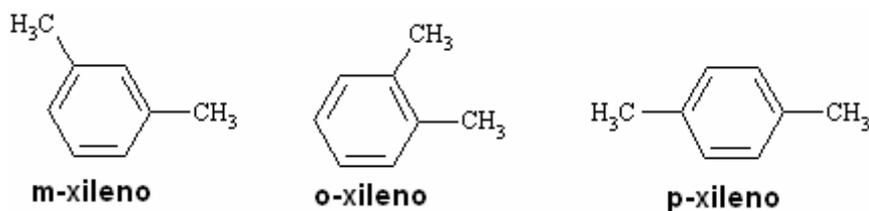


Figura 3 - Representação da fórmula molecular dos três isômeros do xileno. Fonte: www.Wikipedia.org

2.2. Biodegradação

Biodegradação é basicamente a remoção de resíduos e poluentes potenciais por meios biológicos, e geralmente considera-se ser uma conversão microbiana de um composto orgânico, onde o benefício máximo desse processo é a transformação do poluente em compostos simples como CO₂ e H₂O (ATLAS, 1981).

Pesquisas desenvolvidas na década de quarenta, evidenciaram que os microrganismos têm a habilidade de utilizar o petróleo e suas frações como fonte de carbono e energia, e que esses microrganismos estão distribuídos nos mais diversos ecossistemas da natureza. A importância das populações microbianas presentes no solo na degradação de poluentes é bastante conhecida (LEAHY; COLWELL, 1990).

A capacidade de certos microrganismos utilizarem hidrocarbonetos como fonte de carbono foi apresentada por Zobell em 1946. Este também verificou que esses microrganismos eram amplamente distribuídos pela natureza. Segundo Atlas, 1981, esses microrganismos compõem 1% da microflora normal, mas que pode chegar a 10% em ambientes impactados. A biodegradação de compostos orgânicos por populações naturais de microrganismos representa um dos mecanismos primários pela qual, compostos poluentes são eliminados do meio ambiente (ALEXANDER, 1977).

Processos biodegradativos podem ocorrer através de uma simples espécie ou, mais freqüentemente, requer uma mistura de organismos atuando em consórcio. Os microrganismos podem utilizar o poluente como substrato (fornecendo nutrientes ou como fonte de energia) ou modificar a sua estrutura química. Entretanto esta última ocorre sem fornecimento de energia para o crescimento celular (ALEXANDER, 1981).

A capacidade para metabolizar compostos aromáticos e usá-los como fonte de carbono e energia para o crescimento é demonstrado por muitas espécies de bactérias e fungos com algumas versatilidades a mais que outras espécies na abrangência das enzimas e vias metabólicas disponíveis. Para crescer em tais compostos o organismo deve ser capaz de quebrar ao menos parte da molécula, em um composto mais simples que são intermediários na via metabólica. O

processo pode ocorrer na presença ou ausência de oxigênio (HOPPER, 1991). Na natureza a maior parte da matéria orgânica é mineralizada aerobicamente, utilizando o oxigênio como aceptor de elétrons (SMITH, 1990).

A poluição por petróleo é um dos maiores problemas ecológicos e isso se deve, especialmente, ao fato dos microrganismos necessitarem de fontes disponíveis de oxigênio, nitrogênio e fósforo para degradarem os hidrocarbonetos, sendo que esses elementos não estão presentes em quantidades suficientes no óleo cru e nos produtos de petróleo (ATLAS, 1981; RICHARDSON, 1988).

2.3. Biorremediação

Apesar da biorremediação ser um termo relativamente novo, este termo descreve um fenômeno que existe desde o surgimento das primeiras formas de vida. Este processo utiliza agentes biológicos capazes de modificar ou decompor (degradar) alvos poluentes através de compostos inerentes ao seu metabolismo (enzimas). O objetivo da biorremediação é acelerar a degradação de poluentes orgânicos a concentrações abaixo dos limites estabelecidos como seguros ou aceitas pelas agências de controle ambiental. Assim pode-se fazer o uso de microrganismos (endógenos, exógenos ou geneticamente modificados) na biodegradação (SMITH, 1990).

O uso de sistemas biológicos para remediar ou detoxificar ambientes poluídos pelo homem é a grande aplicação da biorremediação. Os microrganismos, responsáveis pela mineralização da maioria da matéria orgânica a dióxido de carbono, produzem uma série de produtos aplicáveis na indústria. Os biossurfactantes, por exemplo, são utilizados na recuperação avançada de petróleo, na limpeza de tanques, na dispersão de manchas de óleo, na biorremediação de ambientes contaminados com compostos hidrofóbicos e em diversos outros campos. Estes compostos, liberados espontaneamente, são sintetizados predominantemente por microrganismos degradadores de hidrocarbonetos e são biodegradáveis, não causando problemas de toxicidade para o ambiente o que ocorre com os surfactantes químicos (COOPER, 1986;

ROSENBERG, 1986; FIECHTER, 1992).

Diversos métodos podem ser empregados para remover os resíduos de petróleo do solo e da água. Entre eles estão métodos físicos (aspersão, extração por vapor, estabilização, solidificação), químicos (foto-oxidação, dissolução, uso de detergentes) e biológicos (biorremediação) (ALEXANDER, 1977). Cada qual pode ser empregado no tratamento dos locais contaminados, sem uma regra geral de escolha, apenas avaliando-se as prioridades e particularidades do caso. Os tratamentos físicos possuem a vantagem de separar os contaminantes sem destruí-lo ou modifica-lo quimicamente, mas possui suas limitações (CUNHA; LEITE, 2000). A maioria dessas técnicas são muito dispendiosas para serem implementadas em larga escala e requerem controle e monitoramento contínuo pra se obter um desempenho otimizado. Entretanto, usualmente eles não resultam numa destruição completa dos contaminantes. Processos biológicos, por outro lado, é uma vertente promissora para a remoção dos agentes contaminantes (NUNES-HALLDORSON et al., 2003), geralmente feito de forma simplificada e de baixo custo comparada com outras alternativas.

A relação entre a efetividade da biorremediação e a população específica de degradadores ainda não é muito clara (SAITO; WADA, 1993), tornando necessário à aceleração de estudos sobre as microbiotas que demonstram uma habilidade inerente para degradar esses contaminantes.

Alguns dos componentes da biodiversidade dos solos e ambientes aquáticos têm aplicações na recuperação de sítios contaminados pela presença de poluentes tóxicos. No Brasil, existem alguns exemplos de processos de remediação biológica de poluentes no solo, em setores específicos da indústria. A Petrobrás tem realizado experimentos com a avaliação dos efeitos dos derivados do petróleo em populações bacterianas através de Landfarms (NUNES-HALLDORSON et al., 2003).

2.4. Landfarming

Uma técnica bastante comum, em se tratando da área petroquímica, é o chamado *Landfarming* (SILVA, 2001; BEWLEY, 1996). Essa denominação foi

oficialmente adotada pela E.P.A. dos Estados Unidos (Environmental Protection Agency) para um método de tratamento onde o substrato orgânico de um resíduo (rejeito industrial) seria degradado na camada superior do solo através dos microrganismos (CETESB, 2006; PAULA et al., 2006).

De acordo com Moreira e Siqueira (2006), trata-se de uma técnica *ex situ* (fora do local) na qual o contaminante é disposto na camada arável do solo, onde se concentram a grande maioria dos microrganismos que utilizam os contaminantes como fonte de energia. Nesse processo, o rejeito industrial é misturado ao solo por aração e gradagem e as condições físico-químicas do solo (água, aeração e nutrientes) são ajustadas de modo a maximizar o metabolismo microbiano de degradação. A camada arável pode atingir 0,5 m e abaixo dessa zona situa-se uma camada de solo ainda não saturada ou uma lona impermeabilizante, acima do leçol freático.

A velocidade de degradação depende da disponibilidade de nutrientes, ausência de substâncias biotóxicas e de outros parâmetros como: salinidade, capacidade de troca iônica, pH, textura do solo, aeração, capacidade de retenção de umidade, drenagem, temperatura e a presença de nutrientes que favoreçam a atividade biológica (nitrogênio, fósforo, potássio, etc.) Para a degradação bacteriana de 100 unidades de carbono (C), são necessárias, em média, duas unidades de nitrogênio (N). Por isso, é importante conhecer a relação C:N do material a tratar. Uma vez que, resíduos de petróleo possuem uma alta concentração de carbono é necessária a suplementação de nitrogênio no *Landfarming*. A biodegradação é favorecida quando a relação C:N for inferior a 10:1 (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A composição química do resíduo também determina a velocidade de sua decomposição. Os compostos saturados do petróleo, por exemplo, são degradados mais facilmente do que os insaturados. Em condições adequadas, concentrações de petróleo de até 7% podem ser reduzidas para 0,01-0,02% em poucos meses (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; MARIN, et al., 2004).

Segundo a CETESB (2006), para o projeto e operação desta forma de tratamento deve-se observar o estabelecido, pela Associação Brasileira de Normas Técnicas, na norma ABNT NBR 13.894 - TRATAMENTO NO SOLO (*Landfarming*). Apesar de ser um processo de simples implantação e eficaz, deve-

se observar os critérios técnicos para a seleção de locais apropriados devido a presença de materiais lixiviáveis e da formação de gases.

O simples fato de o Brasil possuir características climáticas e geográficas favoráveis tornou este método bastante viável do ponto de vista técnico e econômico em refinarias de petróleo, como é o caso da Refinaria Landulpho Alves, São Francisco do Conde - BA.

Apesar dos avanços em biorremediação de petróleo que foram feitos nas últimas décadas, os microorganismos mais efetivos podem metabolizar somente 70% - 90% do conteúdo de hidrocarbonetos. A remoção completa do poluente é dificultosa, pois ocorre freqüentemente uma formação de metabólitos inibidores, bem como de compostos recalcitrantes (MARGESIN; SCHINNER, 1997). Embora que, a biorremediação não possa remover completamente os poluentes, é um método geralmente limpo e seguro e que deveria ser levado em consideração durante avaliação de qualquer solo ou água contaminada com petróleo.

2.5. Evidências das vias de clivagem do catecol

Embora os substratos que possuem estruturas químicas similares sejam frequentemente mineralizados pelo mesmo tipo de via catabólica, geralmente são catabolizadas por enzimas diferentes. A biodegradação de compostos sintéticos é dependente da evolução de enzimas catabólicas apropriadas e a flexibilidade de vias com enzimas de ampla especificidade, constituem uma vantagem seletiva. Os microorganismos que apresentam este tipo de enzimas e vias catabólicas alternativas, podem ser capazes de utilizar mais eficientemente uma mistura de substratos, do que os microorganismos que apresentam vias distintas para cada substrato (LYNCH; HOBBIÉ, 1988).

Nos últimos trinta anos, as vias metabólicas utilizadas nos processos de biodegradação foram elucidadas, identificaram-se os metabólitos intermediários e os sistemas enzimáticos foram caracterizados (SMITH, 1990). Compostos aromáticos são geralmente convertidos durante o processo de degradação através da incorporação de grupos hidroxila, por mono ou dioxigenases no substrato aromático, produzindo dihidroxiaromáticos. As dioxigenases atuam

ainda na clivagem de intermediários tais como catecóis, protocatecóis e ácido gentísico (GIBSON, 1968).

Segundo Lynch e Hobbie (1988) e Smith (1990), o catabolismo do anel benzênico requer hidroxilação e esta reação é catalisada por oxigenases que inserem oxigênio molecular no anel benzênico. Os compostos intermediários di e/ou tri-hidroxilados são, por sua vez, transformados por dioxigenases. As duas vias metabólicas empregadas, ambas apresentando o mesmo modo inicial de ataque, resultam na formação de catecol, o qual é posteriormente catabolizado pela enzima 1,2-dioxigenase (via ortoclivagem) ou 2,3-dioxigenase (via metaclivagem) (figura 4). O catecol é um produto intermediário do catabolismo aeróbio de outros compostos aromáticos como naftaleno, tolueno, fenol, e a clivagem do anel aromático é a reação chave na oxidação destes compostos (figura 5).

Na última fase do catabolismo dos hidrocarbonetos aromáticos, o produto resultante da abertura do anel é convertido em intermediários do metabolismo central (acetil-Co-A, oxalacetato e piruvato) (KANALY; HARAYAMA, 2000).

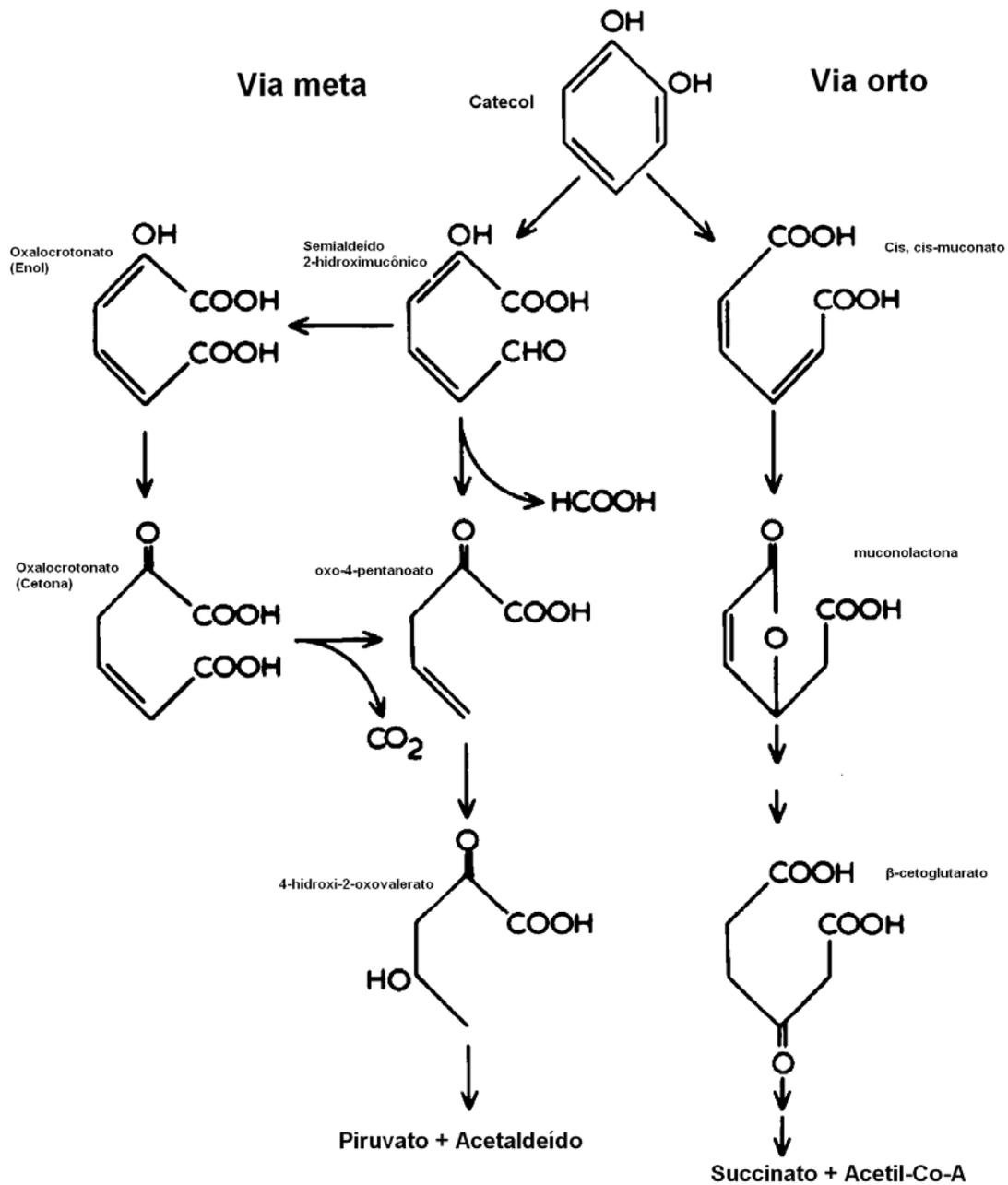


Figura 4 - Representação da degradação do catecol pelas vias meta e orto.
 Fonte: www.e-escola.pt (modificado)

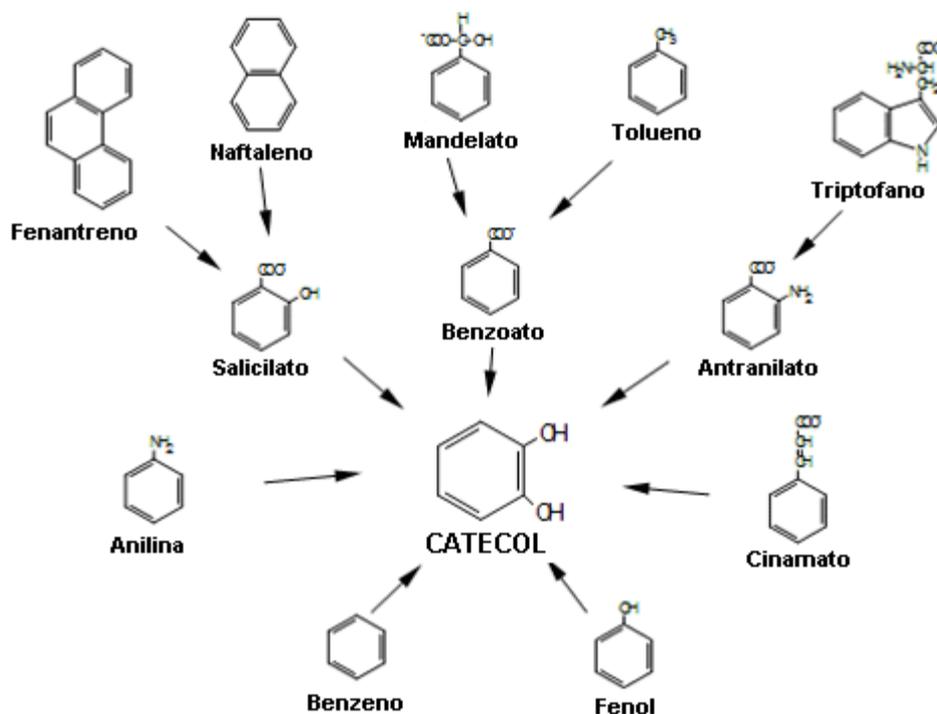


Figura 5 - Transformação de compostos aromáticos em catecol. Fonte: www.e-escola.pt (modificado).

2.6. Os microrganismos e o solo

HANDELSMAN (2004) definiu o solo como um órgão vivo da Terra. Uma outra definição dada por TATE (1995) descreve-o como sendo a camada superior da superfície terrestre, que consiste de um complexo de seres vivos, minerais e matéria orgânica cujas interações resultam em suas propriedades específicas (estrutura, fertilidade, matéria orgânica, capacidade de troca iônica, etc.).

É o meio natural onde os microrganismos vivem, multiplicam-se e morrem. O solo contém uma gama extensa de microrganismos descrita como “black box” (PAUL; CLARK, 1989).

Os organismos do solo não são apenas seus habitantes, mas também seus componentes. A biodiversidade e a atividade biológica estão estreitamente e diretamente relacionadas a funções e características essenciais para a

manutenção da capacidade produtiva. O que distingue o solo de outras formações geológicas é justamente a sua atividade biológica, devido principalmente à diversidade de microrganismos que nele existem (VARGAS; HUNGRIA, 1997). De fato, os microrganismos constituem uma interface biológica com os ambientes físicos e químicos da Terra, seja atuando diretamente em processos como a mineralização da matéria orgânica ou indiretamente, através de simbioses como na fixação de nitrogênio (O'DONNELL; GORRES, 1999). Sem os microrganismos, os solos não seriam formados, uma vez que, somente a intemperização físico-química das rochas matrizes resultaria em terrenos sem nenhuma fertilidade. Os microrganismos formam a chamada matéria orgânica viva do solo. Quanto maior a biomassa de um solo, maior o seu potencial de estoque de nutrientes através do acúmulo destes nas células microbianas (BUSCOT, 2005).

O papel dos microrganismos na manutenção dos processos biológicos ainda é pouco conhecido e estudado. Sabe-se, contudo, que os microrganismos participam de processos ecológicos bastantes importantes, tais como a fotossíntese oxigênica, ciclagem de matéria orgânica, ciclos biogeoquímicos, e manutenção da fertilidade e estrutura de solos (TRÜPER, 1992). Assim, a existência de seres vivos no planeta Terra está intimamente ligada à diversidade e atividade metabólica de microrganismos na natureza. Estudos mostram um número grande de índices para calcular a população microbiana, entretanto todos chegam a um aspecto comum: a diversidade dos microrganismos de solo é gigantesca (WARD, et al., 2003).

Através de técnicas tradicionais, geralmente são encontradas no solo bactérias do gênero: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Caulobacter*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Xanthomonas* (ATLAS; BARTHA, 1998).

2.7. Diversidade genética dos microrganismos do solo

Não é surpreendente que poucas observações importantes, relacionadas com ecologia microbiana, antecederam as técnicas moleculares, visto que, antes destas terem sido desenvolvidas, as informações a respeito das comunidades microbianas eram coletadas diretamente do ecossistema ou dos microrganismos isolados (ATLAS; BARTHA, 1998).

A imensa diversidade genética e fenotípica encontrada nas bactérias do solo a torna uma das comunidades mais difícil de se estudar. Deste modo, apenas o uso da taxonomia tradicional não supre as necessidades para o conhecimento de uma espécie bacteriana, tendo em vista a necessidade de situá-la, sobretudo, em seu contexto ecológico (LYNCH et al., 2004; CANHOS; MANFIO, 1999). Em virtude da sua longa história evolutiva e da necessidade de adaptação aos mais distintos ambientes, os microrganismos procarióticos acumularam uma impressionante diversidade genética, que excede, em muito, a diversidade dos organismos eucariontes (WARD, 1998; HUNTER-CEVERA, 1998). No entanto, a diversidade destes microrganismos é tão vasta quanto desconhecida, pois o estudo da diversidade microbiana apresentava muitos obstáculos, como as dimensões microscópicas, descrições taxonômicas incompletas e inexistência de meios de isolamento e cultivo apropriados para a vasta maioria dos microrganismos (HUNTER-CEVERA, 1998). Um grama de solo, por exemplo, pode conter 10 bilhões de microrganismos, representando milhares de espécies e dependendo do solo até 99,8% das espécies microbianas podem ser desconhecidas (ROSSELLO-MORA; AMANN, 2001; STREIT et al., 2004).

Ao contrário das plantas e dos animais, as bactérias possuem morfologias tão simples que não podem ser usadas para definir sua filogenia. A fisiologia bacteriana, apesar de ser extremamente útil, ainda é muito limitada (WOESE, 1987).

Com o advento das técnicas de reação em cadeia da polimerase e sequenciamento de DNA (SANGER et al., 1977) as relações filogenéticas podem ser agora determinadas muito mais facilmente, com mais detalhe e profundidade (LANE et al., 1985; QU et al., 1983).

Em 1965 Zuckerkandl e Pauling, em seu clássico artigo “*Molecules as documents of evolutionary history*”, anteviram o futuro dos estudos em filogenética e evolução usando a comparação de seqüências de proteínas para inferir as relações evolutivas entre organismos (ZUCKERKANDL; PAULING, 1965). O conceito de relógio evolucionário ou cronômetro molecular utilizado por Kimura (1968) está relacionado com a taxa da mudança genotípica dos organismos (WOESE, 1987). Em princípio, qualquer molécula que sofre mutações aleatórias, em determinado período de tempo, pode ser considerada um cronômetro. A quantidade de mudanças que uma seqüência acumula (formalmente uma distância) é o produto de uma taxa (na qual as mutações tornam-se fixas) versus um tempo (sobre o qual as mudanças ocorreram) (WOESE, 1987). As moléculas mais úteis para a medida filogenética representam funções altamente conservadas e as mudanças nestas seqüências são lentas o suficiente para cobrir todo o espectro evolucionário.

2.8. 16S rDNA (DNA ribossomal) como marcador molecular para inferir filogenia bacteriana

A taxonomia de bactérias, em geral, esteve em constantes modificações por mais de 100 anos. Os sistematas davam grande valor a testes fenotípicos e características morfológicas nos antigos esquemas de classificação, resultando na formação de grupos taxonômicos relativamente heterogêneos e muitas vezes artificiais (HUGENHOLTZ et al., 1998; PACE, 1997). Entretanto, nas últimas quatro décadas, com o desenvolvimento nas áreas de microbiologia, bioquímica, genética, biologia molecular, bioestatística e bioinformática, a taxonomia de procariotos sofreu profundas alterações na direção de um sistema que refletisse as relações evolutivas entre os organismos, aproximando a classificação microbiana o melhor possível da realidade biológica (COUTINHO et al., 1999; ROSADO et al., 1997).

Pace et al. (1986) foram os primeiros autores a sugerir o uso do gene 16S rDNA como um marcador molecular para o estudo de populações microbianas em

amostras ambientais, independente do seu cultivo. Os rRNAs são moléculas que ocorrem em todos os organismos e mudam em taxas bastante diferentes, permitindo a mensuração da maioria das relações filogenéticas. Atualmente, análises comparativas da estrutura primária dos genes de rDNA transformaram a taxonomia microbiana de um simples sistema de identificação para um sistema estruturado de sistemática baseado na história evolutiva dos organismos (OLSEN et al., 1994).

Carl Woese (1987) publicou seu trabalho sobre o uso de cronômetros filogenéticos, principalmente o 16S rRNA, o que mudou o rumo da taxonomia de procariotos. Através de sequenciamento, ele demonstrou que o 16S rDNA seria extremamente útil na afiliação filogenética de bactérias em espécies, gêneros e famílias (WOESE, 1987).

O desenvolvimento rápido dos métodos de sequenciamento de DNA e o acúmulo da informação de seqüências em bases de dados públicas de livre acesso (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) têm permitido a análise comparativa da similaridade entre linhagens microbianas e é agora procedimento padrão em sistemática microbiana.

Análises de macromoléculas envolvidas no processamento da informação contida nos ácidos nucléicos (replicação do DNA, transcrição, e tradução) geralmente produzem uma árvore filogenética apresentando a topologia dividida nos três Domínios (Bacteria, Archaea e Eucarya). Sendo que, os dois primeiros Domínios compreendem os organismos constituídos por células procarióticas e o último engloba aqueles formados por células eucarióticas (WOESE et al., 1990). Por outro lado, análises filogenéticas baseadas em genes metabólicos ou regulatórios não atingem o mesmo resultado (DOOLITTLE, 1999). Além disso, os RNA ribossômicos e outros genes centrais envolvidos na transferência de informações, aparentemente não sofreram uma extensa transferência lateral, produzindo a mais coerente linha para entender e inter-relacionar os principais ramos evolutivos da árvore da vida (OCHMAN et al., 2000).

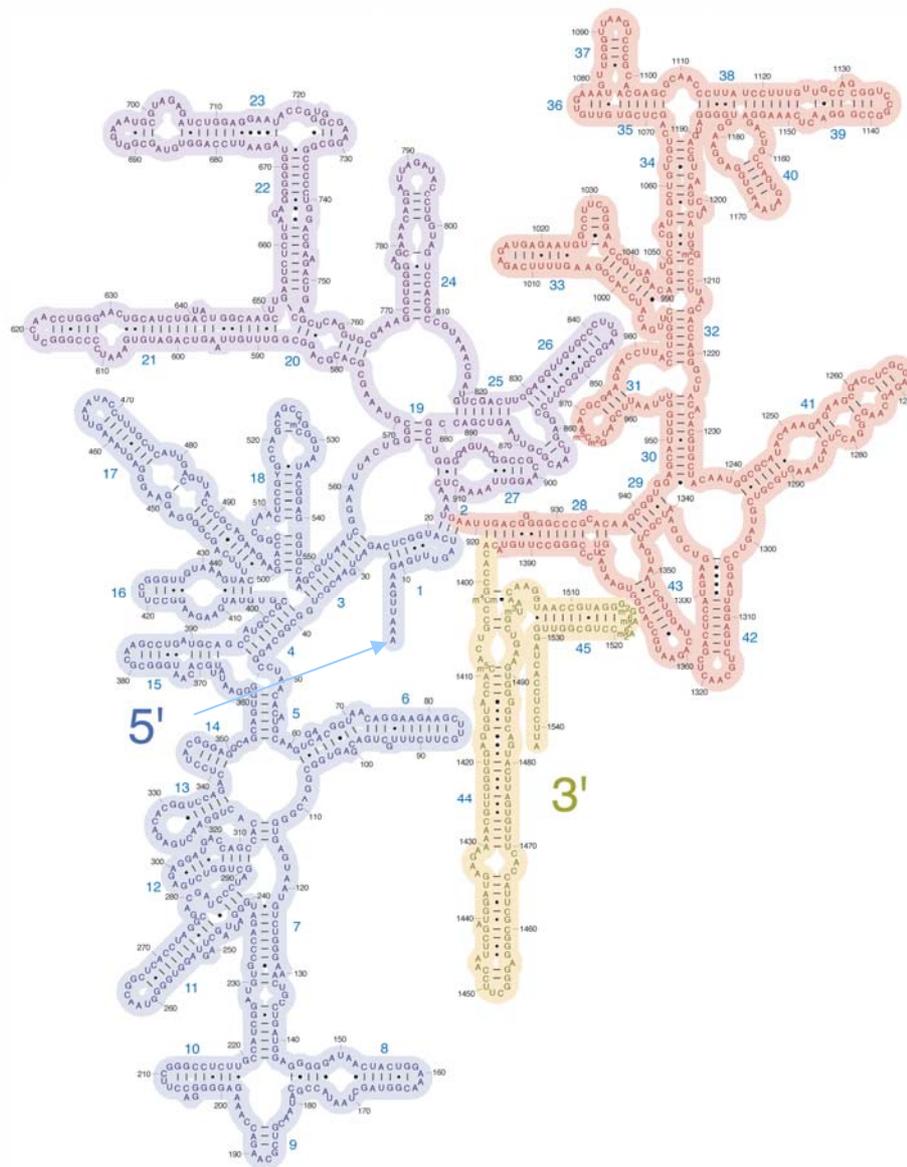


Figura 6 - Modelo da estrutura secundária do 16s rRNA de *Escherichia coli*.
 Fonte: http://rna.ucsc.edu/rnacenter/ribosome_images.html

Outro grande impacto do uso de seqüências de rDNA como ferramenta na classificação microbiana se deu em estudos de diversidade de microrganismos a partir de amostras ambientais. Diversos grupos de microrganismos nunca antes cultivados puderam ser detectados no ambiente por meio das seqüências do 16S rDNA e, através da comparação com seqüências depositadas em bases de dados, observou-se que muitas delas pertenciam a organismos filogeneticamente

não relacionados às divisões bacterianas já existentes (HUGENHOLTZ et al., 1998; PACE et al., 1986). Este impacto na visão da diversidade microbiana pode ser exemplificado pelo número de divisões existentes dentro do Domínio Bactéria: em 1987 eram 12 divisões, todas elas descritas com base em organismos cultiváveis (WOESE, 1987); já em 1998 o número de divisões publicado havia aumentado para 36 (HUGENHOLTZ et al., 1998), sendo que 13 delas eram divisões candidatas, ou seja, sem representante cultivado e descrição fenotípica. Um levantamento mais recente, publicado em 2003, apontou como 53 o número de divisões dentro do Domínio Bactéria, sendo que aproximadamente 50% destas não possuem representantes cultivados (RAPPE; GIOVANNONI, 2003). Hoje, o cultivo de representantes destas divisões é um dos maiores desafios para taxonomistas.

A raiz da árvore filogenética é a posição do último ancestral comum compartilhado por todos os membros da árvore. A posição dessa raiz junto dos procariotos não é, apesar de tudo, um senso comum. Algumas raízes alternativas foram propostas, que implicariam diferentes relações filogenéticas e diferentes classificações. Acreditava-se que arqueobactéria seria um grupo antigo por causa de sua estrutura celular incomum, mas estudos atuais demonstram que elas e os eucariotos estão mais próximos entre si e devem ser colocados juntos em um grupo maior chamado de neomura, que significa paredes novas (CAVALIER-SMITH, 1998). Essa estrutura incomum da parede celular das arqueobactérias pode ser explicada como adaptações relativamente recentes à vida em ambientes extremos (CAVALIER-SMITH, 2002). Estes organismos possuem um ancestral comum que evoluiu por volta de 850 milhões de anos atrás.

Evidências advindas de seqüências moleculares, ultra-estrutura celular, evolução da fotossíntese, estrutura e bioquímica das membranas e os mecanismos para motilidade, reforçam o pensamento que, as Arqueas são incluídas como um subgrupo relativamente menor dentro do reino Bactéria e que Negibactéria seria o grupo mais antigo da árvore da vida (CAVALIER-SMITH, 2002).

A raiz da árvore da vida e os relacionamentos entre os principais grupos ainda são controversos. Contudo, somente uma representação adequada dos microrganismos presentes nos diversos ambientes, e estudos aprofundados sobre

as transferências laterais de genes, entre outros, poderão elucidar algumas dúvidas que persistem para a construção do modelo que irá finalmente representar adequadamente as relações filogenéticas (DUTTA; PAN, 2002).

2.9. Principais divisões bacterianas presentes em solos

As divisões bacterianas seriam categorias hierárquicas equivalentes aos filos da taxonomia de animais e plantas.

Particularmente o filo Acidobacteria é extremamente comum no solo (KENT; TRIPLETT, 2002), possui apenas 03 espécies que foram descritas e cultivadas (*Acidobacterium capsulatum*, *Geothrix fermentans*, e *Holophaga foetida*) (CANHOS et al., 1999). E até 2002 esse grupo continha poucas seqüências cadastradas no GenBank (HOLMES et al., 2000).

Outro grupo importante na microbiota do solo é o grupo dos Actinomycetos, composto de, aproximadamente, 10 a 33% das bactérias que existem no solo. São relativamente resistentes à dessecação em ambientes como desertos; crescem melhores em ambientes neutros ou alcalinos e são sensíveis a solos ácidos (ATLAS; BARTHA, 1998; HOLMES et al., 2000).

A maioria das bactérias do filo Actinobacteria tem como característica a produção de odor de mofo e degradação de substâncias muito complexas. Portanto, são importantes para o melhoramento do solo (CANHOS et al., 1999; HOLMES et al., 2000). Trabalhos relatam que o filo Actinobacteria geralmente é encontrado em pequenas comunidades em relação a outros filos (DUNBAR et al., 2002; KENT; TRIPLETT, 2002) e sua freqüência em solos cultivados não é afetada (MCCAIG et al., 1999).

O filo Proteobacteria apresenta grande diversidade de morfologia celular e fisiologia. É o maior grupo, composto por mais de 1.875 espécies. As estratégias de obtenção de energia são várias, incluindo metabolismo quimiolitotróficos, quimiorganotróficos, fototrófico, além de outras vias metabólicas especializadas em microrganismos adaptados a nichos ecológicos diversos. Este filo apresenta

coloração Gram-negativa e subdivisões como: alfa, beta, gama, delta e epsilon (α , β , γ , δ e ϵ respectivamente) (CANHOS et al., 1999).

O filo Planctomycetes é constituído por bactérias aeróbias encontradas principalmente em ambientes aquáticos. Este grupo tem como características: não apresentar peptidoglicano na parede celular e reprodução por brotamento (CANHOS et al., 1999).

2.10. Extração de DNA e métodos moleculares para análise de amostras ambientais

Com o desenvolvimento de técnicas para a análise dos ácidos nucléicos, DNA e RNA, o estudo da diversidade microbiana pôde ser explorado geneticamente, permitindo a identificação e enumeração de praticamente todos os membros da comunidade microbiana. A análise do DNA fornece informação sobre a composição (estrutura) da comunidade, enquanto que a análise do RNA pode elucidar a atividade metabólica (função) das populações microbianas particulares (VAN ELSAS et al., 1998).

A diversidade microbiana estrutural vem atualmente sendo estudada através de métodos que se baseiam na investigação de parte da seqüência do DNA, notadamente o gene 16S rDNA, em bactérias. Este é amplificado por PCR e posteriormente caracterizado através da clonagem e sequenciamento ou então analisado por eletroforese, por meio das técnicas de ARDRA (amplified rDNA restriction analysis), T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism), RISA (ribosomal intergenic spacer length polymorphism), DGGE/TGGE (denaturing or temperature gradient gel electrophoresis) e SSCP (single-strand conformational polymorphism), obtendo-se um perfil da comunidade microbiana (KOZDROJ; VAN ELSAS, 2001; RANJARD et al., 2000).

A diversidade funcional vem sendo estudada por métodos baseados em atividades enzimáticas específicas, utilização de fontes de carbono, e perfil de ácidos graxos fosfolipídicos (PFLA) que vêm sendo bastante difundidos. (UCHIYAMA et al., 2005). Desse modo, os microrganismos do solo podem ser

classificados em grupos funcionais de acordo com suas atuações nos processos biológicos do ecossistema. Exemplos desses grupos são os microrganismos envolvidos no ciclo do nitrogênio (diazotróficos, desnitrificadores, amonificadores) e os envolvidos no ciclo do carbono, desde os degradadores de polímeros complexos até Arqueas, incluindo metanogênicas e metanotróficas (TORSVIK; OVREAS, 2002).

Segundo Maciel (2004), para o estudo da diversidade microbiana através de técnicas moleculares, os ácidos nucléicos, DNA ou RNA, devem ser inicialmente extraídos das populações microbianas mistas e utilizados nas diferentes estratégias moleculares, a fim de identificar os membros da população e determinar a complexidade da comunidade, esclarecendo as relações filogenéticas entre as espécies microbianas (ROOSE-AMSALEG et al., 2001; COUTINHO et al., 1999). Existem diversas técnicas que visam extrair o DNA total de amostras ambientais. Porém, nenhum método é universalmente aplicável para o estudo de bactérias autóctones, pois cada tipo de amostra, devido a sua própria natureza, requer a otimização de um método de extração próprio (ZHOU et al., 1996).

Diversos métodos de extração de DNA de solo encontram-se disponíveis na literatura. Basicamente, eles envolvem a ruptura das células microbianas presentes na amostra de solo, liberando o material genético (DNA) que é posteriormente purificado tornando-o apto para uso em reações de biologia molecular, como restrição enzimática, amplificação de sequências específicas por PCR e hibridização (MACIEL, 2004).

O solo contém grande quantidade de ácido húmico, material orgânico formado pela agregação de pequenas moléculas presentes no solo resultantes da degradação química e biológica de resíduos vegetais e da atividade de síntese dos microrganismos. O ácido húmico é constituído por dois componentes principais: anéis aromáticos derivados de lignina e nitrogênio de origem protéica de microrganismos. Substâncias húmicas são compostas por moléculas orgânicas heterogêneas, de ocorrência natural, com coloração entre amarelo e preto, com pesos moleculares relativamente altos e resistentes à degradação (ROOSE-AMSALEG et al., 2001). Essas substâncias, em função de suas características químicas, são normalmente extraídas juntamente com os ácidos nucléicos da

amostra ambiental. Os ácidos húmicos possuem a capacidade de inibir a atividade da Taq DNA polimerase, enzima responsável pela amplificação em cadeia do DNA na técnica de PCR. Desta forma, o DNA extraído através da lise direta deve passar por um tratamento de purificação, com a finalidade de remover os inibidores de Taq DNA polimerase (COUTINHO et al., 1999).

Atualmente sabemos que a variabilidade genética existe no nível dos ácidos nucléicos e sua única origem é a mutação (CALCAGNOTTO, 2001). A vida na terra é datada em 3,8 bilhões de anos de evolução e durante todo esse período a composição geoquímica da biosfera foi moldada, em sua maior parte, por atividades microbianas. Até recentemente, os investigadores não tinham nenhuma idéia da diversidade real dos microrganismos, e seus conhecimentos limitavam-se aos que eram passíveis de cultivo. Livre das polarizações de estudos baseados em cultivo, análises de biologia molecular revelaram uma vasta disposição de grupos microbianos novos. Muitos destes grupos são amplamente difundidos, abundantes e encontram-se dentro das novas divisões que se ramificam da árvore filogenética. Apesar da predominância dos microrganismos durante a história da vida, os princípios gerais da teoria da evolução microbiana e sua ecologia ainda não são bem esclarecidos (DELONG; PACE, 2001).

Sabe-se que microrganismos indígenas (autóctones) são capazes de sobreviver, crescer e metabolizar em seu habitat e que a biodegradação representa um dos mecanismos primários pelo qual, compostos poluentes são eliminados do meio ambiente (ALEXANDER, 1977). Este processo ocorre ao nosso redor todo o tempo, sendo parte de um ciclo natural que forma as bases da vida no nosso planeta (WYATT; PALMER, 1991). Desse modo, é necessário implementar estudos e estratégias de biorremediação para os rejeitos da indústria petrolífera que atendam às necessidades do ambiente, levando em consideração a diversidade e a extrema importância da microbiota dos solos, com a qual esperamos que o presente trabalho possa colaborar.

3. CAPÍTULO 1

(**Trabalho Completo** apresentado ao SINAFERM 2005: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos)

MICROORGANISMOS UTILIZADORES DE TOLUENO COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO ISOLADOS DE UM *LANDFARM* DE BORRAS OLEOSAS

Authors: SANTOS, A.C.F., MACIEL, B.M., DIAS, J.C.T., REZENDE, R.P.

Institution: Departamento de Ciências Biológicas, UESC – Universidade Estadual de Santa Cruz, Rod. BR 415, Km 16, Ilhéus-BA, 45650-000, BRAZIL.

MICROORGANISMOS UTILIZADORES DE TOLUENO COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO ISOLADOS DE UM *LANDFARM* DE BORRAS OLEOSAS

Ana Cácia Freire dos Santos¹, Bianca M. Maciel¹, João C. T. Dias¹, Rachel P. Rezende¹

¹Universidade Estadual de Santa Cruz – Depto. de Ciências Biológicas
Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 16 Salobrinho, Ilhéus-BA 45650-000 - E-mail:
anacaciafreire@yahoo.com.br

1. Resumo

O tolueno é um organopoluente carcinogênico e neurotóxico isolado do petróleo, amplamente utilizado na indústria, categorizado como um dos poluentes prioritários para agências de proteção ambiental e organizações de saúde. A habilidade de alguns microrganismos para transformar formas de matéria orgânica fazem deles excelentes agentes biodegradadores. Existe um interesse geral nos estudos de microrganismos indígenas capazes de degradar poluentes como os derivados do petróleo. Isolados de um *Landfarm* foram utilizados para o desenvolvimento do ensaio de crescimento microbiano e degradação de substrato, sendo que a única fonte energética oferecida aos isolados foi o tolueno. Os resultados desse estudo demonstram que os microrganismos do *Landfarm* possuem a habilidade para degradar hidrocarbonetos derivados do petróleo, deles retirando sua fonte de energia.

2. Introdução

As habilidades dos microrganismos para transformar formas de matéria orgânica (natural ou sintética) fazem deles excelentes candidatos a serem utilizados em processos de biorremediação. Porém o papel dos microrganismos na manutenção dos processos biológicos ainda é pouco conhecido e estudado.

Alguns dos componentes da biodiversidade dos solos e ambientes aquáticos têm aplicações na recuperação de sítios contaminados pela presença de poluentes tóxicos. No Brasil, existem alguns exemplos de processos de remediação biológica de poluentes no solo, em setores específicos da indústria. Como exemplo, a Petrobrás, tem realizado experimentos com a avaliação dos efeitos dos derivados do petróleo em populações bacterianas através de *Landfarms* (SILVA NUNES et al., 2004).

Dados publicados em 2004 por Streit et al. apontam para o fato de que até 99,8% dos microrganismos do solo de alguns ambientes não são cultiváveis através do emprego de métodos microbiológicos convencionais. E, portanto, os microrganismos isolados não representam numericamente e em variedade de táxons o total presente neste ambiente e sim o favorecimento de grupos de organismos de crescimento rápido e melhor adaptado às condições de cultivo utilizadas nos experimentos de isolamento.

Tolueno, segundo Hallier-Soulier et al. (1996), é um componente orgânico isolado do petróleo, amplamente utilizado na indústria como solvente, que vem sendo categorizado como um dos poluentes prioritários para algumas agências de proteção ambiental, ministérios do meio ambiente e organizações de saúde. Este pertence a uma família de organopoluentes carcinogênicos e neurotóxicos que freqüentemente contaminam o solo e ambientes aquáticos como consequência de vazamentos, e é conhecido por ser extremamente tóxico as células, mesmo em baixas concentrações (BONT, 1998). Ao se acumular, ele rompe a membrana celular, assim afetando a estrutura e função da célula.

A degradação do tolueno nos solos está sujeita a um período de prévia adaptação, durante o qual se verifica o crescimento dos microrganismos intervenientes. Compostos aromáticos são geralmente convertidos durante o processo de degradação através da incorporação de grupos hidroxila, por mono ou dioxigenases no substrato aromático, produzindo dihidroxiaromáticos. As dioxigenases atuam ainda na clivagem de intermediários tais como catecóis, protocatecóis e ácido gentísico (GIBSON, 1968).

A relação entre a efetividade da biorremediação e a população específica de degradadores ainda não é muito clara, tornando necessário à aceleração de

estudos sobre as microbiotas que demonstram uma habilidade inerente para degradar esses contaminantes.

3. Material e Métodos

As mostras de solo foram coletadas do *Landfarm* de borras oleosas da refinaria Landulpho Alves, São Francisco do Conde – BA. Amostras de solo de Mata Atlântica sem histórico de contaminação por petróleo também foram coletadas para o controle negativo das amostras.

Foram retiradas em torno de 500 g de solo, de 3 a 8 cm de profundidade, com auxílio de pá de jardinagem previamente esterilizada, acondicionados em saco plástico estéril, hermeticamente fechado e mantido a temperatura ambiente até sua chegada ao laboratório onde a amostra foi processada. Cinco gramas de solo foram diluídos em 50 mL de solução tampão com KH_2POH e K_2HPO_4 , em Erlenmeyer (250 mL), e submetidos durante 2 dias à agitação contínua em “shaker” (200 rpm/temperatura ambiente), para obtenção do inóculo. O mesmo procedimento foi repetido com o solo não impactado.

A enumeração total dos microrganismos foi feita através da técnica de Contagem Padrão em Placa de células viáveis (ufc – unidades formadoras de colônias), como descrita na literatura (CLARK, 1965). E a enumeração de microrganismos utilizadores de petróleo e seus derivados, foi avaliada da mesma forma que a previamente descrita, porém em meio de degradação que continha apenas os nutrientes inorgânicos requeridos para o crescimento microbiano, mas sem uma fonte intrínseca de carbono, pois o suplemento de contaminante (petróleo) serviu como única fonte de carbono (KORDA et al., 1997). O número de microrganismos foi comparado entre os diferentes solos a partir da leitura dos crescimentos obtidos. O fator de diluição foi considerado para estimar o número de microrganismos representantes de cada processo por grama de solo.

A partir do crescimento isolado de colônias no meio de degradação foram obtidas culturas isoladas em meio TSA (tryptic soy Agar – MERCK).

Ensaio da degradação do tolueno, a partir dos isolados, foram conduzidos usando método descrito por Leahy e Colwell (1990), em meio mínimo mineral

(NaH_2PO_4 0,4%, KH_2PO_4 0,15%, NH_4ClO 1,0%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,02%, CaCl 0,001%) 10 mL, 1 mL de inóculo e 0,05 μL de tolueno. Todas as análises que envolveram a utilização direta do tolueno foram feitas em capela química de exaustão classe 100 e com o uso de luvas e máscaras de proteção contra gases, para proteção do manipulador.

As determinações quantitativas, do crescimento e do catabolismo do tolueno, foram obtidas pela equação da curva de calibração, onde foram construídos gráficos lineares, conforme método previamente descrito por Mikesell et al. (1994).

Diferentes concentrações de tolueno, dissolvidas em etanol 70%, foram medidas em espectrofotômetro de varredura, HP-Shimadzu modelo 10 AD equipado com detector UV (SPD-M6A, Shimadzu) para obtenção da curva de calibração (comprimento de onda ideal para leitura das amostras, 480 nm para turvação/crescimento e 260 nm para degradação do tolueno).

As taxas de degradação foram calculadas através de análise de regressão da porção linear das curvas progressivas, como descrito por Tros et al. (1996); e as análises estatísticas dos dados foram feitas, utilizando o programa Statistical Package for Socil Science (SDSS), por regressão linear e correlação de Pearson. O nível de significância foi estabelecido em $\alpha = 0,05$.

Isolados bacterianos foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 10 mL de meio mínimo acrescidos de 0,5% de tolueno. Os frascos foram incubados sob agitação de 80 rpm por 24 horas a temperatura ambiente. As células foram sedimentadas por centrifugação, lavadas com tampão Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8,0) e utilizadas nos ensaios para determinação da via degradativa do catecol, segundo a metodologia descrita por Hammann e Kutzer (1998). A seguir, as células obtidas foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 1,5 mL de tampão Tris-HCl (0,05 mmol/L pH 8,0), 0,3 mL de tolueno e 1,5 mL de catecol a 9 mmol/L, os quais foram agitados vigorosamente e incubados a 28°C. No caso de metaclivagem do substrato, uma cor amarela seria formada dentro de 15 a 60 minutos devido ao acúmulo de ácido hidroximucônico semialdeído. Quando a cor amarela não foi observada, os tubos foram incubados por 12 horas e então testados quanto a presença de β -ceto adipato pela reação de Rothera (STANIER et al., 1966), que consiste na adição de 1 g de uma mistura seca constituída de 60

g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,6 g de nitroprussiato de sódio e 0,5 mL de solução de amônia (33% p/v) aos tubos de ensaio. A formação da coloração roxa indica a presença da via de ortoclivagem.

4. Resultados e Discussões

Entre os métodos utilizados para a eliminação de compostos poluentes da indústria petroquímica, o *Landfarm* é o escolhido por várias refinarias. Esse processo consiste na dispersão dos resíduos no solo e ocorrência de biodegradação por microrganismos nativos. Estudos vêm demonstrando a existência de uma grande diversidade de biodegradadores presentes em amostras desses solos que ocorrem naturalmente (LEAHY; COLWELL, 1990).

Foram isoladas 60 linhagens microbianas capazes de utilizar petróleo como única fonte de carbono a partir do solo de *Landfarm* de borras oleosas da Refinaria Landulpho Alves. Das 60 linhagens, 10 foram capazes de crescer na presença de tolueno como única fonte de carbono. Muitos dos isolados do solo do *Landfarm* apresentaram morfologia dúbia.

Os microrganismos degradadores de petróleo e suas frações são encontrados não só em áreas poluídas como também estão presentes, em concentrações menores, na maioria dos solos e sedimentos (ALEXANDER, 1981). Assim sendo, não é surpresa que bactérias oxidantes de hidrocarbonetos sejam encontradas nas mais diversas áreas naturais, embora em concentrações celulares bastantes variáveis. A estimativa do número de microrganismos, realizada pela técnica de diluição e plaqueamento (contagem de unidade formadora de colônia – ufc/mL), demonstrou que a microbiota indígena isolada do local contaminado (*Landfarm*) está mais adaptada às condições nutricionais e físico-químicas (figura 1). Um processo seletivo ocorre em solos poluídos onde a degradação microbiana de qualquer hidrocarboneto irá depender da estrutura molecular do microrganismo. Tais microrganismos devem desenvolver vias metabólicas complexas com enzimas especializadas e outras características celulares que um organismo deve possuir para degradar estes compostos (HOPPER, 1991).

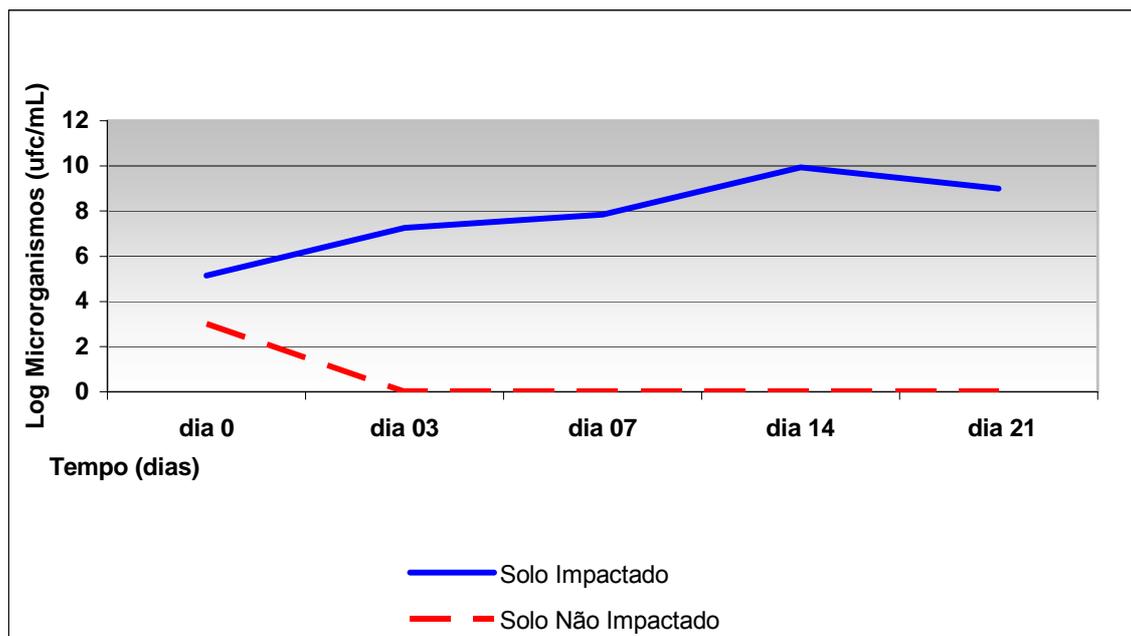


Figura 1: Curva de Crescimento Microbiano em Meio Contendo Petróleo como Substrato. Os inóculos microbianos foram feitos a partir de solo de *Landfarm* e de solo de Mata Atlântica sem histórico de contaminação.

Por serem os microrganismos os principais responsáveis pela transformação da matéria orgânica poluente, o aumento da população microbiana, ou de sua atividade é esperada quando a degradação está ocorrendo. O aumento na capacidade de biodegradação dos hidrocarbonetos que ocorre em algumas populações de microrganismos nativas, em ambientes poluídos com óleo, é chamado de adaptação (SPAIN et al., 1980). Segundo Leahy e Colwel (1990), há três mecanismos inter-relacionados, que podem contribuir para a adaptação: indução e/ou repressão de enzimas específicas, mudanças genéticas que resultam na aquisição de novas atividades metabólicas e enriquecimento seletivo de organismos capazes de transformar compostos. Neste trabalho foi feito o isolamento de culturas puras pra avaliar sua eficácia quanto à degradação do tolueno.

Quando os microrganismos foram transferidos para meio contendo somente tolueno como fonte de carbono, notou-se que o crescimento começava a partir do primeiro dia. Segundo estudos desenvolvidos por Crapez et al. (2000), a adaptação ao tolueno produz uma diferença significativa no aumento da biomassa

de comunidades microbianas. Em outros casos, havia o decréscimo de alguns microrganismos, quando expostos ao composto, porque além do efeito direto do tolueno na população microbiana, há também o efeito tóxico dos produtos liberados, durante o processo de degradação. Alguns microrganismos apresentaram comportamento neutro em resposta à adição de tolueno e nesses casos a população permanecia inalterada.

Observa-se pelos gráficos de correlação de Pearson e regressão linear que, de acordo com as análises, não ocorreu relação estatisticamente significativa, entre a degradação e o crescimento bacteriano das 60 amostras obtidas durante o experimento, pois o valor do R (estimativa do coeficiente de correlação de Pearson) foi maior que 0,050 ($R=0,090$). Os valores não acompanham um crescimento linear, como demonstrado na Figura 2.

Na leitura de absorvância, para detecção do tolueno, foi observado que dos 60 isolados microbianos 28 apresentaram uma sobreposição de leitura para a curva de calibração obtida com o controle negativo (meio mínimo + tolueno). Dentre os 28, estavam nove das 10 amostras que demonstraram as maiores taxas de crescimento na presença de tolueno como única fonte de carbono. Com estes dados, acredita-se que o tolueno tenha sido degradado a subprodutos intermediários (provavelmente compostos aromáticos) que possuíam as leituras de absorvância no mesmo comprimento de onda que o tolueno (260 nm). Segundo Austin et al. (1977), a degradação dos compostos aromáticos exige uma enorme variedade enzimática. Dessa forma, um único microrganismo, nem sempre será capaz de esgotar um hidrocarboneto até a sua forma mais simples (CO_2 e H_2O), tornando-se necessário à utilização de consórcios no emprego da biorremediação.

Hidrocarbonetos aromáticos são oxidados pelas dioxigenases a cis,cis-dihidrodiol, e este é espontaneamente transformado em catecol. O anel aromático dihidroxilado é, então, aberto por uma orto-clivagem oxidativa, resultando em ácido cis, cis-mucônico (SMITH, 1990). Este é metabolizado posteriormente a ácido β -cetoadipato, o qual é aberto oxidativamente para o ciclo tricarbóxico intermediário comum, ácido succínico, e Acetil-CoA. Alternativamente, o anel do catecol pode ser aberto por meta-clivagem; sendo que está via ainda não foi encontrada em fungos.

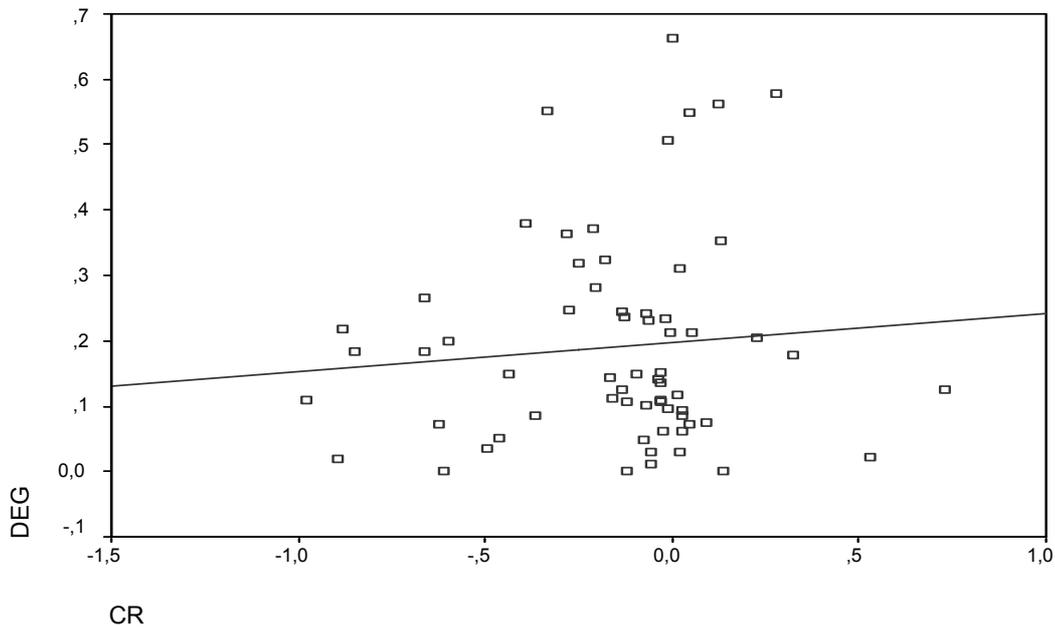


Figura 2. Gráfico de correlação linear entre o crescimento dos isolados microbianos e suas respectivas taxas de degradação do tolueno, onde DEG representa a degradação e CR o crescimento microbiano.

O destino dos hidrocarbonetos, além da produção de CO_2 na degradação total, pode também oferecer caminhos alternativos. Eles podem ser armazenados ou transformados em biomassa (BERTRAND et al., 1983; DUMENIL et al. 1988), ou convertidos em outros subprodutos. Em longo prazo, a maioria dos hidrocarbonetos é convertida a CO_2 ; entretanto, os produtos parcialmente oxidados podem ser mais tóxicos e mutagênicos que o hidrocarboneto e, portanto, existe a preocupação de que ocorra um aumento temporário na toxicidade e mutagenicidade durante o processo de biodegradação (WANG; BARTHA, 1990). Segundo Nunes-Halldorson et al. (2003), em alguns casos, mesmo após a degradação, o tolueno ainda apresenta uma toxicidade significativa. Essa toxicidade residual pode ocorrer devido à presença de intermediários tóxicos ou produtos finais. Por exemplo, o catecol é um intermediário comum a numerosas vias de degradação de compostos aromáticos (GIBSON; SUBRAMANIAN, 1984). Boyed et al. (1997) mostraram que o catecol era significativamente mais tóxico que o benzeno em bioensaio bacteriano. Assim, a presença desse tipo de

resíduos tóxicos pode ter causado a morte das células e conseqüentemente provocou uma taxa de crescimento negativo, entre o primeiro e o sétimo dia, pois as células que estavam presentes no momento zero (oriundas do inóculo) já não se apresentavam mais em suspensão no momento da última leitura (indicativo de morte celular).

Diversos métodos podem ser empregados para remover os resíduos de petróleo e seus derivados do solo e da água. Entre eles estão métodos físicos (aspersão, extração por vapor, estabilização, solidificação), químicos (foto-oxidação, dissolução, uso de detergentes) e biológicos (biorremediação) (ALEXANDER, 1981). Cada qual pode ser empregado no tratamento dos locais contaminados, sem uma regra geral de escolha, apenas avaliando-se as prioridades e particularidades do caso. Os tratamentos físicos possuem a vantagem de separar os contaminantes sem destruí-lo ou modificá-lo quimicamente, mas possui suas limitações (CUNHA; LEITE, 2000). A maioria dessas técnicas são muito dispendiosas para serem implementadas em larga escala e requerem controle e monitoramento contínuo pra se obter uma performance otimizada. Entretanto, usualmente eles não resultam numa destruição completa dos contaminantes. Processos biológicos, por outro lado, é uma vertente promissora para a remoção dos agentes contaminantes (SILVA NUNES et al., 2003), geralmente feito de forma simplificada e de baixo custo comparada com outras alternativas.

5. Conclusões

Os resultados desse estudo demonstram que os microrganismos do *Landfarm* possuem a habilidade para degradar hidrocarbonetos derivados do petróleo, deles retirando sua fonte de energia. Eles desempenham um papel importante na atenuação natural dos poluentes da indústria petrolífera. A presença de grande número de decompositores sugere que os microrganismos do solo têm se adaptado a poluição por hidrocarbonetos. Portanto, o *Landfarm* atende aos pressupostos quanto a sua capacidade biorremediativa.

Acredita-se que a biodegradação é o melhor processo que se conta para degradar e reduzir as concentrações do contaminante. Podendo remover hidrocarbonetos como o tolueno, e diminuir o tempo de remediação.

Não foi observada a existência de uma lógica de crescimento que obedeça a uma função linear, não havendo relação significativa entre o crescimento microbiano e a taxa de degradação. Apesar do crescimento ter proporcionado aumento de degradabilidade, a relação não foi estatisticamente significativa ($R > 0,050$).

Todos os 10 isolados capazes de crescer em meio contendo tolueno como única fonte de carbono realizavam a degradação de seu intermediário, catecol, por via de ortoclivagem.

Este estudo visou contribuir para as futuras decisões e intervenções de natureza institucional, de gestão a serem implementadas pelas Instituições públicas e privadas, a exemplo do possível redimensionamento dos rejeitos da indústria petrolífera, e que venham formar grupos de estudo visando a compatibilização entre a melhoria e preservação ambiental e a qualidade de vida das populações que sofrem influência dos impactos causados por acidentes envolvendo o derrame de petróleo ou seus derivados.

6. Referências Bibliográficas

ALEXANDER, M., 1981. Biodegradation of Environmental Concern. *Science*, v: 211: 132.

AUSTIN, B., et al., 1977. Numerical taxonomy and ecology of petroleum-degrading bacteria. *Appl Environ Microbiol*, v.34: 60-68.

BERTRAND, J.C.; RAMBELOARSOA, J.F.; RONTANI, G.; GIUSTI, G.; MATTEI, G., 1983. Microbial Degradation of Crude Oil in Sea Water in Continuous Culture. *Biotechnology Letters*, 5: 567 – 572.

BONT, J.A.M., 1998. Solvent-tolerant Bacteria in biocatalysis. *Focus* 16: 493 – 499.V

- CLARK, F., 1965. Agar Plate Method for Total Microbial Count. In: *Method for Soil Analysis*, vol. 2. American Society for Agronomy, Madson, WI, p 1460-1465.
- CRAPEZ, M. A. C., TOSTA, Z. T., BISPO, M. G. S., PEREIRA, D. C., 2000. Acute and chronic impacts caused by aromatic hydrocarbons on bacterial communities at Boa Viagem and Rio Branco Beaches, Guanabara Bay, Brazil. *Environmental Pollution*, 108: 291-295.
- CUNHA, C. D., LEITE S. G. F., 2000. Gasoline Biodegradation in Different Soil Microcosms. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31: 45 – 49.
- DUMENIL, G.; MATTEI, G.; SERGENT, M.; BERTRAND, J.C.; LAGENT, M.; PHAN-TAN-LUU, R., 1988. Application of a Doherty Experimental Design to the Optimization of Microbial Degrading of Crude Oil in Sea Water by Continuous Culture. *Applied. & Environmental Microbiology*, 27: 405 – 409.
- GIBSON, D.T.; KOCH, J.R.; SCHULD, C.L.; KALLIO, R.E., 1968. Oxidative Degradation of Aromatics Hydrocarbons by Microorganisms. *Biochemistry* 7: 3795 – 3802.
- GIBSON, D.T.; SUBRAMANIAN, V., 1984. Microbial Degradation of Aromatics Hydrocarbons. In: *D.T. Gibson (ed.). Microbial Degradation of Organic Compounds*. Plenum Press, New York, p. 181 – 252.
- HALLIER-SOULIER, S., DUCROCQ, V., MAZURE, N., TRUFFAUT, N., 1996. Detection and Quantification of Degradative Genes in Soils Contaminated by Toluene. *FEMS Microbiology Ecology* 20: 121-123.
- HAMMANN R.; KUTZNER, H.J., 1998. Key enzymes for the degradation of benzoate, m- and p-hydroxybenzoate by some members of the order Actinomycetales. *J Basic Microbiol* 38(3): 207-20.
- HOPPER, D.J., 1991. Aspects of the Degradation of Aromatics by Microorganisms. In: *Biodegradation: Natural and Synthetic Materials*. Betts, W.B. (ed). Spring-Verlang London Limited. London. p. 69 – 89.
- KORDA, A., SANTAS, P., TENENTE, A & SANTAS, R. (1997). Petroleum Hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in *situ*

treatments and commercial microorganisms currently used. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 677-689.

LEAHY, J.G., COLWELL, R.R., 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiol. Rev* 54: 305-315.

MIKESELL, M. D., KUKOR, J. J., OLSEN, R. H., 1994. Metabolic Diversity of Aromatic Hydrocarbon-degrading Bacteria from a Petroleum-contaminated Aquifer. *Biodegradation* 4: 249-259.

NUNES-HALLDORSON, V.S.; STAINER, R.L.; SMITH, G.B., 2003. Residual Toxicity After Biodegradation: Interactions among Benzene, Toluene, and Chloroform. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. *In press*.

SILVA NUNES, V., STEINER, R.B., SMITH, G.B., 2004. Residual Toxicity After Biodegradation: Interactions Among Benzene, Toluene and Chloroform. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 57: 162-167.

SMITH, M.R., 1990. the Biodegradation of aromatics Hydrocarbons by Bacteria. *Biodegradation* 1: 191 – 206.

SPAIN, J.C.; PRITCHARD, P.H.; BOURQUIN, A.W., 1980. Effects of Adaptation on Degradation Rates in Sediment/Water Cores from Estuarine and Freshwater Environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40: 726 – 734.

STANIER, R.Y.; PALLEVONI, N.J.; DOUDOROFF, M., 1996. The aerobic *Pseudomonas*: a Taxonomic Study. *J. Gen. Microbiol.* 43 (3):159-271.

TROS, M. E., SCRAA, G., ZEHNDER, A. J. B., 1996. Transformation of Low Concentrations of 3-Chlorobenzoate by *Pseudomonas sp.* Strain B13: Kinetics and Residual Concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 437-442.

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

STREIT, W. R., DANIEL, R., JAEGER, K. E., 2004. Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 15:285-290.

4. CAPÍTULO 2

Artigo Submetido: FEMS Microbiology Ecology

ID: FEMSEC-06-12-0493

Date Submitted: 08-Dec-2006

SIMPLE DNA EXTRACTION PROTOCOL FROM BRAZILIAN LANDFARM SOIL
FOR 16S RDNA STUDY OF MICROBIAL DIVERSITY

Authors: SANTOS, A.C.F., MACIEL, B.M., DIAS, J.C.T., VIDAL, R.O.,
CASCARDO, J.C.M., REZENDE, R.P.

Institution: Departamento de Ciências Biológicas, UESC – Universidade
Estadual de Santa Cruz, Rod. BR 415, Km 16, Ilhéus-BA, 45650-000, BRAZIL..

**SIMPLE DNA EXTRACTION PROTOCOL FROM BRAZILIAN LANDFARM SOIL
FOR 16S RDNA STUDY OF MICROBIAL DIVERSITY**

**SANTOS, A.C.F., MACIEL, B.M., DIAS, J.C.T., VIDAL, R.O., CASCARDO, J.C.M.,
REZENDE, R.P. ***

Departamento de Ciências Biológicas, UESC – Universidade Estadual de Santa Cruz,
Rod. BR 415, Km 16, Ilhéus-BA, 45650-000, BRAZIL.

Running title:

"DNA extraction protocol from Brazilian landfarm"

** Correspondence and proofs should be addressed to:*

Dr. Rachel Passos Rezende

Departamento de Ciências Biológicas

UESC – Universidade Estadual de Santa Cruz

Rod. Ilhéus-Itabuna, Km 16

Ilhéus-BA, 45650-000, Brazil

phone: +55 73 3680 5033

fax: +55 73 3680 5226

e-mail: rachel@uesc.br

1. Abstract

A simple and reliable protocol for microbial DNA extraction from landfarm soil is reported in this manuscript, using only direct lysis method by maceration. This method eliminates the use of detergents, organic solvents and enzymatic cellular lysis with high DNA yield, (1,25 $\mu\text{g DNA g}^{-1}$ soil) with satisfactory purity. The efficiency of this extraction protocol was confirmed by PCR amplification of the 16S rRNA gene and cloning. A total of 51 different clones were obtained and their sequences analyzed, with only 11 representative of cultivable organisms. The sequences could be classified into five different phylum of eubacteria, at least (Proteobacteria, Actinobacteria, Planctomyces, Firmicutes and Bacteroidetes), demonstrating the genetic diversity of this microbial community. The methodology developed is an important tool for the study of the bacterial diversity responsible for petroleum degradation in contaminated environments.

Key words: Microbial DNA, bacterial diversity, direct lysis, PCR, petroleum degradation.

2. Introduction

The petrochemical industry is extremely diverse, dealing with petroleum-derived products with a recalcitrant nature in terms of biodegradation, which causes significant pollution problems upon their release into the environment [1]. Among the various methods used to mitigate the effects of petrochemical pollutants, 'landfarming' is a choice of various refineries, as it allows, at lower costs, the conversion of large amounts of hazardous wastes containing degradable constituents into less toxic materials to humans and the environment. This is achieved by cultivating spread wastes mixed with the upper soil layer, such that indigenous microorganisms are induced to biodegrade those contaminants [2]. Therefore, landfarm soil is a natural source of organisms that are capable to degrade petroleum-derived products.

The majority of bacteria in environmental samples cannot be isolated or cultured using traditional cultivation techniques and these microorganisms can

indicate how well an ecosystem is functioning. In soil samples, the total cultivable bacteria ranges from 0.3%, thus the major proportion of the microbial biomass remains inaccessible [3]. This probably occurs due to the excellence of their natural habitat, and the conventional plate culture cannot mimic real environmental conditions to which these microorganisms are adapted [4]. The 16S rDNA analysis of total community nucleic acids extracted from soil samples from any environment using culture-independent methods allows the detection and phylogenetic identification of fastidious or yet uncultured organisms [5]. Moreover, studies of unculturable microorganisms can elucidate the microbial consortium behavior responsible for petroleum biodegradation.

There are a large number of published methods for DNA extraction from soil and sediments for studies on autochthonous bacteria [6-15]. Nevertheless, the methods used are not universally applicable; the range of methods described probably reflects the heterogeneity of soils and the nature of subsequent analysis of the DNA [13]. There are two approaches for extracting microbial DNA: *ex situ*, by cell extraction methods, or *in situ*, by direct lysis methods. The second does not require cell isolation, and the extracted DNA seems to be more representative of the microbial community of the sample than cell extraction, because a greater number of microorganisms are subjected to lysis, notably those sorbed onto soil organomineral aggregates [4]. Usually, most of the methods described for DNA extraction combine enzymatic, chemical and physical treatment lyses with the objective of guaranteeing a greater amount of DNA [14]. The isolated use of a physical lysis method has some limitations, it can also provide the extraction of substances, such as humic and fulvic acids. These contaminants can disturb or prevent subsequent molecular analysis, thus a DNA reliable purification step is necessary to minimize the contamination with organic components [4], [14].

The identification of ribosomal RNA as a premier molecule for evaluating evolutionary relationships and application of molecular techniques to microbial systematics has revolutionized the view of phylogenetic relationships among bacteria [16]; [17]. Indeed the application of this phylogenetic knowledge to microbial ecology has contributed enormously microbial diversity study. Prior to the phylogenetic revolution and the development of culture-independent molecular approaches, estimations of diversity and evenness of microbial communities could

not be made [3]. Such studies are becoming usual and many bacteria have been described based only on their 16S rRNA gene sequences.

We report here a new protocol developed and tested for microbial DNA extraction directly from a landfarm soil, using only mechanical lysis by maceration with liquid nitrogen and further polymerase chain reaction for amplification of the 16S rRNA gene. PCR amplification was used as a parameter in evaluating DNA purity because *Taq* polymerase is sensitive to humic contamination and because PCR amplification is a major use of extracted soil DNA. The PCR fragments were used for cloning assays aiming the study of the microbial community responsible for petroleum degradation.

3. Material and Methods

Soil source

A Brazilian landfarm soil (Table 1), contaminated with petroleum waste (Refinery Landulfo Alves, Camaçari, Bahia), was sampled from just below the surface to a depth of approximately 10 cm, sealed in aluminum flask and transported to the Environment Quality Laboratory of Universidade Estadual de Santa Cruz, where it was immediately processed.

Soil sample

Two soil samples were analyzed. One consisted of crude landfarm soil, labeled as *Soil 1*, and the other landfarm soil constantly enriched with petroleum and minimal medium (0.1% KH_2PO_4 , 0.1% K_2HPO_4 , 0.1% NH_4NO_3 , 0.05% MgSO_4 , 0.001% saturated FeSO_4 solution, 0.001% saturated CaCl_2 , pH 7.0) [18], during 9 months under constant agitation at 120 rpm at room temperature ($\pm 28^\circ\text{C}$), labeled as *Soil 2*, with the objective of selecting only the microorganisms adapted to petroleum and responsible for the degradation process.

DNA extraction

For DNA extraction, 2 g of each soil sample was washed three times with TE buffer 50/50 (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA - pH 8.0), and two protocols were tested. In the first (*Protocol I-A*), the lysis step was performed only by mechanical lysis through soil maceration with liquid nitrogen. Then, the soil was transferred to a 15 mL plastic tube to which 2 mL of TE buffer 50/50 and an equivalent volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) was added, and the mixture was gently vortexed during 1 min. The mixture was centrifuged at $2.700 \times g$ at 4°C for 10 min and the supernatant collected. To precipitate DNA, 0.7 vol of cooled isopropanol and 1/10 vol of 3 M sodium acetate were added to the supernatant. The mixture was gently mixed (5-10 times) and kept at -20°C overnight. The sample was pelleted by centrifugation at $2.700 \times g$ for 10 min and the pellet was washed three times with cold 70% ethanol and resuspended in 100 μL of TE buffer 10/0.1 (10mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0). The DNA extracted was then purified in mini-columns of SEPHADEX[®] G-200 (Pharmacia, Sweden). A variation of the protocol described above (*Protocol I-B*) was carried out using 1 mL of guanidium isothiocyanate 5M added to 1 mL chloroform-isoamyl (24:1) instead of phenol-chloroform-isoamyl, in order to compare both extraction procedures.

In the second protocol (*Protocol II* - based on methodology described by Krsek et al., 1999 [14], with some modifications), after the wash step of the soil with TE buffer 50/50, the enzymatic, chemical and mechanical lysis was performed. For the enzymatic lysis, the sample was suspended in 2 mL of a lysozyme solution (150mM NaCl, 100mM EDTA, 5mg.mL⁻¹ lysozyme). The tube was inverted several times to mix the contents and placed in a 37°C water bath for 2 h. Subsequently, 500 μL of proteinase K (2.5 mg mL⁻¹) were added; the tube was gently mixed and placed in a 55°C water bath for 15 min. For the chemical lysis, two milliliters of SDS solution (500 mM NaCl, 500 mM Tris-HCl, 10% (w/v) SDS) was added to the tube and the contents were mixed by inversion several times during 5 min. Finally, for the mechanical lysis process, the samples were subjected to three alternative cycles of freezing in liquid nitrogen and thawing at 100°C . An equivalent volume (4.5 mL) of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) was added and the mixture was gently vortexed during 1 min. After that, the DNA precipitation and purification steps were carried out as previously described.

For visualizing the DNA extracts, 10 μ L of the suspension was loaded onto 1% agarose gels in 1X TBE buffer, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light.

Yield and purity of DNA

After purification, DNA quantification was conducted at a 260 nm wavelength using a scanning SPD-M6A (Shimadzu™) spectrophotometer, equipped with a UV detector, as well as by visual comparison through electrophoresis in Tris-borate-EDTA (TBE) buffer containing 0.5 μ g of ethidium bromide mL^{-1} in 1% agarose gel with known concentration of lambda phage DNA. The DNA yields were estimated on the basis of three replicate determinations. The purity of DNA extracts was assessed spectrophotometrically by calculating A_{260}/A_{280} nm ratio.

PCR conditions and primers

A region of approximately 1500 bp from the 16S rRNA gene was amplified using primers F984/R1378 and F27/R1525, which are specific for almost all eubacterial 16S sequences. The second primers pair was used for sequence analysis. Each 50 μ L PCR mixture contained 10 ng of metagenomic soil DNA, 1 X PCR buffer, 200 μ M of each deoxyribonucleoside triphosphate, 0.2 μ M of sense and antisense primers, 3.7mM MgCl_2 , 0.4 mg/ml of BSA and 2.85 U Taq DNA polymerase (PROMEGA®). The amplification cycle consisted of an initial denaturation step of 5 min at 94°C, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 2 min at 60°C and 1 min at 72°C and a final extension step for 30 min at 72°C. *Salmonella enterica* sorotype Rubislaw lysis was used as a positive control in the PCR assay, while template DNA was suppressed from the reaction mixture for the negative control. For visualizing PCR products, 5 μ L of the suspension was loaded onto 1% agarose gels in 1X TBE buffer, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light.

Duplicate DNA extracts were used with the same PCR master-mixes to ensure impartial amplifications, and all amplifications were performed at the same time.

Cloning procedures

The rDNA amplified sequences were purified with *kit Concert rapid PCR purification* (Life technologies[®]) following the instructions of the manufacturer, then ligated into a plasmid vector pTZ57R/T (Fermentas[®]) and transformed into electrocompetent cells (*E. coli* DH10 β – Eletromax[™] Competent Cells- Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The transformed cells were spreaded on Luria-Bertani (LB) plates containing 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of ampicillin, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside), 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ IPTG (isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside) and incubated overnight at 37°C. White colonies were picked up for construction the clone libraries. Plasmid DNA was prepared with a Qiagen Plasmid Kit (Qiagen[®]) and sequenced using vector-specific primers M13 (forward 5'- GTAAAACGACGGCCAGT-'3) on an Amersham Bioscience MegaBACE 1000[™] capillary sequencer.

Phylogenetic analysis

Sequences were trimmed to remove vector sequences. All sequences were compared to those available in a public database (Ribosomal Database Project release 9.43 (RDP) [19] in order to validate the sequences and the highly similar were included in the analysis. A sample of 30 sequences from Landfarm that are in the same 16S rDNA region were aligned with the ClustalW (version 1.83) [20] and manually corrected. Phylogenetical analysis was performed with the PHYLIP phylogeny inference package (version 3.66) [21] by the maximum-likelihood method with DNAMLK program. The stability of branches was assessed by the bootstrap method with the SEQBOOT (500 replicates), DNAMLK and CONSENSE programs.

All clones were also analyzed into a naïve Bayesian classifier for classifying bacterial 16S rRNA sequences (<http://rdp.cme.msu.edu>) into the new Bergey's bacterial taxonomy [19]. This method works well with the partial sequences, approximately 700 base pair in mean, and gives us an accuracy of more than 99.2% in phylum, 98.4% in class, 96.6% in order, 93.0% in family and 87.7% in genus using the default threshold of 80%. The sequences possible to be

classified were labeled with information about its hierarchical taxonomy. The sequences determined in this study are under the accession numbers EF088431 - EF088482 in the GenBank database.

4. Results

Direct lysis by maceration with liquid nitrogen (described in Protocols I-A and I-B) proved to be very efficient for DNA extraction from landfarm soil, as a large amount of DNA could be obtained (Figure 1). This method eliminates the use of detergents, organic solvents and enzymatic cellular lysis, obtaining, on average, approximately $1.25 \mu\text{g DNA g}^{-1}$ (Table 1) from both soils after the purification step (Figure 1 – I, II, II).

The use of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) for DNA extraction was successful for both samples, unlike guanidium isothiocyanate that was efficient only for soil 2 (Figure 1 - III). Besides the variation of the protocol, where either phenol-chloroform-isoamyl alcohol or guanidium isothiocyanate were used for DNA extraction, other treatments for mechanical, chemical and enzymatic lysis (protocol II) were also tested and compared to direct lysis only by maceration with liquid nitrogen. This protocol presented a great amount of DNA shearing from soil 1, difficult to quantify (Figure 1 - IV) and these extraction products were not of good quality to be used for PCR analysis. No DNA could be extracted from soil 2 by this protocol. The table 2 summarizes the protocols described here, showing its results for comparison.

The DNA extraction by protocol I was of good quality (with high DNA yield and little DNA shearing) to be used in 16S gene amplification (Figure 2) for further diversity study of petroleum degrading microorganisms. To obtain good amplification products, it was necessary to add high quantities of Taq DNA polymerase (2.85 U), in addition of 0.4 mg.ml^{-1} of BSA to protect the enzyme, indicating that the DNA samples were not totally free of PCR inhibitors. Using these PCR conditions, the amplification products were very satisfactory for cloning analysis.

For a first screening, fifty-two clones were sequenced and only one clone was classified as duplicated or almost identical, totalizing 51 different clones.

Of the 52 analyzed sequences, just less than a half (41.16%), including cultivable and not cultivable microorganisms, could be classified into five phylum of eubacteria group, being them: Proteobacteria, γ and α , (21.56%), Actinobacteria (11.76%), Planctomyces (3.92), Firmicutes (1.96%) and Bacteroidetes (1.96%). Out of 58.84% sequences could not be classified into these phylum. As observed in the dendrogram (Figure 3), only 9,8% of the clones were similar to sequences of 16S known rRNA of cultivable organisms or environmental clones, being, like this, capable to be classified in genus. Further analyses of the sequences showed that only 11 clones were representatives of probably cultivable organisms, while the remaining 40 were not cultivable.

5. Discussion

The direct lysis by maceration with liquid nitrogen is a simple and common process used for DNA extraction of plant [22]. For soil, this method had not yet been carried out successfully, and the use of detergents and enzymes (as proteinase K and lysozyme) was necessary in the subsequent steps of DNA extraction. However, detergents may inhibit DNA polymerase and must be removed before using the DNA in a PCR reaction [23]. Regarding landfarm soil, this mechanical lysis proved to be very efficient, as a large amount of DNA could be obtained, indicating that there are many living organisms present in the sample (Figure 1). Nevertheless, contaminants are also obtained with direct lysis, such as humic and fulvic acids. Since these contaminants can disturb or prevent subsequent molecular analysis, an additional purification step was required beyond prior sample washing step [4], [14].

Researchers have demonstrated that soil-DNA extraction followed by a purification step of the crude DNA causes losses of the extracted product, representing a limitation of the purification techniques. Zhou et al. (1996) [13], after gel-plus-minicolumn purification, obtained up to 73% of DNA yield loss, while Smalla et al. (1993) [11] obtained 50% of DNA loss. With the objective of avoiding these losses, Wechter et al. (2003) [15] developed a new protocol for microbial

DNA extraction from soil samples, based on a polyvinylpyrrolidone-calcium chloride precipitation to release microorganisms from soil combined with lysosyme-proteinase-SDS lysis of microbial community. In this method, the soil was suspended in potassium phosphate buffer and vortexed for one minute at high speed to release cells. After that, the supernatant was recovered to carry through the chemical and enzymatic lysis. Nevertheless, this protocol may not be representative for DNA of total microbial soil community because a greater number of microorganisms is sorbed onto soil organomineral aggregates [4], needing a more robust lysis methodology that releases these microorganisms, so that the diversity study represents the total microbial population present in one determined environmental sample. Thus, for the study of microbial diversity, DNA extraction of the largest possible amount of microorganisms is necessary, which is only reached through soil direct lysis with a more robust methodology. This way, we developed a simple and rapid protocol for DNA extraction, representative of the total microbial community present in landfarm soil of petrochemical industry, so that a trustworthy study of the microbial diversity responsible for petroleum degradation can be accomplished.

The protocol described here was capable to extract a large amount of DNA using only the physical lysis by maceration of the soil with liquid nitrogen, without the necessity of using detergents or enzymes for cell lysis. Nevertheless, the purification step continues to be essential to guarantee a good extraction product, allowing further molecular analysis. Therefore, due to the losses of crude DNA after the purification step, the cell lysis step must be very efficient providing a large amount of DNA, with little DNA shearing, so that the losses caused by the purification step are inexpressive, caring the microbial representativeness of the sample. This protocol could provide a large amount of DNA even after the purification step.

Cell lysis generally combines detergent and lytic enzymes. Chemical or enzymatic lysis are relatively gentle, producing limited DNA shearing, but the amount of DNA is not representative of the microbial community because these methods do not completely penetrate soil. Mechanical lysis may give more uniform cell disruption, reaching a larger number of different cells, but the disadvantage is that it trends to shear DNA [4]. However, the use of mechanical

lysis alone has demonstrated to be inefficient for complete cell lysis in environmental samples, probably because the techniques used for physical lysis are a little soft for total DNA extraction. Usually, the mechanical processes that promote cellular lysis are bead-beating, sonication, vigorous shaking and thermal treatments [14]. Maceration with liquid nitrogen is a more robust method compared to the previously mentioned methods and consequently, it can promote some DNA shearing. This act must be adjusted to promote cell lysis only, and in excess it increases the risk of DNA shearing, which associated to the presence of humic substances, reinforces the need of the DNA purification step.

The use of mechanical cell lysis only, without the use of enzymes and detergents, represents an advantage of the technique, because it reduces the cost and the time of sample processing and avoids the interference in the *Taq* DNA polymerase activity by the detergents, which can inhibit the PCR reaction. Recently, Simmon et al. (2004) [23] described a new protocol for preparation of isolated bacterial PCR-template DNA using the autoclave as a lysis method. This protocol eliminates the use of detergents, organic solvents, and mechanical cellular disruption approaches, since rapid heating and depressurization in an autoclave, significantly reducing processing and costs of bacterial lysis. For isolated bacteria, the autoclave method produced amplifiable PCR template comparable or superior to other seven established methods of DNA template preparation, which includes different detergents, enzymes and mechanical lysis method components. However, this new methodology had not been tested for direct DNA extraction of environmental samples, which requires the technique standardization in accordance with the sample to be analyzed. The other protocol tested here, using three methods for cell lysis (protocol II), was not efficient for DNA extraction from Brazilian landfarm, since a great amount of DNA shearing was obtained (Figure 1), which makes subsequent molecular analysis, such as PCR, difficult to accomplish

Besides comparing different methods for cellular lysis, this paper also compared two protocols for DNA extraction, using phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1), protocol I-A, and guanidium isothiocyanate 5 M added to 1 mL chloroform-isoamyl (24:1), protocol I-B. For the soil 1 sample, probably due to a greater amount of organic matter, the extraction of total DNA was only possible by

using phenol-chloroform-isoamyl alcohol. For the soil enriched with petroleum during six months, both extraction methodologies (using phenol-chloroform-isoamyl alcohol or guanidium isothiocyanate added to chloroform-isoamyl) were efficient (figure 1). This fact reinforces the idea that a universal protocol for soil-DNA extraction is unpractical, thus, every type of sample requires optimization of the extraction methods [4], [13], [24].

All extraction products obtained by protocol I-A and I-B could be amplified with the primers for 16S rDNA (Figure 2). Since even trace concentrations of humic materials and hydrocarbons appear to be inhibitory to the PCR reaction, the step of DNA purification with mini-columns of Sephadex G-200 and the presence of BSA, plus the addition of 2.85 U Taq DNA Polymerase in PCR must be necessary. The sensitivity, specificity and product yield of the rRNA 16S gene could be improved after purification with the commercial kit. It is important to note that extracted DNA by the method proposed in this work, in samples from landfarm soil as well as in those enriched with petroleum, could be analyzed by molecular methodology, without interferences, demonstrating the efficiency of the protocol.

The protocol described here for total DNA extraction from disturbed soil is extremely important to characterize bacterial populations of Landfarm. The knowledge of the microbial diversity relationship and like it affects the functionality and sustainability of biodegradative processes in polluted soils remains the main challenges faced by environmental microbiologists. Although only five of the 52 clones had their sequences classified in genera, all clones analysed from Landfarm soil demonstrated that this microbial community is phylogenetic diverse, with members of five different bacteria phylum, at least. Once the landfarm is a biological system used by petroleum refineries to bioremediate their residues, the bacteria present inside this soil, characterized by their rDNA sequences, probably play an important role for biodegradative processes. In this work, cloning assay was very important to validate the DNA extraction methods, however another complementary analyses are necessary to understand real biodiversity of the landfarm.

The impact of culture-independent studies on petroleum biodegradation process represents a crucial importance on the monitoring of the microbial

community, allowing to study of the ecological dynamic during different stages of biodegradation [25]. The knowledge of the members of a certain microbial community can elucidate subjects about diversity and metabolic activity of its inhabitants. Due to the growing concern about environment preservation, detailed studies about petroleum degrading microorganisms are very relevant and need to be accomplished in different landfarm soils (in different places), since distinct niches possess different microbial communities. Actually, studies on degrading-microorganisms have been more frequent, due to their biotechnological importance for environmentalists and petrochemical industries. Therefore, the study of microbial diversity of petroleum-polluted areas is extremely necessary, and the standardization of an efficient protocol for total microbial DNA extraction in a certain niche, is the initial step for a detailed investigation. High quality DNA facilitates and implements the quality of molecular methods.

Although many authors recommend the combination of the physical, chemical and enzymatic methods for cell lysis in soil sample, our results showed that the simple method of direct lysis by maceration with liquid nitrogen could yield large amounts of high molecular weight DNA representing the total community of microorganisms. Besides, it was also possible to amplify total DNA with specific primers for the 16S rRNA gene for further analysis of the microbial diversity responsible for petroleum degradation in landfarm soil through cloning assay.

6. Acknowledgements

This study was supported by Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Process nº 502697/2003-2), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), Bahia State / Brazil. We would like to thank Mss Paula Guttmann for comments on the manuscript.

7. References

- [1] Gaylarde, C.C. (1996) Biodegradation of petrochemicals. In: EMBRAPA (ed) Workshop sobre biodegradação. 255p. Campinas, SP.
- [2] Ausma, S., Edwards, G.C. and Gillespie, T.J. (2003) Laboratory-scale measurement of trace gas fluxes from landfarm soils. *J. Environ. Qual.* 32, 8-22.
- [3] Amann, R.L., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
- [4] Roose-Amsaleg, C.L., Garnier-Sillman, E. and Harry, M. (2001) Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Appl. Soil. Ecol.* 18, 47-60.
- [5] Juck, D., Charles, T., Whyte, L.G. and Greer, C.W. (2000) Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 33, 241-249.
- [6] Ogram, A., Saylor, G.S. and Barkay, T. (1987) The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods* 7, 57-66.
- [7] Steffan, R.J., Goksoyr, J., Boj, A.K. and Atlas, R.M. (1988) Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2185-2191.
- [8] Tsai, Y. and Olson, B.H. (1991) Rapid method for direct extraction of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1070-1074.
- [9] Tsai, Y. and Olson, B.H. (1992) Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2292-2295.
- [10] Picard, D.C., Ponsonnet, C., Paget, E., Nesme, X. and Simonet, P. (1992) Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2717-2722.
- [11] Smalla, K., Cresswell, N., Mendoca-Hagler, L.C., Wolters, A. and Van Elsas, J.D. (1993) Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 78-85.

- [12] Berthelet, M., Whyte, L.G. and Greer, C.W. (1996) Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpyrrolidone spin columns. *FEMS Microbiol. Letters* 138, 17-22.
- [13] Zhou, J., Bruns, M.A. and Tiedje, J.M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 316-322.
- [14] Krsek, M. and Wellington, E.M.H. (1999) Comparison of different methods for isolation and purification of total community DNA from soil. *J. Microbiol. Methods* 39, 1-16.
- [15] Wechter, P., Williamson, J., Robertson, A. and Kluepfel, D. (2003) A rapid, cost-effective procedure for extraction of microbial DNA from soil. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 85-91.
- [16] Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271.
- [17] Olsen, G.J., Woese, C.R. and Overbeek, R. (1994) The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* 176, 1-6.
- [18] Li, G., Huang, W., Lerner, D.N. and Zhang, X. (2000) Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. *Wat. Res.* 34, 3845-3853.
- [19] Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., McGarrell, D.M., Garrity, G.M. and Tiedje, J.M. (2005) The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 1; 33
- [20] Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-80.
- [21] Felsenstein, J. (1989) PHYLIP - Phylogeny Inference Package. *Cladistics* 5: 164-166.
- [22] Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1991) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13-15.
- [23] Simmon, K.E., Steadman, D.D., Urkin, S., Baldwin, A., Jeffrey, W.H., Sheridan, P., Horton, R. and Shields, M.S. (2004) Autoclave method for rapid preparation of bacterial PCR-template DNA. *J. Microbiol. Methods* 56, 143-149.

[24] Harry, M., Gambier, B., Bourezgui, Y. and Garnier-Sillam, E. (1999) Evaluation of purification procedures for DNA extracted from organic rich samples: interference with humic substances. *Analisis* 27, 439-442.

[25] Fernandez, A., Huang, S., Seston, S., Xing, J., Hickey, R., Criddle, C. and Tiedje, J. (1999) How stable is stable? Function versus community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3697-3704.

8. Supplements

Table 1Chemical and physical characteristics of soil^a

Sample	pH	P	K	Ca	Mg	Ca+Mg	Al	Na	H+Al	S	CCC ^b	V	Organic mater
	in water	mg/dm ³	cmol _c /dm ³									%	g/kg
Landfarm	6,9	66	0.31	11.6	0.3	11.9	0.0	1.26	0.11	13.47	13.58	99	74,60

Granulometry (g/Kg) with NaOH dispersion

Sand	silt	clay	silt	argyle	Textural classification
670	269		61		sandy soil

^a Soil analysis made by Embrapa Solos (Cruz das Almas, Bahia – Brazil)^b Cation change capacity

Table 2
Summarized comparison protocols for soil DNA extraction

Treatment	Protocols ^a		
	I-A	I-B	II
i. Cell lysis			
- Mechanical	Maceration with liquid N ₂	Maceration with liquid N ₂	Three alternative cycles of freezing in liquid nitrogen and incubation at 100°C water bath
- Chemical	None	None	SDS
- Enzymatic	None	None	Proteinase K / Lysosyme
ii. DNA separation	Phenol-chloroform-isoamyl alcohol	Guanidium isothiocyanate	Phenol-chloroform-isoamyl alcohol
iii. Precipitation	Isopropanol + sodium acetate	Isopropanol + sodium acetate	Isopropanol + sodium acetate
iv. Purification	Commercial kit	Commercial kit	Commercial kit
Results			
Soil quantity	2 g	2 g	2 g
DNA yield ^b (µg DNA.g ⁻¹ soil)	1.25	1.00 ^c	Shearing DNA
Purity ^d _(260/280)	1.72 ± 0.02	1.35 ± 0.04	ND ^e
PCR analysis	Yes	Yes	No

^a See methods

^b Mean of three DNA extractions of each soil (crude landfarm and landfarm soil constantly enriched with petroleum)

^c Result obtained only for landfarm soil constantly enriched with petroleum

^d Mean of three DNA extractions (of each soil), ± 1 standard deviation

^e Absorbance ration for purified DNA was not determinate.

Figure Legends

Figure 1: DNA extracted from landfarm soil contaminated with petroleum waste after electrophoresis on 1.2% agarose gel. **I** – Crude landfarm soil (*soil 1*) extracted with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) by the delineated *Protocol I-A*. **II** - Landfarm soil constantly enriched with petroleum and minimal media (*Soil 2*) extracted with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1), *Protocol I-A*. **III** - Landfarm soil constantly enriched with petroleum and minimal media (*Soil 2*) extracted with guanidium isothiocyanate plus chloroform-isoamyl alcohol (24:1), by the delineated *Protocol I-B*. The DNAs showed in I, II, and III were obtained only by direct lysis treatment by soil maceration with liquid nitrogen. **IV** - Crude landfarm soil (*Soil 1*) obtained by mechanical, chemical and enzymatic treatments for cell lysis and extracted with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) by the delineated *Protocol II*. λ - Molecular weight marker (bacteriophage λ DNA digested by *Eco R I*, *Hind III* and *Bam HI*).

Figure 2: A. F984/R1378 PCR amplification products targeting the 16S rRNA gene in soil DNA. **1 and 2** – PCR product of approximately 360 bp of 16S rRNA gene from DNA of crude landfarm soil (*Soil 1*). **3** - PCR product of 16S rRNA gene from DNA of landfarm soil constantly enriched with petroleum and minimal media (*Soil 2*) extracted with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (24:24:1). **4** - PCR product of 16S rRNA gene from DNA of soil 2 extracted with guanidium isothiocyanate plus chloroform-isoamyl alcohol (24:1). **5** – *Salmonella enterica* sorotype Rubislaw lysis as positive control. **6** – Negative control (water). λ - Molecular weight marker (bacteriophage λ DNA digested by *Eco R I*, *Hind III* and *Bam HI*). **B.** F27/R1525 PCR amplification products targeting the 16S rRNA gene in soil. **Lane 1** – pGEM DNA marker (Promega). **Lane 1,2,3** - PCR product of approximately 1500 bp of 16S rRNA gene from DNA of crude landfarm soil.

Figure 3: (A) Dendrogram of 16S rDNA sequence from landfarm soil. The tree was calculated by the neighbour-joining method. The scale bar is in fixed nucleotide substitutions per sequence position. The percentage of 500 bootstrap resamplings that support branching points above 70% confidence is indicated and bootstrap values (in percent) are indicated at branching points. **(B)** Distribution of bacteria by phylum.

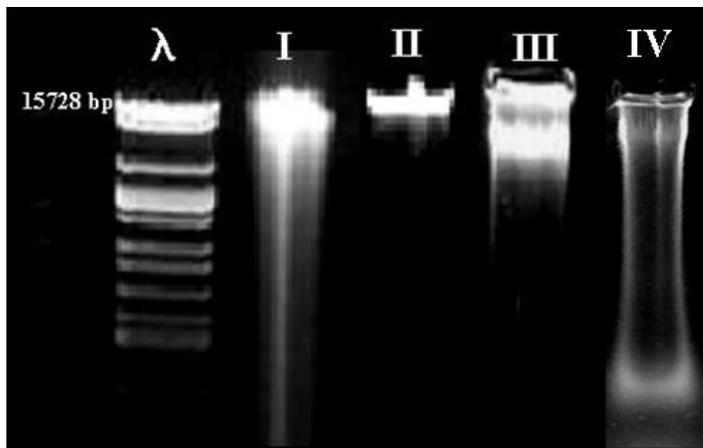
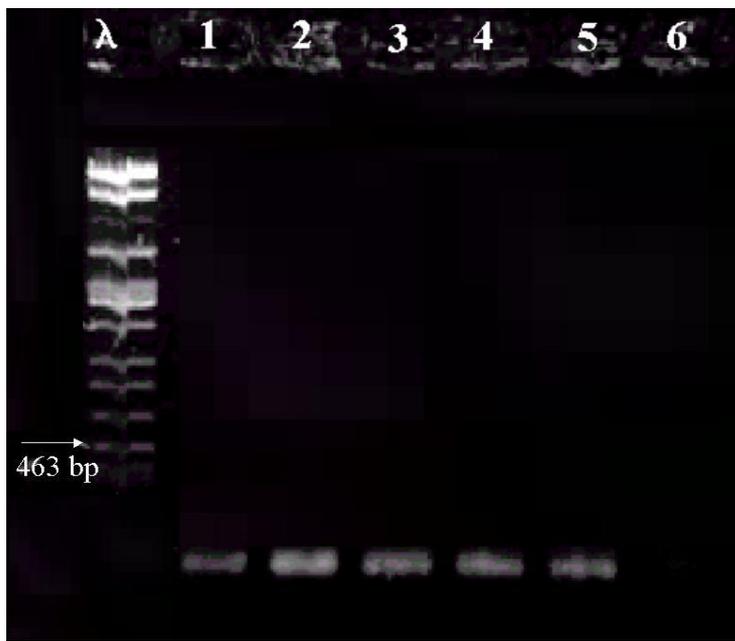


Figure 1

A



B

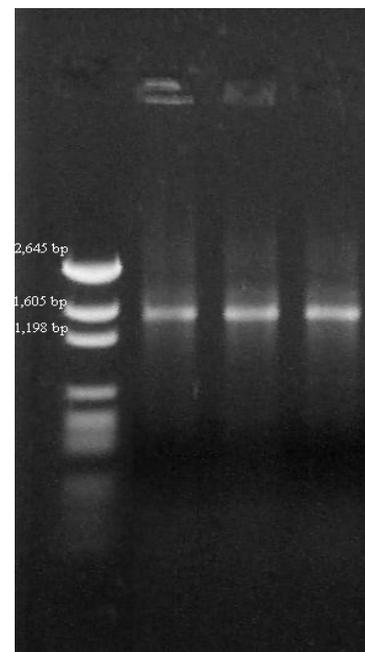


Figure 2

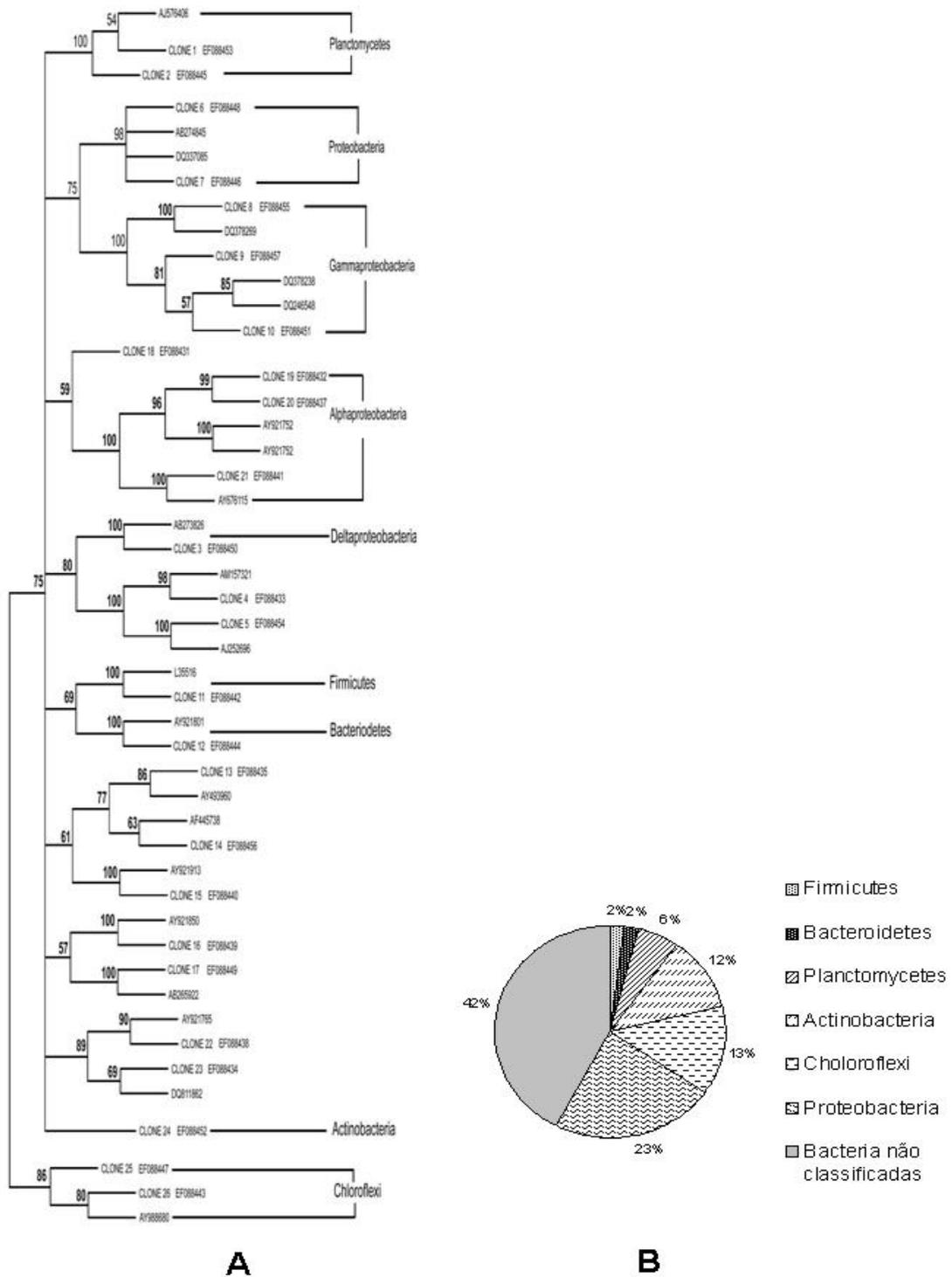


Figure 3

6. CONCLUSÕES GERAIS

- Os ensaios de degradação mostraram que os microrganismos presentes no *Landfarm* estão adaptados a presença de petróleo e seus derivados e são potenciais biodegradadores de hidrocarbonetos;
- Eficácia da técnica de extração de dna e pcr-clonagem frente ao acesso direto de informações sobre a diversidade microbiana cultivável e não cultivável;
- O seqüenciamento e análise do 16s rDNA confirmou a presença de uma grande diversidade de bactérias presentes no *Landfarm*;
- o *Landfarm* atende aos pressupostos quanto a sua capacidade biorremediativa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEGRETTI, A.P.; THIESEN, F.V.; MACIEL, G.P. Analytical method for evaluation of exposure to benzene, toluene, xylene in blood by gas chromatography preceded by solid phase microextraction. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v.809, p.183-187. 2004.

ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. New York: John Wiley & Sons, 2 ed, 1977. 467 p.

ALEXANDER, M. Biodegradation of chemicals of environmental concern. **Science**, v.211, p.132-138. 1981.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol Rev**, v.59, p.143-169. 1995.

ATLAS, R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. **Microbiol Rev**, v.45, p.180-209. 1981.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: Fundamentals and applications**. Redwood: Cummings Science, 4, 1998. 694 p.

BERTRAND, H. et al. High molecular weight DNA recovery from soils prerequisite for biotechnological metagenomic library construction. **J Microbiol Methods**, v.62, p.1-11. 2005.

BEWLEY, R.J.E. **Field implementation of in situ bioremediation: Key physicochemical and biological factors**. In soil biochemistry. New York: Marcel Dekker, v.9, 1996. 541 p.

BONT, J.A.M. Solvent-tolerant bacteria in biocatalysis. **Trends Biotechnol**, v.16, p.493-499. 1998.

BURNS, K.A.; GARRITY, S.D.; LEVINGS, S.C. How many years until mangrove ecosystems recover from catastrophic oil-spills. **Mar Poll Bull**, v.26, p.239-248. 1993.

- CALCAGNOTTO, D. **Taxas de evolução e o relógio molecular**. In: Matioli, s.R. Et al. *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto: Holos, 2001. 202 p.
- CANHOS, V.P.; MANFIO, G.P. **Diversidade no domínio bactéria**. Biodiversidade do estado de são paulo, brasil: Síntese do conhecimento no final do século xx. São Paulo: FAPESP, v.1, 1, 1999. 14 p.
- CAVALIER-SMITH, T. A revised six-kingdom system of life. **Biol Rev Camb Philos Soc**, v.73, p.203-266. 1998.
- CAVALIER-SMITH, T. The neomuran origin of archaebacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.52, p.7-76. 2002.
- COELHO, R.S. **Avaliação da toxicidade de fluidos de usinagem através da ecotoxicologia aquática**. 2006. 156 p. (Tese de Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos - SP, 2006.
- COOPER, D.G. Biosurfactants. **Microbiol Sci**, v.3, p.145-149. 1986.
- CORSEUIL, H.X.; ALVAREZ, P.J.J. Natural bioremediation perspective for btx contaminated groundwater in brazil: Effect of ethanol. **Wat Sci Tech**, v.34, p.311-318. 1996.
- CORSEUIL, H.X. et al. The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic btx biodegradation. **Water Res**, v.32, p.2065-2072. 1998.
- COURTOIS, S. et al. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. **Appl Environ Microbiol**, v.69, p.49-55. 2003.
- COUTINHO, H.L. et al. Evaluating the microbial diversity of soil samples: Methodological innovations. **An Acad Bras Cienc**, v.71, p.491-503. 1999.
- CRAPEZ, M.A.C. et al. Biorremediação: Tratamento para derrames de petróleo. **Ciência hoje**, v.30, p.32-37. 2002.
- CUNHA, C.D.; LEITE, S.G.F. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.45-49. 2000.
- DELONG, E.F.; PACE, N.R. Environmental diversity of bacteria and archaea. **Syst Biol**, v.50, p.470-478. 2001.

- DOOLITTLE, W.F. Lateral genomics. **Trends Cell Biol**, v.9, p.M5-8. 1999.
- DUNBAR, J. et al. Empirical and theoretical bacterial diversity in four arizona soils. **Appl Environ Microbiol**, v.68, p.3035-3045. 2002.
- DUTTA, C.; PAN, A. Horizontal gene transfer and bacterial diversity. **J Biosci**, v.27, p.27-33. 2002.
- FIECHTER, A. Biosurfactants: Moving towards industrial application. **Trends Biotechnol**, v.10, p.208-217. 1992.
- FULTHORPE, R.R.; RHODES, A.N.; TIEDJE, J.M. High levels of endemicity of 3-chlorobenzoate-degrading soil bacteria. **Appl Environ Microbiol**, v.64, p.1620-1627. 1998.
- GIBSON, D.T.; KOCH, J.R.; KALLIO, R.E. Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. I. Enzymatic formation of catechol from benzene. **Biochemistry**, v.7, p.2653-2662. 1968.
- HALLIER-SOULIER, S.D., V.; MAZURE, N.; TRUFFAUT, N. Detection and quantification of degradative genes in soils contaminated by toluene. **FEMS Microbiol Ecol**, v.20, p.121–133. 1996.
- HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.68, p.669-685. 2004.
- HARTE, J.E.A. **Toxics a to z: A guide to everyday pollution hazards**. Berkely, CA: University of California 1991. 502 p.
- HOLMES, A.J. et al. Diverse, yet-to-be-cultured members of the rubrobacter subdivision of the actinobacteria are widespread in australian arid soils. **FEMS Microbiol Ecol**, v.33, p.111-120. 2000.
- HOPPER, D.J. **Aspects of the degradation of aromatics by microorganisms**. Biodegradation: Natural and synthetic materials
London: Spring-Verlang, 1991. 69–89 p.
- HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **J Bacteriol**, v.180, p.4765-4774. 1998.

HUNTER-CEVERA, J.C. The value of microbial diversity. **Curr Opin Microbiol**, v.1, p.278-285. 1998.

IRWIN, R.J.V.M., M. ; STEVENS, L. ; SEESE, M. D.; BASHAM, W. **Environmental contaminants encyclopedia**. Fort Collins, CO: National Park Service, Water Resources Division. 1997.

JUCK, D. et al. Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern canadian communities. **FEMS Microbiol Ecol**, v.33, p.241-249. 2000.

KANALY, R.A.; HARAYAMA, S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. **J Bacteriol**, v.182, p.2059-2067. 2000.

KENT, A.D.; TRIPLETT, E.W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. **Annu Rev Microbiol**, v.56, p.211-236. 2002.

KIMURA, M. Evolutionary rate at the molecular level. **Nature**, v.217, p.624-626. 1968.

KOZDROJ, J.; VAN ELSAS, J.D. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. **J Microbiol Methods**, v.43, p.197-212. 2001.

LANE, D.J. et al. Rapid determination of 16s ribosomal rna sequences for phylogenetic analyses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.82, p.6955-6959. 1985.

LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiol Rev**, v.54, p.305-315. 1990.

LEE, C.Y.; LIN, C.H. Bacterial growth and substrate degradation by btx-oxidizing culture in response to salt stress. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v.33, p.37-44. 2006.

LILES, M.R. et al. A census of rna genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. **Appl Environ Microbiol**, v.69, p.2684-2691. 2003.

LINDSTROM, J.E.; BARRY, R.P.; BRADDOCK, J.F. Long-term effects on microbial communities after a subarctic oil spill. **Soil Biol Biochem**, v.31. 1999.

LYNCH, J.M. et al. Microbial diversity in soil: Ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. **Biology and Fertility of Soils**, v.40, p.363-385. 2004.

LYNCH, J.M.; HOBBI, J.E. **Micro-organisms in action: Concepts and applications in microbial ecology**. UK: Blackwell Scientific Publ., 1988. 368 p.

MACIEL, B.M. **Estudos prospectivos de microrganismos de solo de landfarm com potenciais aplicações em estratégias de biorremediação de áreas contaminadas por petróleo**. 2004. 87 p. (Mestrado). Mestrado em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - BA, 2004.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. **Appl Environ Microbiol**, v.63, p.2660-2664. 1997.

MARIN, J.A.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C. Biorremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. **Environ Res**, v.98, p.185-195. 2004.

MCCAIG, A.E.; GLOVER, L.A.; PROSSER, J.I. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. **Appl Environ Microbiol**, v.65, p.1721-1730. 1999.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2. ed. tual. e ampl., 2006. 729 p.

NUNES-HALLDORSON, V.S.; STEINER, R.L.; SMITH, G.B. Residual toxicity after biodegradation: Interactions among benzene, toluene, and chloroform. **Ecotoxicol Environ Saf**, v.57, p.162-167. 2003.

O'DONNELL, A.G.; GORRES, H.E. 16s rDNA methods in soil microbiology. **Curr Opin Biotechnol**, v.10, p.225-229. 1999.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J.G.; GROISMAN, E.A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, v.405, p.299-304. 2000.

OLSEN, G.J.; WOESE, C.R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: Breathing new life into microbiology. **J Bacteriol**, v.176, p.1-6. 1994.

PACE, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v.276, p.734-740. 1997.

PACE, N.R.; OLSEN, G.J.; WOESE, C.R. Ribosomal rna phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. **Cell**, v.45, p.325-326. 1986.

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil microbiology and biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1989. 275 p.

PAULA, A.M.; SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O. Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de "landfarming" de resíduos petroquímicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.10, p.448-455. 2006.

QU, H.L.; MICHOT, B.; BACHELLERIE, J.P. Improved methods for structure probing in large rnas: A rapid 'heterologous' sequencing approach is coupled to the direct mapping of nuclease accessible sites. Application to the 5' terminal domain of eukaryotic 28s rna. **Nucleic Acids Res**, v.11, p.5903-5920. 1983.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: Application to soil environment. **Res Microbiol**, v.151, p.167-177. 2000.

RAPPE, M.S.; GIOVANNONI, S.J. The uncultured microbial majority. **Annu Rev Microbiol**, v.57, p.369-394. 2003.

RICHARDSON, K.J.; MARGOLIN, A.B.; GERBA, C.P. A novel method for liberating viral nucleic acid for assay of water samples with cDNA probes. **J Virol Methods**, v.22, p.13-21. 1988.

ROOSE-AMSALEG, C.L.; GARNIER-SILLAM, E.; HARRY, M. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. **Appl Soil Ecol**, v.18, p.47-60. 2001.

ROSADO, A.S. et al. Molecular microbial ecology: A minireview. **Rev microbiol**, v.28, p.35-47. 1997.

ROSENBERG, E. Microbial surfactants. **Crit Rev Biotech.**, v.3, p.109-132. 1986.

ROSSELLO-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiol Rev**, v.25, p.39-67. 2001.

SAITO, K.; WADA, H. Behavioral approaches to toluene intoxication. **Environ Res**, v.62, p.53-62. 1993.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.74, p.5463-5467. 1977.

SHAW, D.G. The Exxon–Valdez oil-spill-ecological and social consequences. **Environ Conserv**, v.19, p.253-258. 1992.

SILVA, A.B. **Gestão ambiental na indústria: Uma avaliação do comportamento dos setores químico e petroquímico com relação aos passivos ambientais e os problemas causados em torno da baía de Guanabara**. 2001. 118 p. (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2001.

SMITH, M.R. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. **Biodegradation**, v.1, p.191-206. 1990.

STREIT, W.R.; SCHMITZ, R.A. Metagenomics--the key to the uncultured microbes. **Curr Opin Microbiol**, v.7, p.492-498. 2004.

TATE, R.L. **Soil microbiology**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 1995. 395 p.

TIBURTIUS, E.R.; PERALTA-ZAMORA, P.; EMMEL, A. Treatment of gasoline-contaminated waters by advanced oxidation processes. **J Hazard Mater**, v.126, p.86-90. 2005.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Appl Environ Microbiol**, v.56, p.782-787. 1990.

TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. **Curr Opin Microbiol**, v.5, p.240-245. 2002.

TRINDADE, D.J., D.; BECKER, M.R.; PRATI, C. Evolução de um paciente com hepatite c exposto a produto hepatotóxico. **Rev. Bras. Med. Trab.**, v.1, p.149-152. 2003.

TRÜPER, H.G. Prokaryotes: An overview with respect to biodiversity and environmental importance. **Biodiversity and Conservation**, v.1, p.227-236. 1992.

UCHIYAMA, T. et al. Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. **Nat Biotechnol**, v.23, p.88-93. 2005.

VAN ELSAS, J.D. et al. Quantitative detection of *sphingomonas chlorophenolica* in soil via competitive polymerase chain reaction. **J Appl Microbiol**, v.85, p.463-471. 1998.

VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina, DF: Embrapa-CPAC, 1997. 524 p.

WARD, D.M. A natural species concept for prokaryotes. **Curr Opin Microbiol**, v.1, p.271-277. 1998.

WARD, O.; SINGH, A.; VAN HAMME, J. Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v.30, p.260-270. 2003.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiol Rev**, v.51, p.221-271. 1987.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.87, p.4576-4579. 1990.

ZHOU, J.; BRUNS, M.A.; TIEDJE, J.M. DNA recovery from soils of diverse composition. **Appl Environ Microbiol**, v.62, p.316-322. 1996.

ZOBELL, C.E. Action of microorganisms on hydrocarbons. **Bacteriol. Rev.**, v.10, p.1-49. 1946.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Molecules as documents of evolutionary history. **J Theor Biol**, v.8, p.357-366. 1965.

Centro de estudos de petróleo – UNICAMP. Disponível em:

<http://www.cepetro.unicamp.br/petroleo/index_petroleo.html>. Acesso em: 27 mar. 2006.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB. Disponível em:

<<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em: 10 fev. 2006.

Composição do petróleo, Disponível em:

<<http://www.cepa.if.usp.br/energia/energia1999/Grupo1A/composicao.html>>.

Acesso em: 27 jun. 2006.

Acidentes Ambientais - CETESB, Disponível:

<http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/acoes/residuos_tratamento.asp>. Acesso em: 10 fev. 2006.

8. APÊNDICE A

IDENTIFICATION OF FUNGI FROM LANDFARM SOIL

Departamento de Ciências Biológicas –Universidade Estadual de Santa Cruz
Ilhéus, Bahia, Brazil
CEPEC – CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira)

**Ana Cácia. F. Santos, Vinícius R. Figueirêdo, Bianca M. Maciel, Ronaldo
Costa Argôlo Filho, João Carlos T. Dias, José Luiz Bezerra, Rachel P.
Rezende***

Short title for Runing Head : Fungi from landfarm

* Corresponding author. Mailing address: Universidade Estadual de Santa Cruz,
Departamento de Ciências Biológicas, Rodovia Ilhéus – Itabuna KM 16 , Ilhéus,
BA, Brazil. E-mail: rachel@uesc.br

SUMMARY

In a screening of aerobic culturable hydrocarbon degrading microorganisms from a landfarm soil from Brazil it was observed fungal growth. All strains of fungi were obtained after growth on synthetic agar medium with crude oil as sole carbon and energy source. The main fungi identified were *Aspergillus candidus*, *A. humicola*, *A. olivaceo-fuscus* and *A. flavipes*. This work will contribute for the knowledge of microorganisms that act in biodegradation process.

Key words: identification, fungi, petroleum.

INTRODUCTION

The petrochemical industry, in its diverse activities, produces great amounts of residues derived from oil that cause pollution problems (GAYLARDE, 1996). Between methods of treatment of these residues, landfarm (in-situ treatment) is more widely used because of its potential microbial transformation of pollutants AUSMA et al., 2003; SEABRA, 2001).

The diversity, metabolic and enzymatic variety, and biodegradation potential of bacteria on hydrocarbons have been recognized (BROWN, 1987). Fungi have been the subjects of recent researches that involve degradation of high molecular weight and recalcitrant compounds, including aromatic structures (CHAILLAN et al., 2004).

The objective of this study was the identification of fungi strains from Landfarm soil that growth on plates that petroleum was used as the sole carbon source.

MATERIALS AND METHODS

Fungal isolation

Samples were taken from Landfarm soil in Landulpho Alves Refinery - São Francisco do Conde/BA, Brazil, for analysis of microbiota. Samples were refrigerated and transported to the Lab. of Monitoramento Ambiental at Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, Brazil. 5g of soil

sample were inoculated in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml Sodium Fosfate Buffer - pH 7.0 100 mM, 0.5% of crude oil was added periodically (days- 0, 3, 6, 9, 12, 15 and 18) to the Erlenmeyers flasks. The flasks were incubated at 28°C under shaking for 21 days.

After this period, serial dilutions were made in 10 ml sterile distilled water and 0.1 ml of each dilution was spread on Petri dishes that contained minimum medium (K_2HPO_4 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, NH_4NO_3 0.1%, $MgSO_4$ 0.05%, $FeSO_4$ 0.001%, $CaCl_2$ 0.001% and agar 2%) plus crude oil 0.5%. The plates were incubated at 28°C for 96 hours. After growth fungi colonies were transferred to plates containing Potato Agar (potato20%, dextrose2%, agar 2%) and Sabouraud Agar (glucose2%, peptone 1%, yeast extract 0,5%, agar 2%). The plates were incubated at 28°C and after growth storage in tubes at 4°C.

Identification

The identification of fungi strains present was carried in the Laboratory of Monitoramento Ambiental (UESC) and in the Phytopathologic clinic of CEPEC at CEPLAC - Comissão Executiva para o Plano da Lavoura Cacaueira. From the isolated fungi, slides had been prepared and stained with Cotton Blue for microscopic visualization of fungi structures. A Leica DMLS microscope acloped to a digital camera Samsung CCD SAC-410ND was used for interpretation and storage of the images. To visualize the colonies in petri dishes a stereoscopic microscope Olympus SZ1 connected to a digital camera Sony CCD-IRIS was used.

The studies of the fungi were made in Czapeck Agar Medium ($NaNO_3$ 0.3%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KCl 0.05%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%, Sucrose 3.0%, Agar 1.5%), that was incubated at 25°C during seven days. After growth, new blades were prepared to view characteristics. To study the morphology of the genus *Aspergillus* the following characters were considered: form of the head, length of conidiophore, walls of conidiophore, size of conidia, colour and shape of the conidia, shape of the vesicle, size of the vesicle, size and colour of primary sterigma, size and colour of secondary sterigma, color of the reverse colonies. Keys from THOM & RAPER (1945), accessed the species.

DNA Extraction from pure culture fungi

DNA from fungi was extracted in according to MELO (2006) in an alternative and rapid DNA isolation method adapted from a yeast DNA extraction protocol (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). DNA was verified by 1% agarose gel electrophoresis.

PCR amplification of 18S rRNA gene fragments and DGGE analysis

A GC-rich sequence was attached to forward primer to prevent complete melting of PCR products during separation in the denaturing gradient gel. The fungus-specific primers NL1GC (5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG -3') (KURTZMAN & FELL, 1998) and LS2 (5'- ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3')(COCOLIN, 2000) were used for amplification of 26S rRNA gene fragments (280 bp). Each 50 μ L PCR mixture contained 10 ng of DNA, 1 X PCR buffer, 200 μ M of dNTPs, 0.2 μ M of forward and reverse primers, 3.7mM MgCl₂, 0.4 mg/ml of BSA and 2.5 U Taq DNA polymerase (PROMEGA[®]). The amplification cycle consisted of an initial denaturation step of 5 min at 94°C, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 2 min at 60°C and 1 min at 72°C and a final extension step for 30 min at 72°C. For visualizing of PCR products, 5 μ L of the suspension was loaded into 1% agarose gels in 1X TBE buffer, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light.

DGGE analysis was performed in a Dcode universal mutation detection system (Bio-Rad) with a denaturing gradient of 25 to 55% denaturant and performed in 1X Tris-acetate-EDTA buffer at 60°C at a initial voltage of 60 V for 15 min and after 200 V for 4 h. DGGE gels was stained with Sybr Safe (Invitrogen[®]) and visualized under UV light.

RESULTS

The fungi isolated in this study were able to use petroleum as the sole carbon source. The characteristics analyzed in the colonies and the blades, with the support of the graphical representation of “A manual of the Aspergilli” (TOM & HAPER 1945), the established key of groups in the coloration in plate and, the established key of groups in the morphology in plate had assisted the identification of the species of the isolated fungi from landfarm soil. Table 1 shows the macro and micro characteristics analyzed. The identified fungi belong to the *Aspergillus* genus: *Aspergillus candidus* (figure 1), *A. humicola* (figure 2), *A. olivaceo-fuscus* (figure 3) and *A. flavipes* (figure 4).

Table 1 – Macro and Micro characteristics from isolated fungi

Characteristics	<i>A. humicola</i>	<i>A. candidus</i>	<i>A. olivaceo-</i>	<i>A. flavipes</i>
Head shape	Radial	Globose	Subglobose	Columnar
Conidiophore size	310µ	400µ	> 1 mm	350 to 400µ
Conidiophore walls	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth
Conidia size	3µ	4µ	3µ	3µ
Conidia colour	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless
Conidia shape	Globose	Globose	Smooth	Subglobose
Vesicule shape	Radial	Globose	Subglobose	Subglobose
Vesicule size	12µ	35µ	30 a 40µ	35µ
First sterigma size	4,2µ	12µ	18 a 30µ	8µ
First sterigma colour	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless
Secondary sterigma size	3,2µ	7µ	5µ	7µ
Secondary sterigma colour	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless
Dishe reverse	Yellow	Yellow	Olive	Dark brown



Figure 1- *Aspergillus candidus*



Figure 2- *Aspergillus humicola*



Figure 3- *Aspergillus olivaceus-fuscus*



Figure 4- *Aspergillus flavipes*

Despite the fact that the *Aspergillus* strains had different morphologies, 26S rDNA PCR fragments of the isolates showed similar mobilities in DGGE.

DISCUSSION

Although members of the genera *Aspergillus* are common in soil contaminated with hydrocarbon (OUDT et al., 1993 & RADAWAN et al., 1995, the species found in these work are not common as hydrocarbon biodegraders. *Aspergillus candidus* are extensively distributed in the nature and occur with frequency in top of spoiled vegetation and in process of food deterioration (BHATTACHARYA & RAHA, 2002). A strain described by Magan et al. (1993) is able to produce lipase that act on crude rapessed oil. *Aspergillus humicola* appears distributed in the ground, in dry material, breads, cereals, old cheese, dry meats, vegetal products and is involved in biodeterioration process (GREAVS 1975). Little is known about *Aspergillus olivaceo-fuscus* in decomposition processes. Members of *Aspergillus flavipes* have sample distribution and are common in fertile ground and top of vegetation. They are not known as active agents of the decomposition, even if found in poultry feed ingredients (MOHARRAM et al., 1989). These strains were able to growth in petroleum and can be used for biorremediation by exploring its metabolic and enzymatic products.

rRNA has been used as the target for the development of species or genus-specific PCR assays for several different microorganisms. The number of fungal taxa for which sequence information is available is still quite limited and variation contained within the rRNA gene is not ideal for all levels of analysis (KOWALCHUK et al., 1997). Distinguishing between such closely related isolates would require the use of a more variable target of the ribosomal or the ITS regions (NAZAR et al., 1991).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to express thanks to Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Comissão Executiva para o Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) for structure. Grants from FAPESB (Fundação de Amparo a pesquisa do estado da Bahia) and CNPq/CTPETRO (Conselho Nacional de Pesquisa e desenvolvimento) process number 502697/2003-2. Thanks are also to the Refinaria Landulfo Alves to help support.

REFERENCES

- AUSMA, S., EDWARDS G.C., GILLESPIE, T.J. 2003. Laboratory-scale measurement of trace gas fluxes from landfarm soils. *J. Environ. Qual.*, 32, 8-22.
- BATTACHARYA, K., RAHA, S. 2002. Deteriorative changes of maize ground nut and soybean seeds by fungi in storage. *Mycopathologia*. 115, 135-141.
- BROWN, L. R. 1987. Oil – degrading microorganisms. *Chem. Eng. Prog.* 83, 35-40.
- CHAILLAN, F., FLÉCHE, A., BURY, E., PHATAAVONG, Y., GIMONT, P., SALIOT, A., OUDOT, J. 2004. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon- degrading microorganisms. *Res. Microbiol.* 155, 587-595.
- COCOLIN, L., L. F. BISSON, AND D. A. MILLS. 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.* 189:81-87.
- GAYLARDE, C.C. 1996. Biodegradation of petrochemicals. *In* EMBRAPA (ed) Workshop sobre biodegradação. Campinas, SP, p 225.
- GREAVS, H. 1975. Microbiological aspects of wood chip storage in tropical environment. *Aust. J. Biol. Sci.* 28, 323-330.
- KOWALCHUK, G. A., GERARDS, S. WOLDENDORP, J. W.. 1997. Detection and characterization of fungal infections of *Ammophila arenaria* (Marram grass) roots by denaturing gradient gel electrophoresis of specifically amplified 18S rDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3858-3865.
- KURTZMAN, C. P., AND C. J. ROBNETT. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Leeuwenhoek* 73, 331-371.
- MAGAN, N. JENKINS, N. E., HOWARTH, J. 1993. Lipolytic activity and degradation rapped oil by spoilage fungi. *Int. J. Food. Microbiol.* 19, 217-227.
- MOHARRAM, A. M., ABDEL-GAWAD, K. M., MEGALLA, S. E., MALUMOND , A. L. 1989. Fungal flora of poultry feedstuff ingredients. *J. Basic. Microbiol.* 29, 491-499.
- MELO, S. C. O., PUNGARTNIK, C., CASCARDO, J. C. M., BRENDEL, M. 2006. Rapid and efficient protocol for DNA extraction and molecular identification of the

basidiomycete *Crinipellis perniciosus*. *Genetics and Molecular Research*. 5, 851-855.

NAZAR, R.N., HU, X, SCHMIDT, J., CULHAM, D. & ROBB, J. 1991. Potential use of PCR amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogen. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39:1-11.

OUDOT, J., DUPONT, J., HALOUI, S., ROQUEBERT, M. F. 1993. Biodegradation potential of hydrocarbon - assimilating tropical fungi. *Soil Biol.* 1167-1173.

RADAWAN, S. S., SORKHOH, N. A., FARDOREN, F., ALHASAN, R. H. 1995. Soil management enhancing hydrocarbon biodegradation in the polluted Kwait desert. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 265-270.

SAMBROOK J., RUSSEL D.W. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SEABRA, .N. Uso da biorremediação em áreas impactadas pela indústria de petróleo. In MELO, I.S.; SILVA, C.M.M.S.; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. 2001. *Biodegradação*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p.41-59.

THOM, C., RAPER, K B. *A manual of the Aspergilli*. 1945. Baltimore: Williams & Wilkins. p. 273