



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E DA CAPACIDADE DE DEGRADAR  
COMPONENTES DE PETRÓLEO DE UMA LINHAGEM DE *Burkholderia gladioli*  
ISOLADA DO LAGO DE COARI (COARI-AMAZONAS)**

Manaus-AM  
2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E DA CAPACIDADE DE DEGRADAR  
COMPONENTES DE PETRÓLEO DE UMA LINHAGEM DE *Burkholderia gladioli*  
ISOLADA DO LAGO DE COARI (COARI-AMAZONAS)**

**ERALDO FERREIRA LOPES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR em BIOTECNOLOGIA.

Orientador: Spartaco Astolfi-Filho

Coorientadores: Josemar Gurgel da Costa

Hector Henrique Ferreira Koolen

Manaus-AM  
2019

## Ficha Catalográfica

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

L864c Lopes, Eraldo Ferreira  
Caracaterização genômica e da capacidade de degradar componentes de petróleo de uma linhagem de Burkholderia gladioli isolada do Lago de Coari (Coari-Amazonas) / Eraldo Ferreira Lopes. 2019  
115 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Spartaco Astolfi-Filho  
Coorientador: Josemar Gurgel da Costa  
Coorientador: Hecto Henrique Ferreira Koolen  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Petróleo. 2. Biorremediação. 3. Burkholderia gladioli Coa14. 4. Genômica Funcional. 5. Genômica Comparativa. I. Astolfi-Filho, Spartaco II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

## DEDICATÓRIA

À Sra Valdete Ferreira Lopes (*in  
memorian*). Foram apenas nove  
anos de convivência,  
inesquecíveis.  
Mas o sonho ficou, para sempre.

Obrigado mãe.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter criado a bondade, mas também o ego, a justiça, mas também a dúvida, o perdão, mas também o castigo. Por prestar atenção em Teus mistérios aprendi que, quase sempre, o final do caminho está a só mais um passo de distância.

Ao meu pai Sr. Eurico Ferreira Lopes (*in memoriam*), *Doutor Honoris Causa* na ciência do desbravamento e da coragem para produzir riqueza a partir do quase nada. Obrigado pelo apoio incondicional.

À minha esposa Jaci, pelo amor, dedicação e companheirismo, o caminho é muito mais bonito quando estou com você.

Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi-Filho, por ter me aceitado, mesmo sem muita experiência na área. O Sr. é, para mim, o maior formador de recursos humanos em Biotecnologia da Amazônia.

Ao amigo, coorientador e entusiasta em biorremediação, Prof. Dr. Josemar Gurgel da Costa.

Ao Prof. Dr. Hector H. F. Koolen, e sua elegância como pesquisador ao seguir o que se diz em Mateus 5:37.

Aos profissionais da UNESP de Botucatu, Prof. Dr. Guilherme Valente e seu doutorando Ivan R. Wolf, pelo auxílio fundamental em bioinformática. Vocês me estenderam a mão quando eu mais precisava.

Àqueles que, dentro da UFAM, me ajudaram a fazer um pouco mais: Enedina, Mota, Carlos Gustavo, Joaquim.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pela bolsa concedida.

À CAPES e ao CNPq que, mesmo indiretamente, me auxiliaram.

*So, understand  
Don't waste you time  
Always searching for  
Those wasted years  
Face up, make your stand  
And realize you're leaving in  
The Golden Years*

(Iron Maiden)

## RESUMO

O petróleo é a principal força motriz da indústria e dos transportes, é um líquido escuro, de composição variável, e rico em hidrocarbonetos. Uma amostra de petróleo pode conter mais de vinte mil substâncias diferentes, parte delas tóxicas aos organismos e ao meio ambiente, além de recalcitrantes. A necessidade industrial faz com que os países explorem regiões ricas em biodiversidade, expondo os ambientes aos riscos envolvidos durante a extração e o transporte para refino, do óleo bruto. Tecnologias que reduzam impactos ambientais por derramamento de petróleo a baixo custo e ambientalmente amigáveis são fundamentais. A Província Petrolífera de Urucu é o maior sítio terrestre de extração de petróleo no Brasil, pertencente à macrorregião de Coari, Amazonas. O objetivo deste trabalho foi investigar se a resistência ao petróleo de Urucu pela linhagem de *Burkholderia gladioli* Coa14, isolada do Lago de Coari, pode ser um indicativo de seu potencial para utilização em biorremediação. Para isto, foram realizadas análises químicas, genômicas, de genômica funcional e de genômica comparativa. Inicialmente, para testar a ação da bactéria sobre o petróleo, foi realizado um experimento onde a linhagem foi inoculada em *Erlenmeyers* contendo meio *Bushnell-Hass* e petróleo à 5% (V/V) como fonte de carbono e energia, num volume final de 100 mL. Os mesmos foram mantidos em shaker à 150 RPM e 37° C por 21 dias. Ao final do período, os meios foram centrifugados para retirada das células e extração do óleo resultante. A extração do óleo do meio de cultura foi realizada com hexano e as fases orgânicas diretamente analisadas por GC-MS (modo SIM) para monitoramento seletivo dos *n*-alcanos. Como controle foram utilizados frascos e procedimentos nas mesmas condições, sem o inóculo. A perda por manipulação foi estimada extraindo-se o petróleo de frascos na condição dos controles, no tempo zero. A avaliação do crescimento foi estimada medindo-se a densidade óptica de células obtidas a partir de 10 mL do meio e ressuspensas em NaCl a 0,85%. Em seguida, foi realizado o sequenciamento Illumina e a montagem do genoma até o nível de *draft*. A montagem foi seguida da anotação e investigação dos genes presentes relacionados com a degradação de óleo bruto, assim como a reconstrução das vias metabólicas que possam ser utilizadas pelo microrganismo para este fim. Como análise final, foram realizadas comparações entre o genoma da espécie em questão com outros da mesma espécie, assim como genomas de bactérias de espécies diferentes relacionadas à biorremediação de petróleo e derivados, depositados publicamente no NCBI. A linhagem reduziu em 48% o volume de *n*-alcanos, enquanto sua densidade óptica aumentou de 1,0 a 2,2 em 21 dias, indicando possibilidade para utilização da mesma em estratégias de biorremediação. A mesma é resistente a três antibióticos do grupo das cefalosporinas e suscetível a outros nove relacionados a testes para bactérias Gram Negativas. O sequenciamento revelou um genoma com tamanho de 8,4 Mb e diversos genes / vias relacionados à degradação do petróleo. As análises comparativas revelaram semelhança em termos de genes para início da degradação de substâncias recalcitrantes em relação à bactérias da mesma espécie e superioridade em relação a outras reconhecidamente biorremediadoras.

Palavras-chave: petróleo, biorremediação, *Burkholderia gladioli* Coa14, GC/MS, genômica, genômica funcional, genômica comparativa.

## ABSTRACT

The petroleum is the main motor force that drives industry and transportation, it is a dark liquid, with variable composition and rich in hydrocarbons. A sample of oil can contain more than twenty thousand different substances, some of them toxic to organisms, to the environment and recalcitrant. The industrial necessity forces the countries to explore regions with high biodiversity, exposing the environments to the risks involved during the extraction and transport to refine the crude oil. Thus, low-cost and environmentally-friendly technologies which can reduce the petroleum spill impacts are critical. The Petroleum Province of Urucu is the largest terrestrial site of oil extraction in Brazil, belonging to the macro region of Coari, Amazonas. The objective of this work was to investigate whether the resistance to Urucu oil from the *Burkholderia gladioli* Coa14 strain isolated from Lake Coari may be indicative of its potential for use in bioremediation. For this, chemical analyzes, genomics, functional genomics and comparative genomics were performed. Initially, to test the action of the bacterium on the oil, an experiment was carried out where the lineage was inoculated in Erlenmeyers containing *Bushell-Hass medium* and 5% (V/V) petroleum as carbon and energy source, in a final volume of 100 ml. They were kept in shaker at 150 RPM and 37° C for 21 days. At the end of the period, the media were centrifuged for removal of the cells and extraction of the resulting oil. This was performed with hexane and the organic phases directly analyzed by GC-MS (SIM mode) for selective monitoring of *n*-alkanes. As control, flasks and procedures were used in the same conditions, without the inoculum. The loss by manipulation was estimated by extracting the oil from flasks in the condition of the controls at zero time. Growth assessment was estimated by measuring the optical density of cells obtained from 10 mL of the medium and resuspended in 0.85% NaCl. Then, Illumina sequencing and assembly of the genome to the *draft* level was *performed*. The assembly was followed by the annotation and investigation of the genes present related to the degradation of crude oil, as well as the reconstruction of the metabolic pathways that can be used by the microorganism for this purpose. As a final analysis, comparisons were made between the genome of the species in question with others of the same species, as well as genomes of bacteria of different species related to oil bioremediation and derivatives deposited publicly in NCBI. The strain reduced the volume of *n*-alkanes by 48% while its optical density increased from 1.0 to 2.2 in 21 days, indicating the possibility of using it in bioremediation strategies. It is resistant to three antibiotics in the cephalosporin group and susceptible to nine other related tests for Gram Negative bacteria. Sequencing revealed a genome of 8.4 Mb in size and several genes / pathways related to petroleum degradation. Comparative analyzes revealed similarity in genes for the initiation of the recalcitrant substances degradation regarding to bacteria of the same species and superiority in relation to other known bioremediators.

Key-words: petroleum, bioremediation, *Burkholderia gladioli* Coa14, GC/MS, genomic, functional genomic, comparative genomic.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	20
2.1 - Petróleo e toxicidade	20
2.2 - O petróleo na Amazônia Brasileira	21
2.3 - Bactérias e as Tecnologias para Biorremediação do Petróleo	21
2.4 - Patentes em biorremediação de petróleo	28
2.5 - O gênero <i>Burkholderia</i>	29
2.6 - Genes de degradação de componentes de petróleo	30
2.7 - Genômica funcional e comparativa aplicadas a biorremediação	32
<b>3. OBJETIVOS</b>	35
3.1 - Objetivo Geral	35
3.2 - Objetivo Específico	35
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	37
4.1 - Local da Coleta	37
4.2 – Coleta	38
4.3 – Caracterização morfológica e Gram	39
4.3.1 - Gram Químico	39
4.3.2 - Coloração de Gram	40
4.4 - Teste de Sensibilidade aos Antibióticos	40
4.5 - Experimento de Biodegradação	41
4.5.1 - Extração do óleo resultante do meio de cultura	42
4.5.2 - Teste de Recuperação	42
4.5.3 - Análise de Cromatografia Gasosa associada Espectrometria de Massas (GC/MS)	43
4.6 – Análise do Crescimento Bacteriano	43
4.7 – Genômica e Genômica Funcional	44
4.7.1 - Extração do DNA para sequenciamento do Genoma	44
4.7.2 - Controle de qualidade	45
4.7.3 - <i>Trimming</i> das sequências	45
4.7.4 - Montagem do Genoma	45
4.7.5 - Análise do Genoma montado	46

4.7.6 - Sistemática Molecular	46
4.7.6.1 - Análise segundo o BLASTn (MEGABLAST).	46
4.7.6.2 - Análise segundo o Inference RNA Aligner (INFERNAL)	46
4.7.6.3 - Análise segundo o KmerFinder	47
4.8. Anotação do Genoma e Genômica Funcional	47
4.9 – Genômica comparativa	47
<b>5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>50</b>
5.1 - Análises não moleculares: Morfologia e Gram	50
5.2 - Biossegurança Teste de sensibilidade a antibióticos	51
5.3 - Experimento de Biodegradação	53
5.4 – Genômica	59
5.4.1 - Extração e Qualidade do DNA	59
5.4.2 - Sequenciamento e Montagem do Genoma	60
5.5 - Sistemática Molecular	63
5.5.1 - Análise segundo o INFERNAL	63
5.5.2 – Análise segundo o <i>KmerFinder</i>	65
5.5.3 – Análise segundo BLASTn (MEGABLAST)	66
5.6 - Reordenamento de <i>contigs</i> e formação de <i>supercontigs</i> ( <i>scaffolds</i> )	67
5.7 - Anotação Gênica	69
5.8 – Vias e genes para degradação de componentes do Petróleo	70
5.8.1 – N-alcanos	70
5.8.2 – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	71
5.8.3- Genes para Oxigenases	75
5.8.4 – Genes para surfactantes	76
5.9 – Genômica Comparativa	77
<b>6 – CONCLUSÕES</b>	<b>85</b>
<b>7 – ANEXOS</b>	
7.1 - Lista de Genes anotados para Oxigenases	87
7.2 – Artigo	88
<b>8 – BIBLIOGRAFIA DE REFERÊNCIA</b>	<b>90</b>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Técnica da Bioventilação.

**Figura 2** - Técnica da Bioaspersão.

**Figura 3** - Técnica da Biopilha.

**Figura 4** - Desenho esquemático de um Biorreator.

**Figura 5** - Técnica do *Landfarming*.

**Figura 6** - Imagem de satélite do Lago de Coari.

**Figura 7** - Imagem de satélite da Base de Urucu.

**Figura 8** - Imagem de satélite da Base de Urucu em relação Cidade de Coari.

**Figura 9** - Placa de cultivo em PCA.

**Figura 10** - Fotomicrografia das células de *Burkholderia gladioli* Coa14.

**Figura 11** – Fotografia do experimento de biodegradação X controle.

**Figura 12** – Cromatograma petróleo de Urucu, tempo zero.

**Figura 13:** Sobreposição de cromatogramas no tempo 0 e após 21 dias de exposição.

**Figura 14:** Teste de recuperação.

**Figura 15:** Resultados da biodegradação, perda por evaporação e remanescência.

**Figura 16:** Gel de agarose.

**Figura 17:** Tabela de qualidade pré “trimming”.

**Figura 18:** Tabela de qualidade pós “trimming”.

**Figura 19:** Exemplo de saída de dados do *INFERNAL*.

**Figura 20:** *BLASTn* de uma das sequências localizadas no *ARTEMIS*.

**Figura 21:** Saída de dados do *KmerFinder*.

**Figura 22:** Análise segundo *BLASTn* (*MEGABLAST*) contra genomas totais do NCBI.

**Figura 23:** Alinhamento de *contigs* de *Burkholderia gladioli* BSR3 contra o *draft* de *Burkholderia* isolado do lago de Coari.

**Figura 24:** Alinhamento de cromossomos e plasmídios de *Burkholderia gladioli* BSR3 contra o *draft* de *Burkholderia* isolado do lago de Coari.

**Figura 25:** *Contigs* reordenados utilizando o *Mauve*.

**Figura 26:** Genes agrupados em subsistemas pelo *Rast-server*.

**Figura 27:** Vias de degradação de n-alcenos.

**Figura 28:** Via do catecol.

**Figura 29:** Via do protocate.

**Figura 30:** Via simplificada de degradação de hidrocarbonetos.

**Figura 31:** Comparação entre genomas de *Burkholderia gladioli*.

**Figura 32:** Mapa dos genomas de *Burkholderia gladioli* utilizando o *Mauve*.

**Figura 33:** Comparação entre genomas de *Burkholderia gladioli* quanto presença de genes para as oxigenases.

**Figura 34:** Comparativo entre genomas várias linhagens bacterianas e Coa14 quanto presença de genes para as oxigenases.

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** - Resultados do antibiograma.

**Tabela 2** - Resumo das características do *draft* de genoma montado.

**Tabela 3** - Genes de degradação de PAHs.

**Tabela 4** - Genes da via do catecol.

**Tabela 5** - Genes da via do protocate.

**Tabela 6** - Genes para produção de biossurfactantes.

**Tabela 7** - Comparação entre genomas de *B. gladioli*.

**Tabela 8** – Linhagens utilizadas para comparação quanto aos genes para degradação de compostos aromáticos.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

API (gravity): American Petroleum Institute.

B.O.D: biochemical demand of oxygen.

bp: base pair.

CAM: Centro de Apoio Multidisciplinar.

CDS: coding DNA sequence.

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

GC: guanina, citosina.

GC/MS: gas chromatography / mass spectrometry.

HPA: hidrocarboneto policíclico aromático.

ISB-Coari: Instituto de Saúde e Biotecnologia de Coari.

LB: Luria-Bertani.

Mb: mega base pairs.

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

ng: nanogramas.

O.D.: optical density.

ORSE I: oleoduto Rio Solimões I.

PCA: plate count agar.

PCR: polimerase chain reaction.

PE: paired end.

RNA: ácido ribonucleico.

rpm: rotações por minuto.

rRNA: ribosomal RNA.

SSU: small sub unit.

TPH: total petroleum hydrocarbons.

tRNA: transfer RNA.

UFC: unidade formadora de colônia.

UPGN-Urucu: Unidade Produtora de Gás Natural de Urucu.

USEPA: United States Environmental Protection Agency.

## *INTRODUÇÃO*



# 1 – INTRODUÇÃO

A biorremediação de ambientes contaminados com petróleo e seus derivados de maneira econômica e ecologicamente viável é um desafio. Antes que se encontre uma nova maneira de mover os motores das indústrias e dos transportes, o petróleo continuará sendo a principal força motriz mundial (SCHWARZ, 2007), levando desenvolvimento, qualidade de vida e, algumas vezes, danos aos ecossistemas. De todas as formas de produção de energia conhecidas atualmente, o petróleo é a mais importante (FILHO, 2009).

O petróleo é um líquido de origem natural e cor escura, variando em densidade e composição química. Basicamente é composto por hidrocarbonetos de cadeias curtas, médias, longas, lineares, ramificadas e cíclicas. Outros átomos podem estar presentes, como oxigênio, nitrogênio e enxofre (WANG e HUANG, 2003).

É produzido à partir da decomposição de matéria orgânica em condições anaeróbias, em tempo geológico (HOOD et al., 1975). Esta mistura complexa costuma ser obtida em jazidas de grande profundidade, na terra ou no mar. Assim sendo, sua utilização depende de tecnologias para extração, transporte e refino.

Estimativas mais conservadoras indicam que as reservas petrolíferas mundiais devem durar aproximadamente mais 100 anos. Durante este tempo todos os riscos ambientais envolvidos em sua cadeia produtiva estarão presentes (PAINE et al., 1996; SCHUCHARDT e RIBEIRO, 2001; GOLDEMBERG e LUCON, 2007).

Entre estes riscos, as principais ameaças relacionam-se ao seu transporte para refino e / ou para a comercialização, armazenamento (DOWTY et al., 2001) e o vazamento de resíduos durante sua utilização propriamente dita pelos motores a combustão, principais consumidores (HASSLER, 2011).

Após a segunda guerra mundial, os preços de produção do petróleo e seus derivados, entre eles o óleo diesel, a gasolina e a querosene de aviação diminuíram. Esta diminuição foi mediada principalmente pela abertura das reservas do Golfo Pérsico. A queda de preços levou ao desenvolvimento industrial, ao aumento do consumo e a consolidação do óleo bruto como matriz energética mundial (TENERELLI e WALKER, 1995).

Associados com a extração e o beneficiamento estão os acidentes ambientais, que já derramaram milhões de barris de óleo bruto em diversos ambientes. O primeiro e um dos mais importantes foi o do Navio *Exxon Valdez*, de onde vazaram mais de 250.000 barris de óleo no mar do Alasca, em 1989 (BOEHM, 1998; PETERSON, 2001).

No Brasil, onde o transporte do ponto de extração até o local de refino é feito principalmente

por navios e oleodutos, pelo menos 300 mil litros de óleo bruto vazaram, só em 2007 (PETROBRAS, 2007). Convém salientar a desconfiança de que alguns derramamentos possam não ser noticiados, principalmente quando ocorrem em regiões remotas e de difícil acesso.

Assim, é importante que se desenvolvam estratégias para a remoção destes produtos após o vazamento e a limpeza do meio ambiente. Entre elas está a biorremediação, que se utiliza de seres vivos capazes de sobreviver nas condições de contaminação, atuando sobre o poluente (HEAD e SWANNEL, 1999).

Os principais organismos modelo na biorremediação são as bactérias, capazes de utilizar xenobióticos como fonte de carbono e energia. É possível, por exemplo, a utilização da capacidade degradadora de espécies bacterianas autóctones através do enriquecimento do substrato no local de interesse, com nutrientes (NIKOLOPOULOU et al., 2013).

Outra estratégia conta com a introdução de microrganismos alóctones previamente isolados, selecionados pela capacidade de consumo de hidrocarbonetos para crescimento e engenheirados geneticamente (DAS e CHANDRAN, 2011).

O desafio da biorremediação de Petróleo é isolar / engenheirar geneticamente organismos que possam sobreviver utilizando componentes do óleo bruto, mineralizando-os. O método desenvolvido pode lançar mão de abordagens *in situ* ou *ex situ* (TIMMIS e PIEPPER, 1999; PIEPER e REINEKE, 2000, PERPETUO et al., 2011), ambas contam com o isolamento de microrganismos.

Quanto maior a biodiversidade associada ao entorno de uma região de extração de petróleo, maior deve ser a capacidade de resposta para redução de danos, sempre considerando o melhor custo benefício possível. Sem perspectiva de mudança da matriz energética, a expectativa de consumo diário do petróleo no globo tem aumentado. Em 2016, o mundo consumia 85,3 milhões de barris por dia. Mesmo com a queda no consumo entre os anos de 2008 e 2009, em 2017 foram consumidos 97,8 milhões de barris por dia, e a perspectiva para 2018 era de 99,3 (SHARMA, 2018).

Com o aumento da demanda energética mundial, aumentam também os esforços para supri-la através da exploração dos subsolos continentais e marinhos (WEC, 2013), além de áreas de grande biodiversidade associada, como na Amazônia (CORRÊA et al., 2011).

A província petrolífera de Urucu, na região de Coari, Amazonas, é a maior base de extração de petróleo terrestre no território brasileiro. Fica no coração da floresta Amazônica, de onde são extraídos cerca de 40.000 barris de óleo bruto para refino em Manaus, diariamente (PETROBRAS, 2016).

Para o desenvolvimento de tecnologias de biorremediação, a mesma região biodiversa, alvo

da preocupação ambiental, pode ser capaz de fornecer organismos capazes de serem utilizados como biorremediadores. Diversos trabalhos demonstram a capacidade local de degradação de petróleo em diferentes ambientes graças aos microrganismos autóctones (ATLAS, 1995; HUETTEL e RUSCH, 2000; HAZEN et al., 2010; KARAMALIDIS et al., 2010), o que torna regiões biodiversas interessantes para bioprospecção.

Nestes locais é comum a presença de bactérias capazes de sobreviver em diferentes condições. Neste grupo, o gênero *Burkholderia* se destaca em função de sua versatilidade, estando associado ao uso como promotor do crescimento de plantas, biocontrole, e biorremediação (COENYE e VANDAMME, 2007; VIAL et al., 2007 ; CUZZI et al., 2014).

Recentemente, a genômica tem sido uma ferramenta importante para identificar / caracterizar microrganismos com capacidade para biorremediação de petróleo, identificando, em nível gênico, potenciais para atuação sobre o óleo em estratégias de limpeza ambiental, destacando-os de outros que não apresentam tal potencial (BROOIJMANS et al., 2009).

O objetivo do presente trabalho foi investigar por meio de análises químicas e moleculares a origem da capacidade de uma linhagem de *Burkholderia*, isolada do lago de Coari, de resistir ao petróleo de Urucu, para entender se esta propensão pode ser aproveitada no desenvolvimento de tecnologias de biorremediação.

## ***REVISÃO DE LITERATURA***



## 2 – REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 – PETRÓLEO E TOXICIDADE

O petróleo é um recurso natural, não renovável, formado por uma mistura complexa de compostos químicos classificados como: parafínicos, parafínicos-naftênicos, naftênicos, aromáticos intermediários, aromáticos asfálticos e aromáticos naftênicos (TISSOT e WELTE, 1984). Uma só amostra pode conter até 20.000 compostos diferentes (ALBERS, 2003; MARSHALL e RODGERS, 2004; SEABRA, 2008).

De acordo com a variação de densidade relativa, o petróleo é classificado utilizando-se uma medida conhecida como grau API, ou *API Gravity*. Amostras com grau API > 10 são consideradas leves e aquelas com grau API < 10 são mais densas e consideradas amostras de petróleo pesado (KHAVARI-KHORASANI et al., 1998; THOMPSON, 1983; ZHANG e HUANG, 2005).

Dois grupos de substâncias se destacam nas amostras de petróleo, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) e os n-alcanos, que fazem parte do grupo denominado de Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (TPH, em inglês). São mais de cem compostos originados do óleo cru, e recebem este nome graças aos principais átomos constituintes, carbono e hidrogênio (UDHHS, 1999).

Insolúveis ou de baixa solubilidade em água, os PAHs persistem no meio ambiente devido a presença de anéis aromáticos, acumulam-se na cadeia trófica e relacionam-se com mutagenicidade (YAN et al., 2004; SOLÉ et al., 1996) e ao câncer (JUHASZ e NAIDU, 2000). O acúmulo através de biomagnificação os torna componentes disponíveis na cadeia alimentar (McCAIN et al., 2011).

Tamanha sua importância como fonte de contaminação, são considerados prioritários no monitoramento ambiental (BOJES e POPE, 2007). Dentre todas as variações possíveis, dezesseis deles fazem parte de uma lista prioritária de monitoramento ambiental definida pela Agência Norte-americana de Proteção Ambiental (USEPA).

São eles: Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fluoranteno, Benzo[a]antraceno, Fenantreno, Antraceno, Pireno, Benzo[g,h,i]perileno, Benzo[a]pireno, Benzo[b]fluoranteno, Indeno[1,2,3-cd]pireno, Benzo[k]fluoranteno, Dibenzo[a,h]antraceno e o criseno (USEPA, 2007).

Apesar de muito tóxicos os PAHs não são o maior grupo constituinte nas amostras de petróleo (WANG e FINGAS, 1995 ;WANG e FINGAS, 1997; PAMPANIN e SYDNES, 2013). Menos tóxicos, porém mais abundantes nas amostras estão os n-alcanos. São hidrocarbonetos de cadeia linear ou ramificada que se tornam menos solúveis em água com o aumento do tamanho

destas cadeias (MABERY, 1924; ACC, 2017).

Uma revisão feita pelo *American Chemistry Concil* (ACC, 2017) aponta diversos riscos associados a apenas três das centenas de n-alcanos diferentes, o decano (C<sub>10</sub>), undecano (C<sub>11</sub>) e dodecano (C<sub>12</sub>). São relatados efeitos agudos, genotóxicos e citotóxicos a partir do contato com pequenas quantidades destas substâncias.

As razões entre PAHs e n-alcanos podem variar em amostras de petróleo coletadas em diferentes locais, o que as define em termos de identidade regional (KISSIN, 1987; AKBAR et al., 2009). Para diferentes tipos de óleos, diferentes estratégias de biorremediação podem ser adotadas.

## 2.2 - O PETRÓLEO NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

O Brasil está entre os principais produtores de petróleo no mundo, e também conta com a exploração na Amazônia, mais especificamente na Bacia Petrolífera de Urucu, próxima das margens do Rio Urucu, que pertence a macrorregião da cidade de Coari. São quatro campos produtores, sendo o principal deles o polo Arara, de onde a produção é escoada até o Terminal Aquaviário de Coari via tubulações que atravessam corpos d'água (PETROBRAS, 2017).

Partindo do Terminal Aquaviário, o gás natural produzido segue até Manaus via gasoduto, mas o petróleo é escoado através de navios petroleiros e / ou balsas, que seguem via Rio Solimões em um trajeto de aproximadamente 350 Km, para refino em Manaus (ANP, 2016).

Em termos industriais este óleo é considerado leve, com um grau API de 48,5. É uma mistura de hidrocarbonetos que não contém quantidades significativas de asfaltenos, estando restrita principalmente aos n-alcanos, naftalenos e, em menor grau, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (WANG et al., 2003). Petróleos com alta classificação API, como este, são muito dispersíveis na água, o que acarreta maior dificuldade na sua retirada após algum vazamento.

A literatura cita diversos acidentes envolvendo *pipelines* e / ou navios de transporte de petróleo, inclusive na Amazônia. Referida com “Rainforest Chernobyl”, a região de Cofán, no Equador, sofre até hoje as consequências da exploração de petróleo pela antiga Texaco®, hoje Chevron®, que sob a perspectiva da “exploração segura” e a contragosto da população local, contaminou a floresta, envenenou os rios e escureceu o ar, de acordo com CEPEK (2012).

Esta empresa foi acusada por despejar, inadvertidamente, mais de 18 milhões de galões de água utilizada para a extração de óleo bruto na floresta, em uma região próxima ao Lago Agrio. A água injetada nos poços para a ejeção do óleo é chamada “água de produção”, considerada um resíduo potencialmente contaminante, oriundo da extração petrolífera (ZHOU et al., 2012), e também deve ser biorremediada.

Caso semelhante aconteceu na bacia do *Rio Marañon*, que é um afluente do Rio Amazonas, quando o rompimento de um oleoduto contaminou os rios *Chiriaco* e *Morona*, no noroeste do Peru. A empresa responsável, Petroperu®, informou o derramamento após rompimento de dois canos e o vazamento de mais de 3.000 galões de petróleo nos rios supracitados (BOLONNUIY, 2016).

Na Venezuela, as poucas informações dão conta de que o principal corpo d'água atingido pela exploração de petróleo é o *Lago Maracaibo*, que sofreu contaminação devido ao rompimento de oleodutos sob responsabilidade da empresa petrolífera estatal do país, registrada principalmente à partir de dados de satélite (HU et al., 2003).

Existe pelo menos um relato importante de vazamento de óleo na reserva petrolífera de Urucu, quando 55.000 litros de óleo bruto vazaram do poço Marta 4, atingindo um subafluente deste mesmo rio (BRASIL, 2001).

## **2.3 - AS BACTÉRIAS E AS TECNOLOGIAS PARA BIORREMEDIAÇÃO DO PETRÓLEO**

Como ciência, a Biorremediação possui, como uma de suas principais vertentes, aquela que busca organismos que possuam a capacidade de sobreviver ao ambiente com petróleo e utilizá-lo como fonte de energia e / ou de carbono, sem aumentar sua toxicidade. Trata-se de um conceito conhecido como bioprospecção (PEIXOTO et al., 2008).

Resíduos de petróleo como n-alcenos e PAHs estão sujeitos a processos naturais que podem levar a sua diminuição no ambiente após vazamentos, como a volatilização, a degradação química e fotólise. Mas a degradação microbiana é a principal fonte de redução de danos (BAMPUS, 1989; YUAN et al., 2001).

Vários tipos de microrganismos podem atuar em processos de biorremediação ou serem utilizados em bioaumento, entre eles, fungos (BALLAMINUT e MATHEUS, 2007; ZAMANI et al., 2016), protozoários (REHMAN et al., 2005, KACHIENG'A e MOMBA, 2017) e bactérias (ERIKSSON et al., 2002; ZHONGTANG e MOHN, 2003; RUBERTO et al., 2003; MIYATA et al., 2004; BAYOUMI, 2009; YU et al., 2014; GKOREZIS et al., 2016).

Entre os microrganismos, alguns gêneros de bactérias se destacam quanto a capacidade de biorremediar contaminantes, entre eles: *Pseudomonas* (KACZOREK et al., 2012), *Acinetobacter* (FONDI et al., 2013), *Azotobacter* (GRADOVA, 2003), *Marinobacter* (GAUTHIER, 1992), *Bacillus* (RANYA et al., 2015) e *Burkholderia* (CHAILLAN et al., 2004).

Em relação as características morfotinturiais, já foram relacionadas à biorremediação de

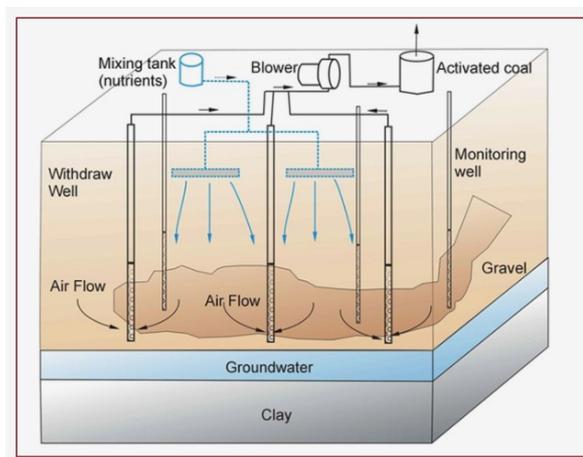
petróleo tanto bactérias Gram Positivas quanto Gram Negativas, mas Lãzãroaie (2010) sugere que as colônias Gram Negativas são mais tolerantes a misturas de hidrocarbonetos saturados, mono e poliaromáticos do que as Gram Positivas devido a indução de modificações celulares e moleculares e ambos os tipos de colônias.

Todas as tecnologias disponíveis precisam restabelecer o ambiente poluído seguindo alguns preceitos básicos, entre eles: serem ambientalmente amigáveis (eco-friendly), o que significa que não devem corrigir o problema do derramamento causando novos impactos ambientais e precisam funcionar ao menor custo financeiro possível (SHUKLA et al., 2017).

As tecnologias comuns para a biorremediação de petróleo são divididas como *in situ* (2.3.1 a 2.3.4) e *ex situ* (2.3.5 a 2.3.8):

### 2.3.1 – BIOVENTILAÇÃO (*BIOVENTING*)

Esta técnica consiste em se injetar oxigênio em zonas de insaturação para aumentar a biorremediação através do aumento das atividades dos microrganismos locais, acentuando a transformação do poluente (Figura-1). Esta técnica é mais efetiva em pequenos derramamentos, onde pequena quantidade da coluna d'água é afetada (HÖHENER E PONSIN, 2014; FRUTOS et al., 2010).



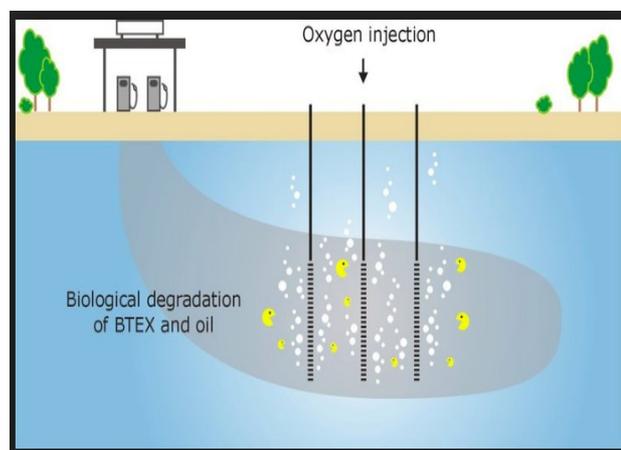
**Figura 1** – Esquema ilustrativo da técnica da Bioventilação. Disponível em: <  
<http://www.oil-gasportal.com/remediation-of-hydrocarbon-contaminated-soils/>  
> Acesso em: novembro de 2018.

Com esta técnica, Österreicher-Cunha et al. (2004) obtiveram uma maior velocidade na destoxificação de solos contaminados por uma mistura de etanol e gasolina pelo aumento da recuperação da microbiota impactada inicialmente e seu retorno para a condição inicial.

### 2.3.2 – BIOASPERSÃO (*BIOSPARGING*)

É uma técnica semelhante a bioventilação, quando gases, principalmente o oxigênio, são injetados no sistema. A principal diferença é que esta injeção é feita em zonas de maior profundidade, onde há mais saturação pelo contaminante. A ideia deste tratamento é promover uma ascensão dos contaminantes, principalmente os voláteis, até a superfície, de forma que possam ser acessados pelas comunidades microbianas (KAO et al., 2008).

A injeção em camadas mais profundas produz um deslocamento dos poluentes de uma região anaeróbica para outra aeróbica (Figura-2). Os compostos mudam de posição na coluna d'água, deixando de ser acessados pelo conjunto de microrganismos anaeróbios e passam a ser acessados pelo grupo dos aeróbios. A biorremediação é atingida quando se expõem os componentes a diferentes extratos de organismos e pela volatilização (PHILP e ATLAS, 2005).



**Figura 2** – Esquema ilustrativo da técnica da Bioaspersão. Disponível em: <<https://bioclearearth.com/techniques/biosparging>> Acesso em: novembro de 2018.

### 2.3.3 – BIOESTIMULAÇÃO (*BIOSTIMULATION*)

Esta técnica propicia o aumento da biodegradação utilizando a microbiota local através estímulo provocado enriquecendo-se o substrato com nutrientes orgânicos e / ou inorgânicos.

A taxa de nitrogênio, por exemplo, costuma decair mais rapidamente em ambientes contaminados devido a alta demanda metabólica, necessária para a quebra das moléculas agressora. Atagana, em 2008, conseguiu remover 100% de hidrocarbonetos de um e dois anéis de uma amostra contaminada com 38.000 mg / Kg de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (PTH) em 570 dias

adicionando ao meio uma mistura de serragem de madeira e esgoto.

Dadrasnia e Agamuthu (2013) conseguiram uma redução de até 82% nos TPH com a adição de uma mistura de farelo de soja, folhas de chá e casca de batatas em ambiente contaminado com diesel em um período de 126 dias. A contaminação passava de 100.000 mg / kg.

Outros estudos se utilizam do enriquecimento por NPK, técnica aplicada em solos contaminados e / ou aqueles que recebem os poluentes em processos de biorremediação *ex situ*, discutidos mais adiante (KA et al., 2001; CHOROM et al., 2010).

A razão de C/N/P considerada comum para experimentos de degradação de hidrocarbonetos em solo é de aproximadamente 100/10/1 (BOUCHEZ et al., 1995), mas Vidali (2001) estimou valores de 50/14/3 em bactérias crescidas em meio enriquecido e com uma fonte de carbono com fácil metabolização. Estes valores são bem menores em condições naturais, onde ocorrem derramamentos.

### **2.3.4 – BIOAUMENTO (*BIOAUGMENTATION*)**

Considerando que as populações autóctones nem sempre possuem capacidade para degradar a ampla gama de substâncias após contaminação com compostos complexos, como o petróleo, pode-se optar pela técnica de adição de microrganismos isolados e previamente cultivados ao sítio poluído, técnica conhecida como Bioaumento. A mudança das condições ambientais produzida pela contaminação por si só também pode colocar as comunidades locais sob estresse, dificultando a recuperação (LEAHY e COLWELL, 1990).

Colônias de microrganismos já foram utilizadas com sucesso em estratégias de biorremediação por Bioaumento para degradação de PAHs, destacando-se *Streptomyces* sp (XU et al., 2015), *Paracoccus denitrificans* (ZHU et al., 2015), *Arthrobacter* sp (SHI et al., 2015), *Bacillus thuringensis* e *Burkholderia pseudomallei* (BURAIMOH et al., 2017). A revisão bibliográfica não encontrou evidências da utilização da espécie *Burkholderia gladioli* para esta técnica.

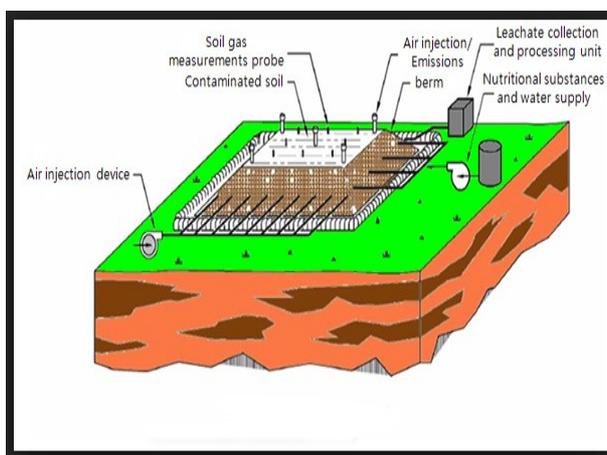
Apesar das técnicas de biorremediação *in situ* se mostrarem mais baratas e não produzirem modificações ecológicas no local (salvo no caso do Bioaumento utilizando organismos não indígenas), nestas técnicas é inviável / impossível o controle de variáveis importantes para a velocidade de descontaminação, como temperatura, pH, concentração de nutrientes e relações ecológicas, como competição, infecções virais e predação.

Este tipo de controle pode ser alcançado quanto se opta por compartimentalizar o ambiente

onde o processo biorremediador deve ocorrer, como é o caso das tecnologias de biorremediação *ex situ*. Ainda é possível a associação de técnicas como Bioestímulo e Bioaumento para melhores resultados. Lin et al. (2010) fizeram esta associação, utilizando *blends* de *Gordonia alkanivorans* e *Rhodococcus erythropolis* para biorremediação de óleo diesel e obtiveram boas taxas de redução dos contaminantes.

### 2.3.5 – BIOPILHA (*BIOPILE*)

Envolve a retirada de solo do local contaminado e seu acúmulo em camadas nas quais se possam controlar a umidade, a aeração e a adição de nutrientes (WHELAN et al., 2015). Pode-se ainda adicionar microrganismos na Biopilha, sendo os mesmos endógenos, porém cultivados em outro local, ou exógenos (Figura-3).



**Figura 3** – Esquema ilustrativo da técnica da Biopilha. Disponível em: <[http://www.dh3321.com/en/business/soil\\_remediation\\_tech.html](http://www.dh3321.com/en/business/soil_remediation_tech.html)> Acesso em: novembro de 2018.

Genovese et al. (2008), utilizaram inóculos de *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter Johnsonii* e *Rhodococcus erythropolis* associadas a Biopilha e ao Bioestímulo para degradação de BTEX, obtendo remoção de 90% dos hidrocarbonetos ao longo de 15 dias de tratamento.

### 2.3.6 – *WINDROWS*

Consiste em depositar o material que deve ser biorremediado em solo agrupado, semelhante à técnica anterior. Porém, aqui o depósito é feito na forma de leiras paralelas, que são periodicamente revolvidas para que se aporte oxigênio e água. O objetivo é que se melhore a

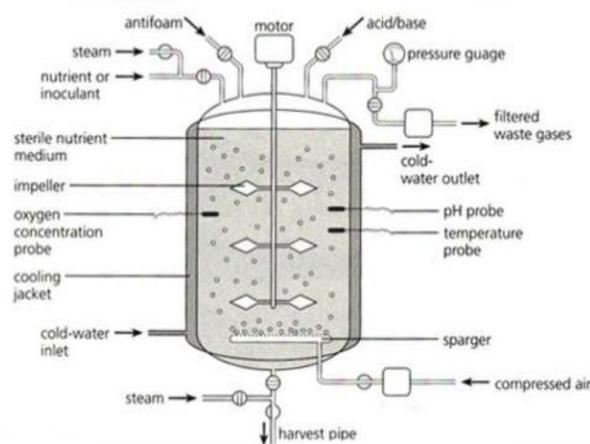
condição dos microrganismos responsáveis pela biorremediação (BARR, 2002).

Nesta metodologia o solo pode ser cultivado com inóculos de bactérias ou consórcios bacterianos selecionados de acordo com o alvo da biorremediação (FOGHT, 1998; ZHOU et al., 2012; WANG et al., 2015). São associações de técnicas como *Windrows* e Bioaumentação, por exemplo (JORGENSEN et al., 2000; STALLWOOD et al., 2005).

### 2.3.7 – BIORREATOR (*BIOREACTOR*)

Um Biorreator é um compartimento onde ocorrerão reações mediadas por organismos vivos. Neste caso bactérias biorremediadoras, especificamente para hidrocarbonetos de petróleo. É um preceito nesta metodologia que as transformações sofridas sejam compartimentalizadas, ocorram em etapas e sejam “rastreadas” (CHIKERE et al., 2012).

A principal vantagem desta abordagem é a capacidade de controle de diversos parâmetros associados ao bioprocessamento, como temperatura, aeração, umidade, agitação, disponibilidade do poluente, concentração do inóculo, pH e nutrientes (Figura-4). Com o ajuste destes fatores, aumenta-se a velocidade da biorremediação e diminui-se o tempo.



**Figura 4** – Esquema ilustrativo de um *Biorreator*. Disponível em: <<https://www.slideshare.net/deyasetty/bioreactors-71781761>> Acesso em: novembro de 2018.

Biorreatores foram utilizados com sucesso para tratamento de petróleo bruto e / ou derivados por Chikere et al. (2016), Bhattacharya et al. (2015), Firmino et al. (2015), Saravanan et al. (2015) e Xu et al. (2015).

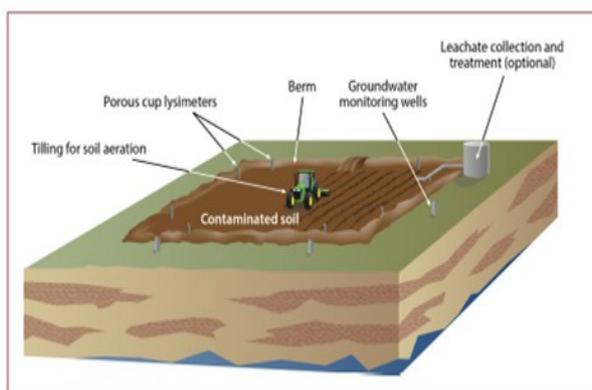
Uma das principais vantagens dos biorreatores é que podem ser associados com organismos geneticamente modificados, que podem ser destruídos sem risco de liberação para o meio ambiente,

ou com risco baixo por tratar-se de um compartimento fechado, evitando o escape gênico.

### 2.3.8 – *LANDFARMING*

Esta é uma das técnicas de biorremediação *ex situ* mais custo efetiva disponível, possui baixa complexidade em termos de equipamentos e, apesar de estar sendo elencada a este grupo de técnicas, também pode ser considerada como biorremediação *in situ*. Quando ocorre a penetração do poluente em menos de 1,7 metros de profundidade, o tratamento é realizado no local (PAUDYN et al., 2008).

Este termo nomeia um método onde o poluente é depositado sobre o solo, que é revolvido periodicamente para manutenção da aeração e, conseqüentemente, o desenvolvimento de microrganismos autóctones e / ou adicionados. Esta metodologia pode ser associada ao Bioaumento e ao Bioestímulo (SILVA-CASTRO et al., 2012).



**Figura 5** – Esquema ilustrativo da técnica da *Landfarming*. Disponível em: <<https://www.epa.nsw.gov.au/-/media/epa/corporate.site/resources/clm/140323landfarmbpn.pdf>> Acesso em: novembro de 2018.

*Landfarming* está associada com biorremediação de derivados de petróleo em diferentes locais e com diferentes condições climáticas, sozinha ou associada com outras técnicas (MAILA e CLOETE, 2004; BROWN et al., 2017).

## 2.4 – PATENTES EM BIOREMEDIAÇÃO DE PETRÓLEO

Todas as técnicas citadas anteriormente não são novidade no campo da biorremediação, mas inovações sempre tem surgido nesta área, dando origem a patentes, propriedade intelectual, desenvolvimento tecnológico, lucro e proteção ao meio ambiente.

Uma simples busca utilizando o motor de busca *Google Patents*<sup>TM</sup> pelo termo “*petroleum biorremediation*” retorna mais de 7.000 resultados. A análise de todas as entradas seria difícil em um curto período de tempo, mas muitas delas possuem termos como “bacteria”, “degrading bacteria”, “bacteria consortium”, “biosurfactants”, “fertilizer” e “biopreparation”.

Cho et al. (2002) isolaram uma linhagem de *Stenotrophomonas maltophilia* de solos contaminados com óleo, identificaram as frações de hidrocarbonetos que a mesma é capaz de degradar e desenvolveram um método onde células cultivadas são utilizadas na forma líquida ou em pó para biorremediação de óleo cru e derivados. Previamente ao desenvolvimento da patente, a linhagem foi identificada como nova dentro da espécie.

Os mesmo autor propôs outra patente com uma espécie de *Burkholderia cepacia* utilizando o mesmo enfoque, descrevendo a linhagem como nova e extremamente capaz de degradar PAHs de alto peso molecular, como o pireno, por exemplo e também de baixo peso molecular, como o fenantreno (CHO et al., 2003).

Uma patente foi desenvolvida por Xu et al. (2015) ao provarem que uma linhagem de *Mycobacterium* sp. é capaz de crescer em óleo bruto e diminuir a quantidade do contaminante em 71,4% após 18 dias de exposição em meio de cultura simples e temperaturas entre 5 e 15 °C.

Ao contrário de linhagens isoladas, tecnologias desenvolvidas utilizando associação de diferentes espécies em consórcios prometem ser capazes de atuar em diferentes extratos do contaminante, ou ainda em frações de difícil acesso por linhagens isoladas, graças à grande complexidade química.

Kumar et al. (2009) patentearam uma invenção que se utiliza de três microrganismos sendo duas linhagens de *Pseudomonas putida* e uma linhagem de *Pseudomonas fulva* em associação com a técnica da biopilha. De acordo com os autores, atinge-se a degradação entre 75% e 90% dos hidrocarbonetos totais de petróleo em 30 dias.

Uma outra vertente no desenvolvimento de patentes em biorremediação de petróleo é aquela que produz materiais compostos, dos quais fazem parte linhagens de microrganismos.

É o caso, por exemplo, da patente US20130196420 (MATHIS, 2013) que se utiliza de madeira infectada por besouros de uma entre diferentes espécies de *Pinus*, juntamente com uma entre várias espécies bacterianas presentes no inseto, associada ao enriquecimento por minerais para biodegradação de n-alcenos de petróleo.

Além da aplicação da colônia propriamente dita, existem patentes associadas com derivados das células, como no caso da patente número US20090325271A1 de Upreti et al. (2006), que isolaram biosurfactantes de um consórcio bacteriano, para a utilização em seu método de tratamento bio-assistido para hidrocarbonetos, em solos contaminados por óleo bruto.

Todas as técnicas citadas anteriormente podem ser associadas ao processo de Bioaumentação, o que torna necessário o conhecimento de linhagens que possam atuar em diferentes frações do petróleo. Dentre diferentes microrganismos, as bactérias são os mais versáteis para este tipo de utilização devido a características como: fácil cultivo, crescimento rápido em condições de pré inoculação e versatilidade genético-bioquímica. O gênero *Burkholderia* faz parte deste grupo.

## **2.5 – O GÊNERO *BURKHOLDERIA***

O gênero *Burkholderia*, subfiló  $\beta$ -proteobacteria, compreende bactérias com genomas complexos e grande diversidade ecológica, comuns em solos e raízes de plantas. Já existem, pelo menos, 100 espécies descritas (O'SULLIVAN e MAHENTHIRALINGAM, 2005). Ao longo do tempo, a medida que novas espécies são descritas, é aparente o destaque deste grupo em relação ao potencial biotecnológico graças a produção de enzimas hidrolíticas, compostos bioativos e a capacidade para degradar compostos recalcitrantes (EBERL e VANDAMME, 2016).

Trata-se de um dos grupos de bactérias mais versáteis quanto à capacidade de degradação de componentes de petróleo (URBANCE et al., 2003). Esta versatilidade é explicada por dois fatores principais, o genoma robusto, chegando a atingir mais de 9 Mb na forma de múltiplos *replicons* e arranjos de sequências de inserção capazes de produzir grande plasticidade e maior capacidade de adaptação (LESSIE et al., 1996; NIERMAN et al., 2004).

São descritas diversas cepas deste gênero capazes de degradar compostos de petróleo e / ou relacionados, entre eles o bifenil e o benzoato (DENEFF et al., 2004), fenantreno (BALASHOVA et al., 1999), naftaleno (KANG et al., 2003), pireno (DENG et al., 2012) e o benzoantraceno (JUHASZ et al., 1997).

Tais organismos são capazes de sobreviver em ambientes contaminados, em detrimento a outras espécies de bactérias, devido a um repertório genético desenvolvido ao longo do processo evolutivo. O contato prévio com substâncias de complexidade semelhante pode explicar esta capacidade.

## **2.6 - GENES DE DEGRADAÇÃO DE COMPONENTES DE PETRÓLEO**

Uma vez que algumas linhagens bacterianas podem possuir capacidade de sobrevivência e desenvolvimento em um ambiente hostil (STOPNISEK et al., 2016), como aquele produzido pelo derramamento de petróleo, espera-se que estas possuam um repertório genético e, conseqüentemente,

vias metabólicas diferenciadas.

Qualquer gene utilizável para biorremediação de componentes de petróleo deve estar presente: no genoma principal bacteriano (referido também como cromossoma bacteriano), sozinho; ou em *operons*; ou em um genoma extra cromossomal, denominado plasmídio. É comum que estes genes, quando em sequência, sejam flanqueados por elementos de transposição, o que confere capacidade de transferência horizontal (NYSSÖNEN, 2009).

Plasmídios estão relacionados com genes para degradação de benzeno (TAN e MASON, 1990), naftaleno (BORONIN et al., 1980, DUN e GUNSALUS, 1973), fenol (HERMAN et al., 1987), salicilato, (GUNSALUS et al., 1982) e tolueno (WILLIAN e WORSEY, 1976; TSUDA e LINO, 1987), com variações de tamanho entre 83 e 117 kb.

A linhagem *Pseudomonas putida* F1 é capaz de oxidar o tolueno por meio de um sistema multienzimático conhecido como tolueno dioxygenase. Este sistema possui funcionamento coordenado, sendo interrompido em mutantes por perda de função para qualquer um de seus componentes (ZYLSTRA et al., 1988).

Este comportamento é comum quando os genes para a via de degradação estão organizados em sequência, sendo ativados ou desativados em conjunto. Gibson e Kallio (1968) descreveram pela primeira vez este sistema em *Pseudomonas putida* F1, denominando-o de operon *tod*.

Em *Pseudomonas putida* GP<sub>01</sub> foi descrita a presença do operon *alkBAC* associado ao plasmídio OCT. Este operon foi relacionado a degradação de n-alcenos de cadeias C<sub>5</sub> a C<sub>14</sub>, possui sete genes (*alkBFGHJKL*) e um locus regulador, o *alkR* (FENNEWALD et al., 1979; EGGINK et al., 1988; KOK et al., 1989; van BEILEN et al., 1992).

A mobilidade destas organizações gênicas entre o cromossomo principal bacteriano e os plasmídios, assim como sua transmissão horizontal está associada com a presença de elementos de transposição, ou *transposons* (TAN, 1999). Um dos plasmídios mais conhecidos relacionados com a degradação de componentes de petróleo é o TOL pWW0 (KASAI et al., 2001). Ele possui um *operon* com genes para biorremediação de tolueno e xileno pela via do catecol. Este plasmídeo possui regiões transponíveis que flanqueiam toda a cadeia gênica. Entre os genes envolvidos na capacidade transpositora estão *tnpA*, *tnpS* e *tnpT* (BURLAGE et al., 1989).

Eventos como mutações de ponto, rearranjos (entre eles, inserções, deleções, duplicações e inversões), recombinação e transposição podem produzir rotas catabólicas nunca antes descritas (van der MEER et al., 1992).

Além dos tipos de organização gênica supracitados, genes relacionados a degradação de hidrocarbonetos isolados também podem ocorrer de forma dispersa no(s) cromossomo(s) central(is) bacteriano(s).

A capacidade de crescimento em meio contendo n-alcanos característicos do petróleo é conferida, por exemplo, pelos genes do sistema alcano hidrolases (van BEILEN et al., 2002), e quando o naftaleno é a fonte de carbono, pelo sistema naftaleno dioxigenase (FUENMAYOR et al., 1998). Um destes genes é o *alkB*, considerado importante na degradação de n-alcanos de cadeia curta, devido a sua abundancia em colônias que degradam estes compostos (VOMBERG e KLINNER, 2000).

Uma das principais vias de degradação aeróbica para os HPAs é baseada na oxidação dos anéis aromáticos e posterior quebra dos metabólicos resultantes, preferencialmente até dióxido de carbono. As principais enzimas envolvidas são as dioxigenases e, eventualmente monoxigenases, como a citocromo P450 monoxigenase (MUELLER et al., 1997). Uma dioxigenase importante para a degradação do fenantreno é codificada pelo gene *nahAc* (MARLOWE et al., 2002).

O HPA é degradado pelas enzimas anteriores até cis-Diidrodiol, desidrogenado até o catecol, que é quebrado em ácido cis-Mucônico ou a 2-semialdeído-hidroximucônico, em condições aeróbicas (CERNIGLIA, 1992), são os genes que produzem a rota conhecida como via do catecol.

Muitas vezes, antes da degradação propriamente dita, a biodisponibilidade do poluente é aumentada por *biossurfactantes*, moléculas capazes de imobilizar os poluentes de forma a torná-los acessíveis para os microrganismos degradadores (NEU, 1996). Os produtos dos genes *rhlB*, *sfp*, *sfp0*, *srfA*, cumprem esta função (MATHIYAZHAGAN, 2011; SEKHON, et al., 2011).

## **2.7 - GENÔMICA FUNCIONAL E COMPARATIVA APLICADAS BIORREMEDIAÇÃO**

Apesar de todos os esforços, parece que a metodologia principal utilizada na correção de danos causados por contaminação de petróleo ainda continua sendo baseada na estratégia conhecida como “muck, suck and truck”, ou seja, suje, succione e leve embora (SINGH e WARD, 2004).

Esta estratégia não consegue despoluir totalmente o ambiente, principalmente no caso de derramamento de petróleo com alto grau API. Novas tecnologias, como o uso de *skimmers*, por exemplo, atingem taxas de 15% de retirada do óleo, barragens artificiais chegam a atingir 95% (COOLBAUGH e CHOPRA, 2017). Ou seja, na melhor das hipóteses, 5% do contaminante ainda permanece na coluna d'água.

Com o advento e popularização do sequenciamento de nova geração / alto rendimento, a geração de grande quantidade de dados sobre o genoma, a investigação dos genes que um organismo possui e a predição das possíveis vias metabólicas que são executáveis já é possível em

um período relativamente curto de tempo. Pode-se, inclusive, relacionar a abundância de genes presentes no genoma e o possível potencial para biorremediação (SCHNEEGURT et al., 1998).

Existem vários organismos com o genoma sequenciado disponíveis para consulta no banco de dados *Genome* do NCBI e que são importantes para a biorremediação, entre eles *Rhodopseudomonas palustris* (GIBSON e HARWOOD, 2002), *Dechloromonas aromatic* (COATES et al., 1999), *Desulfovibrio vulgaris* (HEIDELBERG et al., 2004), *Deinococcus radiodurans* (MAKAROVA et al., 2001), *Pseudomonas putida* (NELSON et al., 2002) *Burkholderia sp* SJ98 (KUMAR et al., 2013).

Através do sequenciamento obtém-se dados como: tamanho total do genoma, regiões espaçadoras, número de genes preditos, genes homólogos, famílias de genes, genes ainda não descritos, sequências de inserção, presença de plasmídios, *operons* e regiões reguladoras (MATH et al., 2012).

Genes e vias envolvidos nos processos de degradação e adaptação aos xenobióticos podem ocorrer fora do genoma principal, nos plasmídios, moléculas facilmente herdáveis horizontal e verticalmente entre as bactérias (CUEVA-MÉNDEZ e PIMENTEL, 2007). A troca de material genético intra e interespecificamente produz capacidade adaptativa local (NESATY e SUTER, 2008).

Análises de genômica comparativa podem esclarecer dúvidas em relação ao padrão evolutivo de uma determinada espécie quando comparado com outras. Em seres unicelulares com genomas simples e grande potencial biotecnológico, como as bactérias, este tipo de abordagem pode evidenciar a presença de sequências únicas, bem como padrões de rearranjos de DNA que podem não ser encontrados em outros locais.

Diferentes fenótipos podem ser atribuídos para uma mesma espécie bacteriana em relação a capacidade de degradação de xenobióticos, dependendo do local onde ela for coletada, o que reflete especificidade local. Foi o que ocorreu com Nayak et al. (2011) e Patel et al. (2012), que encontraram a capacidade de degradação de criseno e fenantreno, respectivamente em linhagens de *Pseudoxantomonas sp.*, coletadas em locais diferentes.

Pathak et al. (2013) conseguiram demonstrar a presença de grupos de genes catabólicos relacionados com a degradação de naftaleno, fenantreno, antraceno e benzo-a-pireno, a partir de um rascunho do genoma sequenciado e anotado de *Rhodococcus opacus*, na tentativa de elucidar seu potencial metabólico.

Quando estes genes estão flanqueados por elementos genéticos associados a mobilidade, como transposons e / ou sequências de bacteriófagos, formam-se as Ilhas Genômicas (GI). Neste tipo de organização, fenótipos associados a estes grupos de genes são transferidos horizontalmente,

sendo associados a evolução e plasticidade genômica (SCHIMIDT e HENSEL, 2004).

Gaillard et al. (2006) encontraram Ilhas Genômicas com genes relacionados a degradação de compostos aromáticos como 4-clorocatecol e 2-aminofenol. Estas aglomerações gênicas possuem genes para várias oxigenases, enzimas primordiais no início das vias de quebra de PAHs, por exemplo.

## ***OBJETIVOS***



### **3 - OBJETIVOS**

#### **3.1 - OBJETIVO GERAL**

- Caracterizar em nível genômico a linhagem de *Burkholderia gladioli* isolada do Lago de Coari com enfoque em sua capacidade de degradar componentes de petróleo, além da investigação de sua ação sobre o petróleo de Urucu.

#### **3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar sistematicamente a linhagem ao nível de espécie.
- Avaliar a resistência aos antibióticos através de antibiograma.
- Analisar a capacidade de degradação dos n-alcenos do petróleo de Urucu utilizando Cromatografia Gasosa associada a Espectrometria de Massas.
- Sequenciar, montar e anotar o genoma.
- Identificar os potenciais genes / vias envolvidas no processo de degradação de compostos do petróleo.
- Comparar o genoma montado com espécies importantes para biorremediação de óleo bruto em busca características únicas.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***



## 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 - LOCAL DA COLETA

O Lago de Coari (Figura 6) é um corpo d'água localizado na margem direita do Rio Solimões, e possui em suas margens a cidade de Coari, com aproximadamente 75.000 habitantes, distante 360 Km da capital do estado, Manaus.

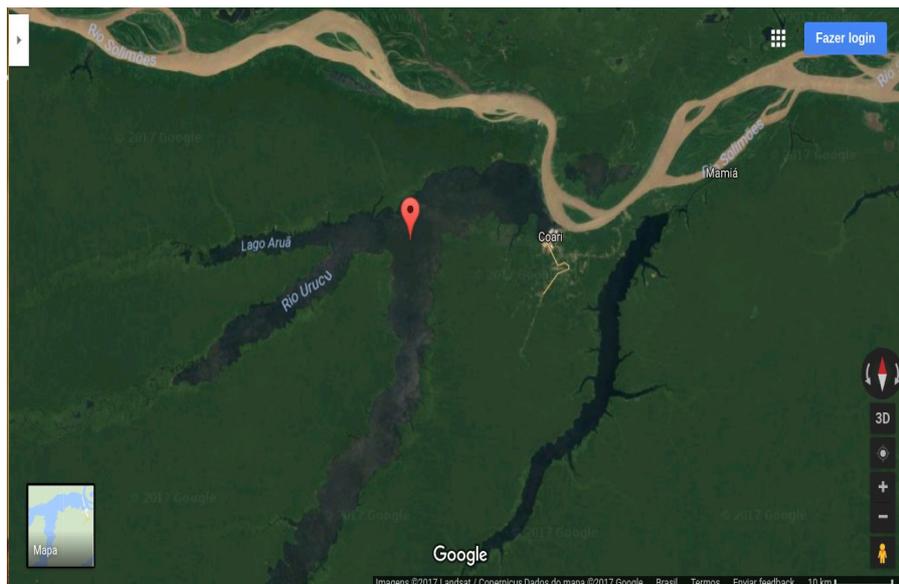
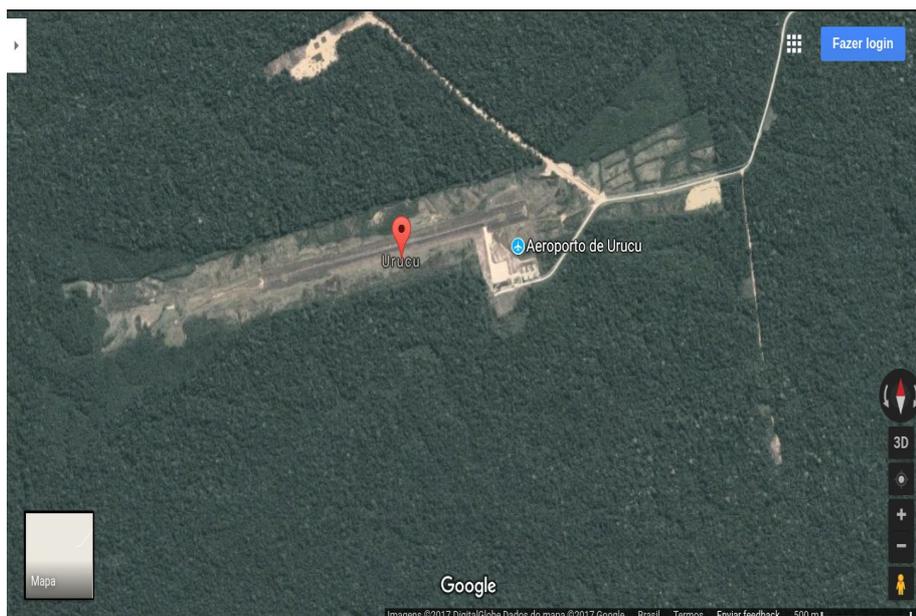


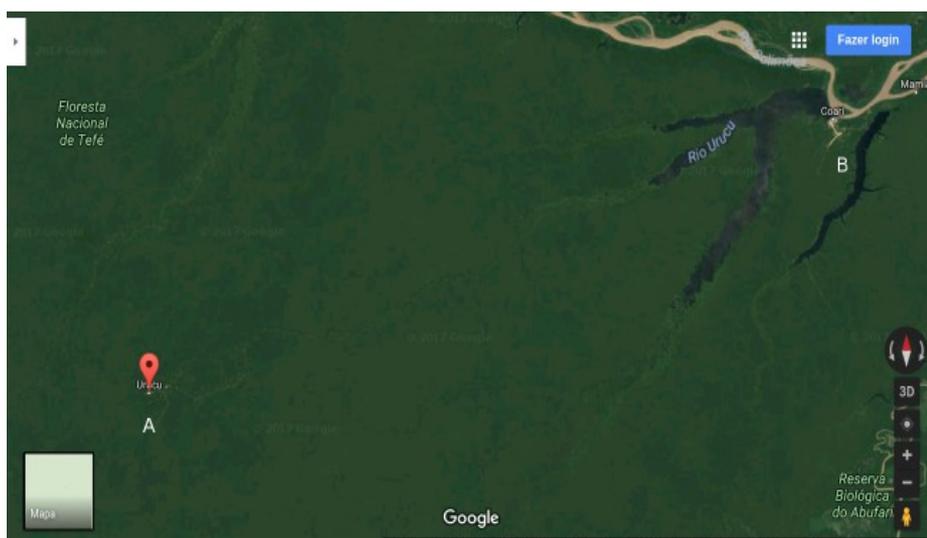
Figura 6 – Imagem de satélite do lago de Coari. Fonte: Imagens Google®.

Como outros lagos amazônicos, possui águas pretas e atividade antrópica, principalmente a navegação. Sua área é de 624 km<sup>2</sup> e seus afluentes são os Rios Coari, Urucu e Aruá (CARMO, 2010). Um de seus afluentes é rota de passagem para escoamento da produção petrolífera da Base Operacional Geólogo Pedro Moura (BOGPM), conhecida como Base Petrolífera de Urucu (Figura 7), através um oleoduto.

Trata-se do oleoduto Rio Solimões, formado por 2 dutos de 281 km cada, que faz o escoamento de petróleo e gás extraído pela PETROBRÁS da UPGN-Urucu (Figura 7) até o Terminal Aquaviário de Coari, operado pela Transpetro (sua subsidiária). Cada duto possui 10 e 14 polegadas, respectivamente, que atravessam o Rio Urucu. De lá o petróleo segue até a Refinaria Issac Sabbá (REMAN) na cidade de Manaus, através de navios tanque e / ou balsas. A distância entre a UPGN-Urucu e a cidade de Coari é de aproximadamente 600 km (Figura 8).



**Figura 7** – Unidade Produtora de Petróleo de Gás Natural da Petrobras em Urucu. Fonte: Imagens Google®.



**Figura 8** - Imagem de satélite relacionando com indicativo da localização da Base de Urucu (Ponto A) em relação à Cidade de Coari (Ponto B), onde se encontra o Terminal Aquaviário de Coari. Fonte: Imagens Google®.

## 4.2 - COLETA

No ano de 2014, foram realizadas coletas de água no Lago de Coari, nas proximidades do oleoduto ORSE I, através do mergulho de recipientes plásticos estéreis (ALEXANDER et al., 2008) ao longo da coluna d'água, em pontos diferentes, até que se atingissem volumes de 2 L em cada

recipiente.

Todos os frascos plásticos foram esterilizados anteriormente a coleta segundo Alexander et al. (2008) e os pontos de coleta georreferenciados através de sistema de GPS. Todo o protocolo de coleta e isolamento foi realizado segundo os trabalhos de Da Costa (2004), Alexander (1999) e Pellizari (1995), com adaptações.

Logo após a coleta, o material foi conduzido sob refrigeração até as dependências do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Saúde e Biotecnologia de Coari (ISB-Coari), homogeneizado em frasco estéril e dividido em duas amostras, uma delas utilizada para o isolamento e outra estocada em freezer.

Colônias resistentes ao petróleo de Urucu foram isoladas a partir de experimentos de enriquecimento de cultura realizados por Cardenes (2014). Uma delas foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Josemar Gurgel da Costa para realização deste trabalho.

### **4.3 – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E GRAM**

A morfologia da colônia foi determinada utilizando microscopia estereoscópica com aumento de 40X e microscopia fotônica de luz com aumento de 1000x (BREAKWELL et al., 2007). Foram considerados critérios como: tamanho da colônia, forma, elevação, bordos, estrutura, brilho, cor e aspecto, além de gram químico e da coloração de Gram.

#### **4.3.1 - GRAM QUÍMICO**

A metodologia denominada “Gram Químico” é baseada na ruptura da célula pelo KOH a 3% e liberação do conteúdo celular, que só ocorre com bactérias Gram Negativas, classificada como reação positiva quando se observa a formação de fios viscosos pela movimentação da alça de inoculação em contato com a colônia (BUCK, 1982).

Para realização deste procedimento, foi dispensada uma gota de KOH a 3% em uma lâmina de microscopia, seguido da coleta parcial de uma colônia crescida em meio LB por 24 com o auxílio de uma ponteira para micropipeta P100. A colônia foi espalhada sobre a gota de KOH através de movimentos circulares, por 30 segundos.

Após este tempo, foram realizados movimentos onde uma ponteira de micropipeta era tocada na placa na região onde a colônia havia sido espalhada seguido de movimentos *up and down* de cerca de 10 mm para a observação da formação ou não de fios viscosos, indicativo do caráter Gram Negativo, ou a ausência da formação dos mesmos, indicativo do caráter Gram Positivo.

### 4.3.2 - COLORAÇÃO DE GRAM

Como confirmação do Gram Químico foi realizada a Coloração de Gram, de acordo com Mahon e Manuselis (1997), quando células obtidas a partir de cultura líquida de 24 horas de crescimento foram espalhadas em lâminas para microscopia limpas, fixadas através de aquecimento brando em bico de *Bunsen* e cobertas com o corante Violeta de Genciana por 1 minuto.

Após este tempo, a lâmina com as células fixadas foi lavada brandamente em um filme de água corrente para a retirada do Cristal Violeta e coberta em seguida com lugol fraco por 1 minuto. O lugol foi então retirado da lâmina através da adição de uma solução descolorante baseada em álcool e acetona até que o líquido se tornasse incolor.

A solução de álcool e acetona foi retirada lavando-se novamente a lâmina em água corrente, sendo a mesma coberta em seguida por uma solução de Fucsina de Gram, por 60 segundos. Passado este tempo, a lâmina foi lavada em água corrente pela última vez e deixada inclinada para secar.

Uma vez seca, foi realizada a análise celular em microscópio fotônico de luz marca Zeiss® utilizando um aumento total de 1000 X. Esta análise considerou células bacterianas coradas em tons de azul como bactérias Gram Positivas e células coradas em tons de rosa como Bactérias Gram Negativas.

### 4.4 - TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

Foi realizado um teste de sensibilidade a antibióticos, ou antibiograma, objetivando investigar a adequação da espécie as condições de biossegurança locais. Para isto, uma amostra foi coletada de uma placa de Petri após 24 horas de crescimento com auxílio de uma alça de inoculação e inoculada em meio líquido LB Himedia®. Após 24 horas de crescimento, foi realizado o isolamento de células por centrifugação seguida de diluição da suspensão celular em solução salina a 0,8 % em tubo de ensaio a uma absorvância de 0,1 a 625 nm.

Após a diluição, foi coletada uma alíquota através do mergulho de um *swab* no interior do tubo e retirada do excesso de líquido, todo o procedimento foi realizado em cabine de fluxo laminar.

O coletado foi espalhado em Placas de Petri contendo meio *Müller-Hilton* (Difco®) através do toque do *swab* umedecido com a solução salina seguido da cobertura total da placa através de esfregação suave enquanto a mesma era girada 60° por 3 vezes.

Sob a placa de Petri foi depositada uma placa multidiscos de antibióticos para bactérias Gram Negativas (Laborclin®), com o auxílio de uma pinça. A placa foi incubada por 24 horas em

estufa a 37° C. Em seguida foi realizada a análise através da medida do diâmetro dos halos produzidos com o auxílio de um paquímetro.

A base de utilização foi o protocolo de Kirby e Bauer, descrito por Hudzicki (2016), que se baseia no princípio de que discos de papel embebidos em soluções de antibióticos levam os mesmos a se difundirem no ágar em que são depositados. Bactérias que são resistentes aos apresentam crescimento em direção / sobre o meio difundido.

Ao contrário, bactérias que não “resistem” ao antibiótico não crescem ao longo do espaço de difusão, produzindo um halo. Foram testados 12 antibióticos, entre eles: Ampicilina, Amicacina, Amoxicilina + clavulanato, Ceftazidima, Cefepime, Cefoxitina, Cefuroxima, Ciprofloxacina, Gentamicina, Meropenem, Cefalotina e Sulfazotrim.

#### 4.5 - EXPERIMENTO DE BIODEGRADAÇÃO

Após identificação inicial, células criopreservadas foram reativadas utilizando como substrato meio LB líquido em garrafas de vidro estéreis, em volumes de 50 mL, por 24 h, em *shaker* a 37 °C. Estas colônias foram submetidas a experimentos de biodegradação, conforme segue.

Cada repetição foi feita utilizando-se Erlenmeyers de 250 mL, que foram preparados com meio de cultura *Bushnell-Hass* composto 85% do volume, óleo bruto de Urucu a 5% do volume e 10% de inóculo. O inóculo continha a colônia de *Burkholderia gladioli* pura, crescida, lavada e ressuspensa em solução salina a 0,85%, com uma O.D. de 1,0 a 600 nm.

O volume final de cada frasco nas triplicatas foi de 100 mL, estes sofreram agitação em *shaker* a 37 °C. Os experimentos de biodegradação foram realizados considerando-se os tempos 0 dias, 7 dias, 14 dias e 21 dias. Para garantir a pureza da colônia, foram realizados esgotamentos com alça de inoculação em meio LB sólido ao longo de todos os tempos supracitados.

Como controle negativo, foram montadas triplicatas contendo meio *Bushnell-Hass* (Gibco®) como 85% do volume, óleo bruto a 5% do volume e uma simulação de inóculo contendo apenas solução salina a 0,85% equivalente a 10% da solução. Os experimentos de controle também foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL de volume, nas mesmas condições das amostras.

Os frascos foram identificados como C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> referentes aos controles dia 0, 7, 14 e 21 dias, respectivamente, e os frascos com inóculos foram identificados como B<sub>0</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>3</sub> para inóculos no dia 0, 7, 14 e 21 dias respectivamente.

Para se investigar a possível presença de bactérias no óleo bruto, que não foi esterilizado, foram realizados esgotamentos com alça de inoculação em placas de *Petri* contendo meio LB sólido, em triplicatas. Após os esgotamentos, as placas foram deixadas em estufa nos tempos de 24

e 48 horas e analisadas quanto a existência de microrganismos

#### 4.5.1 - EXTRAÇÃO DO ÓLEO RESULTANTE DO MEIO DE CULTURA

Nos tempos supracitados, os *Erlenmeyers* contendo amostras e contendo os controles foram retirados do *shaker* para a extração do óleo resultante da ação bacteriana através de protocolo de extração líquido-líquido, método USEPA 3510C, adaptado. As triplicatas para C<sub>0</sub> e B<sub>0</sub> não sofreram agitação.

Para a extração do óleo resultante da cultura e dos controles, os meios de cultura de cada frasco foram transferidos para tubos *Falcon* de 50 mL e centrifugados para a retirada de células, o líquido resultante foi despejado em funis de separação. O óleo aderido na parede dos *Erlenmeyers* foi extraído adicionando-se 5 mL de hexano, seguido de agitação vigorosa (HALEYUR et al., 2016). O volume resultante foi vertido no interior do funil para a extração final do óleo do meio de cultura.

Após versão do volume de hexano, cada funil de separação foi fechado, agitado vigorosamente e deixado em repouso para a formação de fases distintas. A solução resultante da mistura óleo / hexano foi separada do meio de cultura por diferença de densidade. O resíduo de interesse foi coletado em frasco do tipo *Bequer* de 150 mL previamente adicionado com 1,0 g sulfato de sódio anidro (Sydney<sup>®</sup>) para a retirada de água do sistema. Após, foram retiradas alíquotas de 1 mL com o auxílio de seringas de *Hamilton*, evitando-se a sucção do sal. Estas foram estocadas em frascos âmbar de 5 mL identificados, em freezer -20 °C, até o momento da realização das análises.

#### 4.5.2 - TESTE DE RECUPERAÇÃO

Para estimativa da perda durante o processo de manipulação para a extração do óleo, 5 mL de petróleo bruto proveniente de Urucu foram diluídos em 5 mL de hexano. Após diluição, uma alíquota de 1 µL foi retirada, diluída 1000 vezes em hexano padrão HPLC para injeção automática de 20 µL em equipamento de GC/MS, este experimento foi denominado “recuperação dia 0”. A injeção da mistura petróleo puro mais hexano no equipamento gerou um comatograma cuja somatória das áreas dos gráficos dos n-alcenos totais foi considerada como 100%.

Paralelamente, foi realizada a extração do óleo nas triplicatas do experimento denominado C<sub>0</sub>. O material extraído desta condição sofreu o mesmo tratamento das amostras dos experimentos com inóculos e nos controles.

O valor da porcentagem de recuperação foi obtido através do valor médio das triplicatas do experimento denominado anteriormente de  $C_0$  dividido o valor médio das triplicatas do experimento denominado “recuperação dia 0” e multiplicado por 100.

#### **4.5.3 - ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA GASOSA ASSOCIADA ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC/MS)**

A análise de Cromatografia Gasosa Associada a Espectrometria de Massas (COLLINS et al., 2006) foi realizada retirando-se de cada repetição o volume de 1 mL, que foi diluído 1000 X utilizando-se Hexano grau HPLC (Sigma®). Após a diluição, os volumes finais de 1 mL foram introduzidos em frascos do tipo *vial*. Os frascos foram colocados em equipamento marca *Shimadzu QP 2010-Plus*® com coluna tipo *PTX-5MS*®, utilizando hélio como gás de arraste no modo *splitless*. O volume succionado e injetado automaticamente pelo equipamento foi de 20 µL. As condições de corrida foram programadas, com alterações, utilizando o protocolo de acordo com Zhang et al. (2011), com a utilização de série homóloga  $C_7$  a  $C_{31}$  como padrões externos. As aquisições dos espectros de massas foram realizadas nos modos *fullscan* e SIM (Monitoramento Seletivo de Íons), com cada íon dos n-alcenos correspondente a o tempo de retenção dos padrões externos (GURAV et al., 2017).

O termo repetição se refere a cada Erlenmeyer da triplicata utilizado nos experimentos de biodegradação com inóculo da colônia ( $B_0$  a  $B_3$ ) e nos experimentos de controle ( $C_0$  a  $C_3$ ). Para o tratamento dos dados foi utilizado o software *LabSolutions / GCMS Solution v. 2.53*®. O protocolo foi baseado em Douglas et al. 1994, com algumas modificações.

Os principais alvos desta análise foram os n-alcenos, sendo a atuação da bactéria sob os mesmos estimada através das médias das somatórias das áreas de todos os picos obtidas pelo GC/MS para as repetições dos experimentos de biodegradação e dos experimentos controle, considerando o ajuste do equipamento em modo SIM e o tempo de retenção da série homóloga ( $C_7$  a  $C_{31}$ ).

#### **4.6 – ANÁLISE DO CRESCIMENTO BACTERIANO**

Nos tempo de 7, 14 e 21 dias, foi coletada através de micropipeta de cada amostra 1 mL da área livre de óleo. Estas amostras foram transferidas para tubos *Falcon* de 15 ml e centrifugadas 5.000 rpm em temperatura ambiente.

O sobrenadante foi retirado com o auxílio de micropipeta, mantendo-se o *pellet* de células,

que foi ressuspendido em solução de NaCl a 0,85%, para medida O.D. em 600 nm utilizando espectrofotômetro, esta foi uma estimativa do crescimento (OKERENTUGBA e EZERONYE, 2003).

Foram calculadas médias das triplicatas para os experimentos de biodegradação, partindo-se do pressuposto que, no tempo zero, a média de todas as O.D. nas triplicatas foi igual a 1,0. Esta medida foi realizada com os grupos controle, como evidencia da ausência de contaminação, já não possuíam células.

#### **4.7 – GENÔMICA E GENÔMICA FUNCIONAL**

Para a análise do genoma, células foram crescidas em triplicatas separadas durante o experimento de biodegradação, em frascos nas mesmas condições do experimento com inóculos, para garantia de pureza da cultura. Após 7 dias de crescimento, foi retirado 1 mL de solução de três diferentes frascos para obtenção do DNA, em condições estéreis.

##### **4.7.1 - EXTRAÇÃO DO DNA PARA SEQUENCIAMENTO DO GENOMA**

O DNA foi extraído e purificado utilizando-se o protocolo de extração por fenol-clorofórmio (SAMBROOK e RUSSEL, 2006), quantificado utilizando-se o *Qubit*<sup>®</sup> e teve sua pureza final verificada através de espectrofotometria em *Nanodrop*<sup>®</sup>. Foram considerados como critério: condições das bandas no gel de eletroforese (brilho, deformações, arrastes), a razão 260/280 e a razão 260/230 como iguais ou maiores que 1,8 e a concentração acima de 50 ng /  $\mu$ L.

Atingidas as condições descritas, a amostra foi enviada para a empresa *GenOne*<sup>®</sup>, que realizou o sequenciamento através da plataforma *Illumina QTE HiSeq300616*<sup>®</sup>. Para isto, as amostras foram checadas novamente quanto a integridade do DNA e sua concentração pela empresa contratada.

Foram preparadas bibliotecas utilizando o kit de preparo *NEBNext Ultra II DNA Library Prep* for *Illumina*<sup>®</sup>. Estas foram complexadas, multiplexadas e sequenciadas em equipamento *Illumina-HiSeq 4000*<sup>®</sup> utilizando o kit de sequenciamento específico para a plataforma.

Foram realizadas duas rodadas de sequenciamento, com comprimentos de sequências (*reads*) *Paired-End* de 250 nt. Para cada biblioteca, foram gerados 1 GB de sequências. Paralelamente a extração de DNA para sequenciamento, foram realizadas inoculações em triplicata em placas de *Petri* contendo meio sólido LB. Estas placas foram deixadas em estufa por 24 horas, a 37° C e posteriormente analisadas quanto s características da colônia.

#### 4.7.2 - CONTROLE DE QUALIDADE

As sequências foram recebidas por *download* via link e submetidas a análise de qualidade utilizando o software *FASTQC v.0.11.5* (ANDREWS, 2017) em sua configuração padrão. Foram considerados como principais quesitos de análise: *Basic Statistics*, *Per Base Sequence Quality*, *Per Sequence Quality Scores*, *Per Base Sequence Content*, *Per Base Sequence Content*, *Sequence Duplication Levels* e *Overrepresented Sequences*.

#### 4.7.3 - TRIMMING DAS SEQUÊNCIAS

Os adaptadores utilizados no sequenciamento e as sequências com baixa qualidade foram retiradas utilizando o software *Trimmomatic v.0.32* (BOLGER et al., 2014). (EWING et al., 1998; EWING e GREEN, 1998), processo conhecido como “trimagem”, ou “*trimming*”.

Com o mesmo programa foi realizado o corte de trechos de baixa qualidade no início e no final das *reads* e eliminação daquelas menores de 75 pb. *Reads* com baixa qualidade em mais de 30% de sua sequência foram eliminadas por completo.

#### 4.7.4 - MONTAGEM DO GENOMA

A montagem do genoma foi realizada utilizando a capacidade computacional e o apoio técnico no *System Biology and Genomics Lab* da UNESP (Campus do Lageado), na Cidade de Botucatu, em São Paulo, sob a coordenação do Prof. Dr. Guilherme Targino Valente. O auxílio técnico foi oferecido pelo doutorando Ivan R. Wolf.

O *assemble* foi realizado através do agrupamento das *reads* em *contigs* utilizando-se os softwares *MIRA v.4.0.2* (CHEVREUX et al., 2014) e *CAP3* (HUANG e MADAN, 1999), após controle de qualidade.

Inicialmente, as *reads* provenientes das duas bibliotecas geradas pelo sequenciamento, com comprimentos *Paired-End 250* foram submetidas em conjunto ao *MIRA*, como “*assembling denovo*” utilizando configurações “*genome*” e “*accurate*” para junção dos *contigs*, assim como o indicativo de PE “*segment\_placement=---><---*”.

O resultado do agrupamento deste algoritmo foi submetido ao *CAP3* em sua configurações padrão. A análise da quantidade de *contigs* gerada, o comprimento total da sequencia, assim como os valores de  $N_{50}$  foram realizadas com o auxílio do *AbyssFac*, software integrante do *assembler ABySS v.2.0.2* (SIMPSON et al., 2009).

#### **4.7.5 - ANÁLISE DO GENOMA MONTADO**

A análise da porcentagem de GC foi realizada utilizando o algoritmo *Infoseq* do *Emboss* v.6.4.0 (RICE et al., 2017), calculando-se a porcentagem média dos valores de GC de todos os *contigs* através da extração dos valores e tabulação utilizando-se o software estatístico *R* v. 3.2.3 (IHAKA e GENTLEMEN, 1996; GENTLEMEN, 2016).

Os *contigs* foram alinhados contra um genoma de referência para investigação de seu ordenamento e foram reordenados utilizando o software *Mauve* v.2.4.0 (DARLING et al., 2004). O mesmo software foi utilizado para procura de sentenças de blocos de sequências.

#### **4.7.6 - SISTEMÁTICA MOLECULAR PÓS SEQUENCIAMENTO**

Para garantia da determinação da espécie em nível molecular para genômica comparativa e / ou término da montagem do genoma, foram utilizadas três estratégias para sistemática molecular.

##### **4.7.6.1 - ANÁLISE SEGUNDO O BLASTn (MEGABLAST)**

Nesta análise foi realizado um alinhamento utilizando o arquivo de *contigs* contra o banco de dados de bactérias do NCBI denominado *Prokariote Complete Refseq Genomes* utilizando o alinhador *Blastn Megablast* v.2.2.26 (MORGULIS et al., 2008) com as configurações padrão. Esta análise buscou um indicativo de espécie para ser utilizada como genoma de referência, sendo considerados os resultados com os melhores *scores* e que possuísem *e-value* igual a zero.

##### **4.7.6.2 - ANÁLISE SEGUNDO O INFERENCE RNA ALIGNER (INFERNAL)**

Numa segunda tentativa de identificação bacteriana, foi realizada uma análise utilizando software *INFERNAL* v.1.1.2 (NAWROCKI e EDDY, 2013). Nesta abordagem, o arquivo de *contigs* foi alinhado contra um banco de dados de famílias de RNA do RFAM (NAWROCKI et al., 2015).

Após alinhamento e indicativo das regiões formadoras de SSU rRNA, as sequências foram localizadas no genoma utilizando-se o software *Artemis* v.16.0.0 (CARVER et al., 2012) e alinhadas contra o banco de dados geral de sequências do NCBI utilizando o *BLASTn* do pacote *BLAST* v.2.2.28+ (CAMACHO et al., 2008).

#### 4.7.6.3 - ANÁLISE SEGUNDO O KMER-FINDER

Como terceira tentativa de confirmação de espécie, o arquivo contendo os *contigs* foi submetido a *upload* na plataforma de análises online *KmerFinder v.2.0* (HASMAN et al., 2014), utilizando o *scoring method standard* contra o banco de dados de bactérias do NCBI, o que gerou uma tabela de alinhamentos.

#### 4.8 - ANOTAÇÃO DO GENOMA E GENÔMICA FUNCIONAL

Após a formação do *draft*, foi realizada primeiramente uma anotação utilizando o *RAST-Server v.2.0* (AZIZ et al., 2008) através do *upload* do arquivo *.fasta* com os *contigs*. Esta análise durou aproximadamente 24 h, e utilizou como base de dados a *National Microbial Pathogen Data Resource*, quando os resultados foram disponibilizados via *weblink*.

Como segunda abordagem, foi realizada uma anotação em servidor local utilizando-se o *software* de anotação automática *Prokka v.1.12* (SEEMANN, 2014). Este indicou regiões de CDS, RNAs, e nomenclatura enzimática após alinhamento junto ao NCBI.

A terceira anotação foi realizada utilizando o *Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (TATUSOVA et al., 2016; HAFT et al., 2018). As três abordagens foram utilizadas como referência durante a estimativa dos principais genes envolvidos na biorremediação de petróleo, bem como para o processo de “cura manual” da anotação.

Os genes foram identificados através dos arquivos gerados na anotação e comparação artigos científicos e pesquisa / alinhamento das sequências utilizando o *Kegg Databank* (KANEHISA e GOTO, 2000; KANEHISA et al., 2016; KANEHISA et al., 2017). Este site é uma das principais referências na reconstrução de vias metabólicas e possui uma ferramenta automática para tal, o *Kegg Automatic Annotation Server (KAAS)*, utilizando em sua versão 2.1 (MORIYA et al., 2007)

#### 4.9 - GENÔMICA COMPARATIVA

As análises de genômica comparativa foram realizadas utilizando-se o algoritmo *BLASTn* para alinhamento de sequências com genomas selecionados e o *GCView* (STOTHARD e WISHART, 2005) para produção dos gráficos em anéis, ambos em conjunto no software *BRIG* (ALIKHAN et al., 2011), em sua configuração padrão, com *threshold* superior de 90% e inferior de

70%, respectivamente, além do algoritmo *Mauve*, anteriormente citado.

Foram utilizadas cinco sequências de genomas completos de *Burkholderia gladioli* depositadas publicamente no NCBI para comparação de identidade, sendo elas *Burkholderia gladioli* ATCC10248, *Burkholderia gladioli* KACC11889, *Burkholderia gladioli* BSR3, *Burkholderia gladioli* FDAARGOS188 e *Burkholderia gladioli* FDAARGOS349. As comparações enfocaram a semelhança entre os genomas e a capacidade enzimática para biorremediação de óleo.

Em virtude da dificuldade em se encontrar genomas de espécies biorremediadoras comerciais depositados publicamente, foram utilizadas para comparação linhagens não comerciais, cujo principal critério para seleção foi a lista definida por Xu et al. (2018). Preferiu-se os genomas de linhagens previamente referidas em artigos sobre biorremediação de petróleo e / ou aqueles determinados como referência pelo NCBI. A análise visou principalmente estimativas da capacidade metabólica da linhagem de estudo em relação aquelas referenciadas.

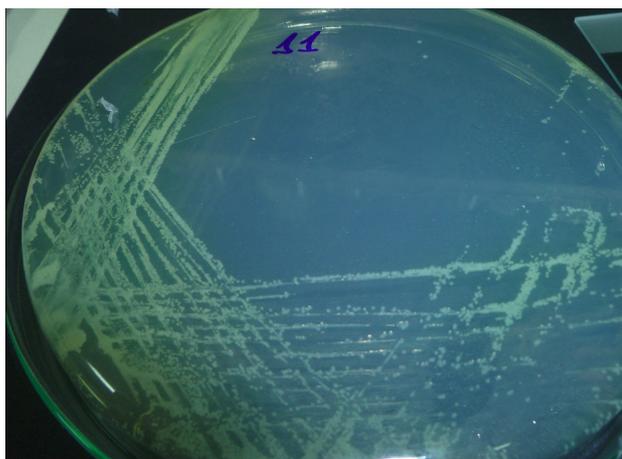
## ***RESULTADOS E DISCUSSÃO***



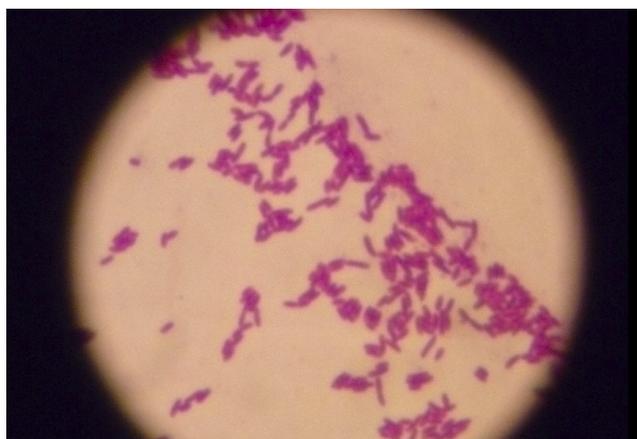
## 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 - Análises não moleculares: Morfologia e Gram

A linhagem é um cocobacilo Gram Negativo, não foram observadas estruturas semelhantes a esporos nas lâminas utilizadas para coloração, o que sugere que a mesma não os forma. As colônias são arredondadas, facilmente isoláveis por esgotamento de alça, possuem coloração amarelada quando em meio tipo PCA (*Plate Count Agar*), margens inteiras, são opacas, lisas e convexas (Figuras 9 e 10 ).



**Figura 9** – Foto das colônias de *Burkholderia gladioli* Coa14 crescidas em meio de cultivo PCA.



**Figura 10** – Fotomicrografia das células de *Burkholderia gladioli* Coa14 (1000x).

Esta espécie já pertenceu ao gênero *Pseudomonas*, mas foi retirada, juntamente com outras do mesmo grupo quando Yabuuchi et al. (1992) propuseram a criação de um novo táxon graças ao desenvolvimento da sistemática utilizando: a região 16S do rRNA, comparações com alinhamento

de DNA e composição bioquímica. A proposta seria de que este gênero deveria substituir o grupo II de *Pseudomonas*.

Mahenthiralingam et al. (2005) caracterizaram os genomas deste grupo como possuidores de grandes cromossomos organizados em *multi-replicons*, variando entre 6 Mb e 9 Mb de tamanho, considerando cromossomos e plasmídios. Os últimos ocorrem isoladamente ou em grupos de até quatro genomas extranucleares diferentes (COENYE e VANDAMME, 2007).

O gênero é caracterizado por bactérias Gram Negativas, móveis (em sua maioria) e capazes de complexas interações com o meio ambiente. A espécie *Burkholderia gladioli*, antigamente denominada *Pseudomonas gladioli*, faz parte de um grupo de espécies denominado complexo *Burkholderia cepacea* (PERIN et al., 2006).

É reconhecida por possuir um grande repertório de utilização em biotecnologia, apesar de ser um conhecido patógeno de plantas (KEITH, 2005; URA et al., 2006; NANDAKUMAR e RUSH, 2007; NANDAKUMAR et al., 2009) e comportar-se como patógeno oportunista em humanos (QUON et al., 2011).

## **5.2 – BIOSSEGURANÇA: TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS**

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos dos testes com discos de antibióticos para bactérias Gram Negativas. A resistência aos fármacos é representada pela letra *R* e a sensibilidade pela letra *S*. A cepa estudada resistiu a ceftazidima, cefoxitina e a cefalotina.

O isolamento desta colônia da água de um lago no coração da Amazônia torna a hipótese de contato prévio com estas substâncias pouco provável, ainda que esgoto proveniente da cidade de Coari seja despejado no mesmo e, provavelmente, resíduos hospitalares. Assim, a principal hipótese para o crescimento, sob estes fármacos na placa, é a de resistência obtida randomicamente (PRAY, 2008).

A segunda possibilidade seria a aquisição de genes de resistência horizontalmente de cepas que já entraram em contato com os antibióticos, hipótese muito utilizada na tentativa de explicar o surgimento de bactérias resistentes em condições hospitalares (DAVIES e DAVIES, 2010), mas parece não fazer sentido em relação a grandes lagos amazônicos.

**Tabela 1** – Resultado do antibiograma para bactérias Gram Negativas: suscetível (S), resistente (R).

<b>Antibiótico</b>	<b>Resistência/ Sensibilidade</b>
Ampicilina	S
Amicacina	S
Amoxicilina + Clavulanato	S
<i>Ceftazidima</i>	R
Cefepime	S
<i>Cefoxitina</i>	R
Cefuroxima	S
Ciprofloxacina	S
Gentamicina	S
Meropenem	S
<i>Cefalotina</i>	R
Sulfazodrim	S

Considerando o antibiograma realizado, esta resistência está direcionada ao grupo das cefalosporinas, que podem ser utilizadas para o tratamento de infecções das vias respiratórias (PERERA et al., 2001), o que pode estar relacionado com relatos na literatura, envolvendo desenvolvimento de infecções em pacientes com fibrose cística.

Ainda assim, Kennedy et al. 2007 pesquisaram 33 pacientes com esta doença, grupo que envolvia transplantados, e encontraram infecções crônicas em 18 deles. Os isolados, neste caso, possuíam resistência justamente as cefalosporinas de terceira geração. Estes pacientes responderam bem ao tratamento com antibióticos anti-pseudomônicos.

O primeiro relato de infecções em humanos envolvendo pneumonia e septicemia causadas pela *Burkholderia gladioli* foi feito por Ross et al. (1995) em pacientes com doença granulomatosa crônica, mas estas infecções foram controladas com sucesso utilizando antibioticoterapia.

Em virtude da não ocorrência de relatos de infecções por esta bactéria em pessoas sem doenças prévias faz com que este microrganismo não seja incluído em listas de patógenos importantes, ao contrário da *Burkholderia mallei*, da *Burkholderia pseudomallei* e da *Burkholderia cepacia* (HSE, 2013).

É comum que pesquisadores na área de biorremediação de petróleo investiguem a resistência aos antibióticos por suas colônias antes que as mesmas sejam incluídas em programas de desenvolvimento de produtos. O objetivo é o não surgimento de problemas de saúde pública e nem ao meio ambiente, no momento em que sejam utilizadas (TIKU et al., 2016).

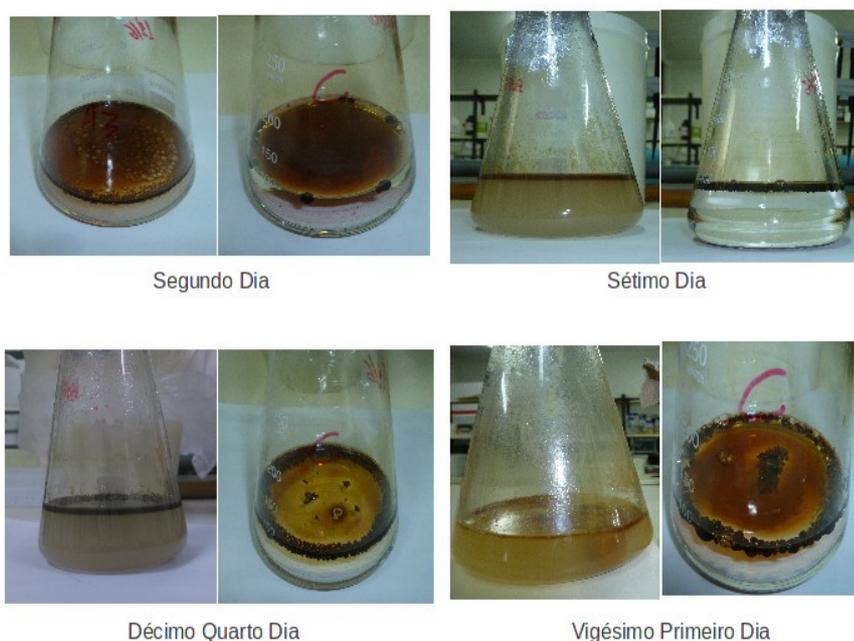
Devido a suscetibilidade da colônia a diversos antibióticos disponíveis no mercado,

inclusive de segunda geração, e a ausência de relatos na literatura envolvendo infecções em indivíduos saudáveis, a linhagem foi considerada adequada ao trabalho em laboratório de Risco Biológico Classe I, do qual dispomos.

Além de questões de saúde pública, pode existir uma relação positiva entre a presença de genes de resistência aos antibióticos e a capacidade para biorremediação de xenobióticos, pois grupos de genes para ambos costumam ser transportados em conjunto por elementos genéticos móveis, como os plasmídios (GODHEJA et al., 2014).

### 5.3 - EXPERIMENTO DE BIODEGRADAÇÃO

O experimento de biodegradação teve a duração de 21 dias, quando o conjunto meio mineral mínimo (*Bushnell-Hass*), mais petróleo a 5% e inóculo bacteriano foram deixados em agitador *shaker* a 37° C e 150 rpm. Os resultados visuais de transformação do óleo, assim como os controles negativos, são mostrados na Figura 11. Não foram observados crescimento de bactérias nos frascos controle ao longo de todo o experimento.

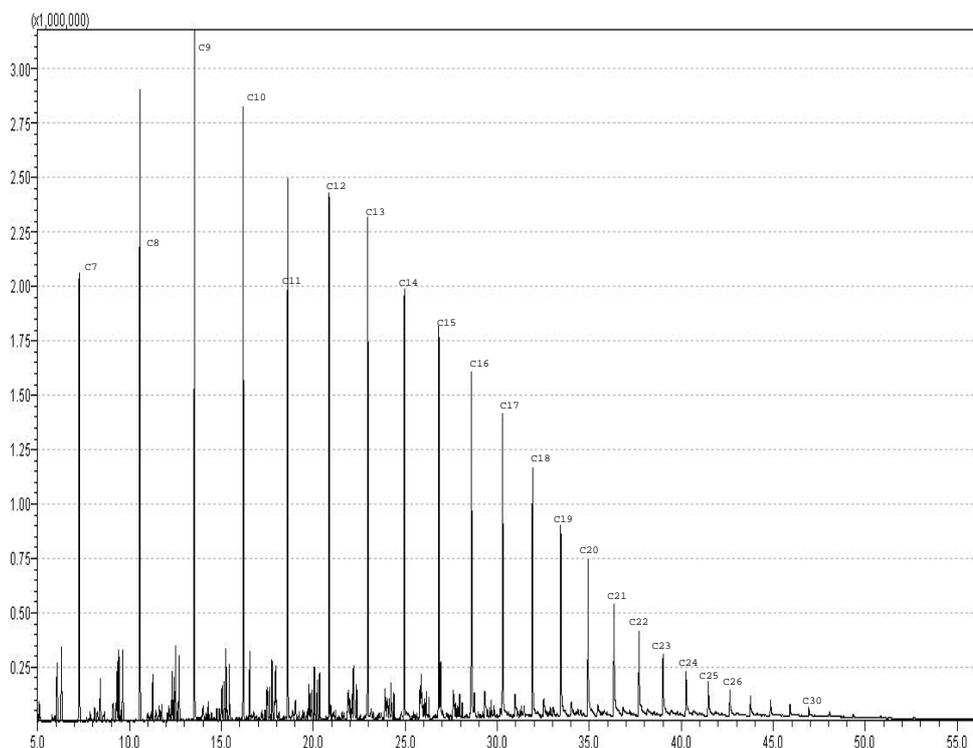


**Figura 11** – Experimento de biodegradação com óleo bruto de Urucu 2, 7, 14 e 21 dias. Em cada par de fotos, o meio com inóculo se encontra a esquerda e o controle (sem inóculo) à direita.

Estas imagens mostram modificações no óleo, atribuíveis a presença da bactéria, uma vez que o mesmo manteve-se indiferenciado, ao longo dos dias, nos frascos de controle sem inoculação. O aumento da turbidez do meio ao longo do tempo evidencia a multiplicação celular. As placas

inoculadas, em condições estéreis, com o petróleo de Urucu, não produziram colônias em 24 e 48 horas em estufa a 37° C.

A Figura 12 mostra o cromatograma da análise do petróleo no tempo zero, quando o óleo foi colocado a 5%, em contato com o meio mineral mínimo, com inóculo bacteriano a uma O.D. de 1,0 a 600 nm. Em virtude da extração feita logo em seguida ao preparo, esta figura representa uma caracterização do petróleo utilizado, obtido de Urucu.



**Figura 12** – Cromatograma do óleo bruto extraído a partir do experimento de biodegradação com inóculo bacteriano, no tempo zero. O eixo x representa o tempo de retenção (em minutos) e o eixo y representa a medida de intensidade do analito. Os números indicam a quantidade de átomos de carbono.

Este cromatograma mostra grandes picos mais a esquerda da figura, o que representa os n-alcenos lineares de cadeia mais curta, porém, mais abundantes. Deslocando-se para a direita, o gráfico mostra os n-alcenos lineares de cadeia mais longa, porém, menos abundantes, os picos intermediários representam n-alcenos de cadeia ramificada.

O primeiro pico representa o heptano (C7), adicionando-se mais um átomo de carbono a cada pico (excluindo-se os picos intermediários), chega-se em n-alcenos com 30 átomos de carbono, praticamente sem representatividade no gráfico.

Classificado como petróleo leve (alto grau API), o óleo de Urucu possui baixa densidade, viscosidade e massa específica. Isto ocorre porque é comum a existência das frações leves do petróleo (KURTZ e HEADINGTON, 1937). Óleos leves costumam possuir compostos em maior

quantidade, variando no número de átomos de carbonos entre 4 e 14, que são os constituintes principais da gasolina (YIN e XIA, 2001) e do óleo diesel (DATE, 2011).

Apesar deste óleo ser relativamente solúvel em termos gerais, ainda possui componentes de cadeia longa, como pode ser observado no cromatograma, quando se visualiza a partir do tempo de retenção de 25 minutos (Figura 12). Embora em menos quantidade em relação aos n-alcenos de cadeias maiores, estes podem tornar-se problemas ambientais, caso ocorram derramamentos em quantidades compatíveis aos que se costuma observar durante o transporte de óleo para refinarias, da ordem de centenas de milhares de litros.

Peixes que entraram em contato, experimentalmente, com frações referentes ao diesel, desenvolveram um aumento na taxa de micronúcleos, que são alterações nucleares relacionadas presença de quebras no material genético, em relação aos grupos controle, compostos por animais não expostos (VANZELLA et al., 2007).

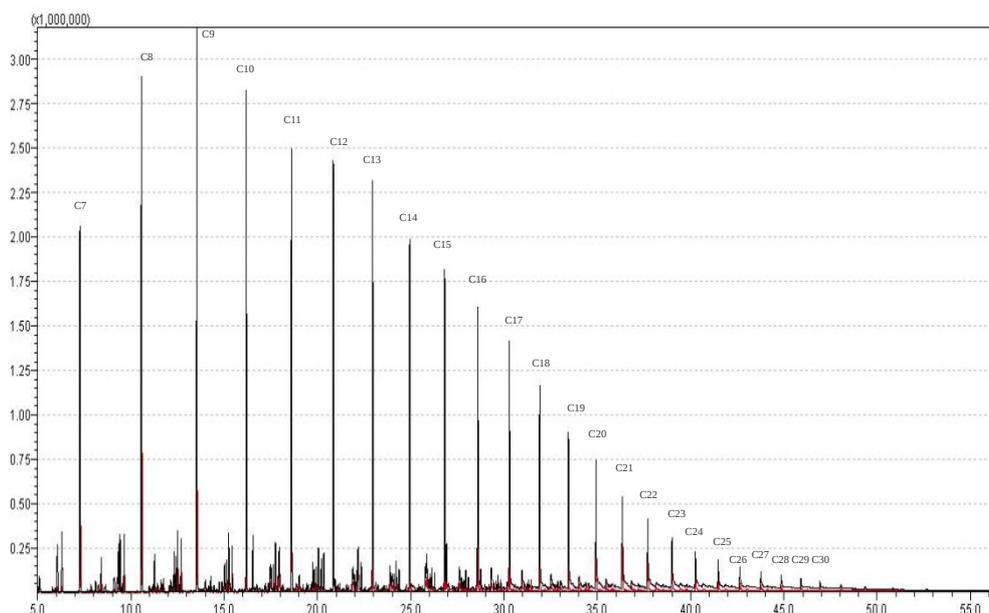
Suleiman (1987) foi um dos primeiros a relacionar danos celulares com a presença de n-alcenos  $C_4$  a  $C_{10}$  em coelhos e ratos. Estes danos estavam relacionados ao rompimento da célula, observado através da liberação de enzimas lisossômicas e queda no nível de respiração celular, além da queda na peroxidação lipídica.

Mais recentemente, Doumenq et al. (2001) descobriram que n-alcenos de cadeia longa são incorporados por bactérias, erroneamente, como lipídios de membrana, devido ao seu caráter hidrofóbico. Desta forma, estes compostos são também incorporados aos sedimentos, o que constitui uma importante via de ingresso na cadeia trófica.

Bactérias geralmente degradam bem n-alcenos de cadeia mais curta (até 24 átomos de C), possuem dificuldade em degradar n-alcenos de cadeia mais longa e realizam uma degradação lenta dos alcenos de cadeia ramificada, encontrando dificuldade na degradação de n-alcenos cíclicos, como os PAHs (LAWS, 2000).

Considerando que os n-alcenos de cadeia ramificada possuem características semelhantes aos n-alcenos de cadeia linear quanto a capacidade de produzir toxicidade, é interessante que se considere a capacidade desta colônia em lidar com tais compostos.

A figura 13 mostra a sobreposição em software do cromatograma de tempo 0 (Figura 12), e o cromatograma resultante da amostra com inóculo, após 21 dias de crescimento bacteriano.



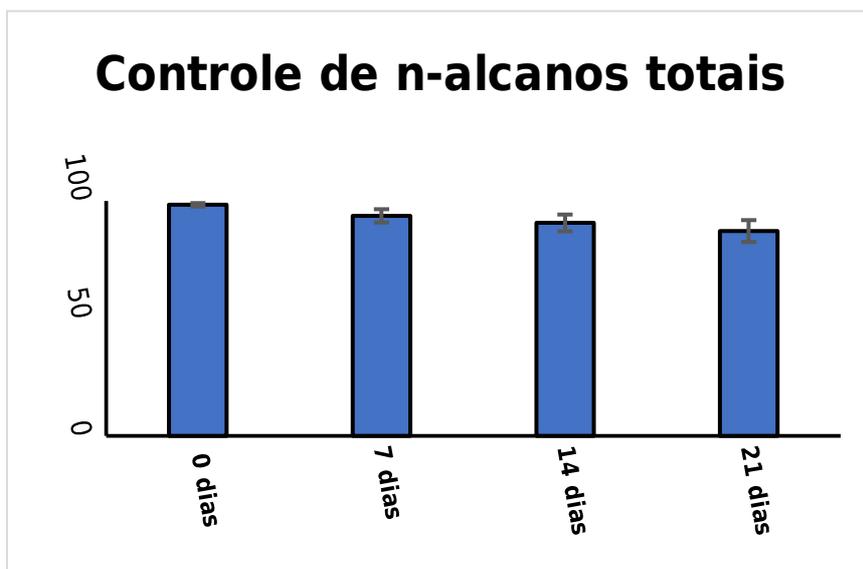
**Figura 13** – Sobreposição dos cromatogramas no tempo 0 e após 21 dias de exposição (em vermelho) à linhagem de *Burkholderia*. O eixo x representa o tempo de retenção (em minutos) e o eixo y representa a medida de intensidade do analito. Os números indicam a quantidade de átomos de carbono.

Em preto encontram-se os picos referentes ao tratamento zero dias e em vermelho encontram-se os picos referentes ao final de 21 dias de exposição. Durante um experimento de biodegradação, podem ocorrer fatores que diminuem os picos e que não sejam necessariamente devido a atividade da cultura, como a evaporação e / ou perdas durante o processo de inoculação ou recuperação do petróleo após o cultivo.

Não foi possível a análise de todos os componentes presentes no cromatograma, pois uma parte deles compõe uma fração não identificável pela tecnologia presente, no momento da experimentação, chamada de *cluster* (REDDY et al., 1999). Assim, optou-se pelo cálculo de n-alcenos totais, utilizando a média do somatório das áreas, apenas para os picos identificados pelo equipamento.

A barra “0 dias” da Figura 14 mostra os resultados do teste de recuperação, a partir dela podemos estimar as perdas durante a manipulação da amostra (0 dias) e pela manipulação mais evaporação (7, 14 e 21 dias). O valor recuperado considerando a média da injeção em triplicata de petróleo puro diluído em hexano, menos a média das triplicatas de  $C_0$ , foi de  $98,31 \pm 0,74\%$ , o que resulta em uma perda de aproximadamente 1,69% da amostra, durante a manipulação.

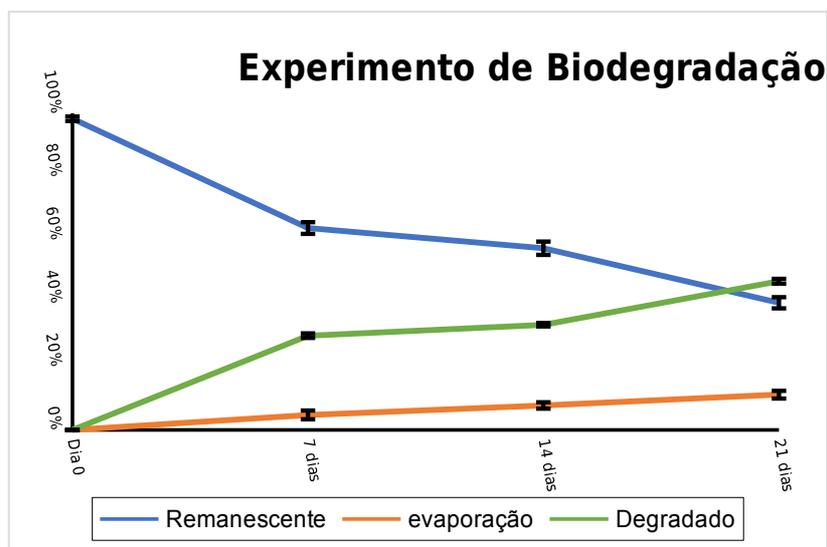
Aos 7 dias houve, em média, um valor recuperado de  $93,59 \pm 2,83\%$ , aos 14 dias  $90,62 \pm 3,51\%$  e aos 21 dias  $87,15 \pm 4,68\%$ . Estes valores representam a perda por manipulação e por evaporação.



**Figura 14** – Recuperação do óleo bruto nos experimentos controle (barras azuis) de  $C_0$  a  $C_3$ . O eixo x representa o tempo em dias e o eixo y representa o valor em porcentagem. As barras em preto simbolizam os valores de desvio padrão.

As perdas por manipulação ocorrem pela aderência do óleo nas paredes dos frascos, mesmo de vidro, durante transferências para centrifugação, por exemplo. Também ocorre durante sua versão em diferentes vidrarias, como funis de vidro, por exemplo. As repetidas lavagens dos frascos com hexano, durante o processo de extração, evitou ao máximo este tipo de perda.

Considerando a atuação da bactéria junto ao Petróleo de Urucu, houve uma diminuição de  $29,78 \pm 0,14\%$  dos n-alcenos em 7 dias,  $33,22 \pm 0,01\%$  aos 14 dias e  $46,98 \pm 0,01\%$  ao término do experimento, 21 dias após seu início. Estes valores representam a ação da bactéria ao longo do tempo (Figura 15).



**Figura 15** – Resultados em porcentagem da atuação bacteriana (linha verde), da perda por manipulação (dia 0) mais evaporação (7, 14 e 21 dias) (linha alaranjada) e do petróleo remanescente (linha azul). O eixo x mostra o tempo em dias e o eixo y mostra a porcentagem.

Por muito tempo imaginou-se que todos os compostos orgânicos poderiam ser degradados, uma vez que foram produzidos por seres vivos. Após a descoberta dos organoclorados, substâncias resistentes a degradação, passou-se a adotar o termo “recalcitrante” para aquelas que permanecem por longos períodos de tempo nos ambientes (LIMA, 2004).

Os n-alcenos são bem utilizados por diferentes bactérias como fonte de carbono, desde que estejam disponíveis em condições que não ofereçam dificuldades para a sobrevivência das células, ao contrário do que ocorre com ambientes contaminados com petróleo. Os principais fatores que influenciam a degradabilidade do petróleo após derramamento são: sua composição, seu estado físico, as mudanças químicas na água, temperatura, disponibilidade de oxigênio e nutrientes, salinidade da água e a sua ecologia (LEAHY e COLWELL, 1990). No quesito disponibilidade, considera-se o tamanho da cadeia carbônica de um composto.

A capacidade metabólica dos organismos residentes no local do derrame também é importante. Isto é perceptível no trabalho do Cardenes (2014), que computou  $3,0 \times 10^2$  UFC logo após a coleta de água para o isolamento de bactérias no lago de Coari e  $3,6 \times 10^8$  UFC, após 68 dias de cultivo, mas com apenas 2 morfotipos diferentes.

Uma das possibilidades, é que estas colônias sejam capazes de resistir a concentrações maiores de metais pesados encontradas nas amostras de petróleo (FREIJE, 2015), além da capacidade de metabolização dos hidrocarbonetos propriamente dita (MÁTHÉ, 2012).

Santis et al. (2015) obtiveram taxas de degradação de frações individuais de n-alcenos que

variaram entre 42 e 95%, considerando o número de carbonos entre C12 e C30. Entretanto, o experimento contou com a adição de nitrogênio no meio de cultura, na forma de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , o que consensualmente aumenta a taxa de biodegradação, e não foi realizada neste trabalho.

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura são menos conservadores do que este e se utilizam de meios enriquecidos. Esta é, sem dúvida, uma estratégia interessante e muito utilizada na biorremediação, mas não foi utilizada neste trabalho, que considerou as principais tecnologias existentes como capazes de recuperar 95% do óleo derramado (AMSA, 2017; MIJUS e JONKER, 2009).

As densidades ópticas médias a 600 nm foram 1,0 (dia zero), 1,3 (sete dias), 1,9 (14 dias) e 2,2 (21 dias). A colônia apresentou maior crescimento nos tempos de sete aos quatorze dias, mas não manteve o mesmo padrão entre os quatorze e os vinte e um dias. Os valores de absorvância nos experimentos controle mantiveram-se em zero ao longo de todo o experimento.

Alguns autores relacionam o crescimento bacteriano com as taxas remanescentes de óleo presentes em sítios de contaminação, considerando esta medida tão importante, quanto a cinética de degradação propriamente dita. Trata-se de uma tentativa de estabelecimento de um modelo para previsões de degradabilidade, em locais de composição semelhantes (ZAVAREH et al., 2016).

Farag e Soliman (2011) mediram o crescimento bacteriano, relacionaram com a porcentagem de óleo e utilizaram estas medidas para estimar a eficiência de degradação para naftaleno e fenol. Este trabalho mostrou que a taxa de crescimento caía quando compostos preferenciais eram degradados.

## **5.4 – GENÔMICA**

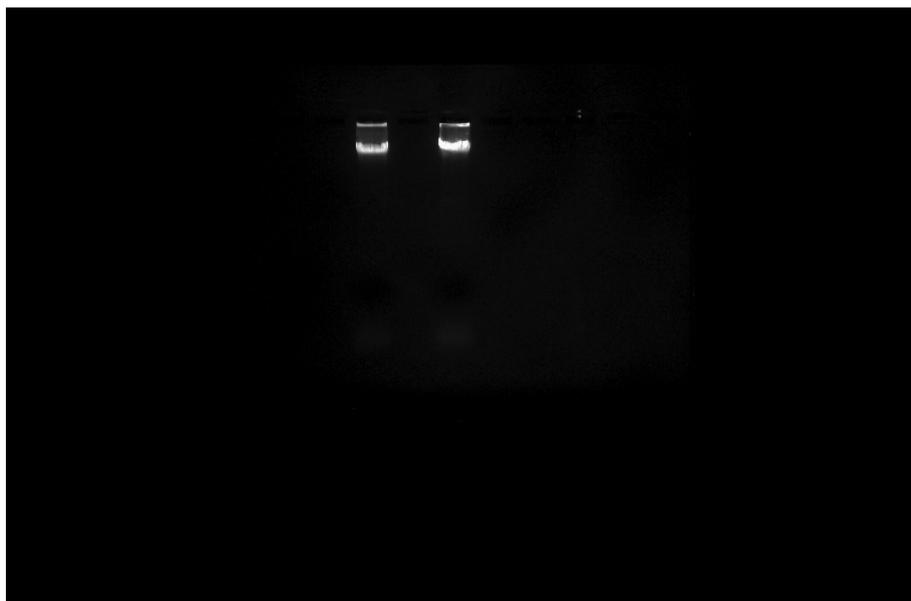
Como um dos principais enfoques deste trabalho foi realizar a primeira abordagem molecular de uma bactéria, isolada no lago de Coari, e relacionada a biorremediação de petróleo, seguiram-se experimentos que culminassem na investigação direta de atributos relacionados a degradabilidade do óleo e que pudessem ser investigados junto ao DNA desta bactéria. Para tanto, foi realizado o sequenciamento e a anotação do genoma, assim como novas investigações relacionadas a identificação da espécie.

### **5.4.1 - EXTRAÇÃO E QUALIDADE DO DNA**

A Figura 16 mostra o perfil de eletroforese em agarose (0,8%), de uma duplicata de amostras do isolado. Antes de enviada para sequenciamento, uma amostra deve cumprir alguns pré requisitos

em relação a quantidade de DNA presente e seu possíveis contaminantes, como resíduos de RNA, artefatos de técnica, além de sua concentração.

A amostra enviada para sequenciamento continha aproximadamente 100 ng de DNA, com a razão de 260/280 de 1,92 e a razão de 260/230 de 2,61. Estas condições estavam em concordância com os pré-requisitos de amostras a serem sequenciadas, pela empresa contratada, para a realização do sequenciamento.



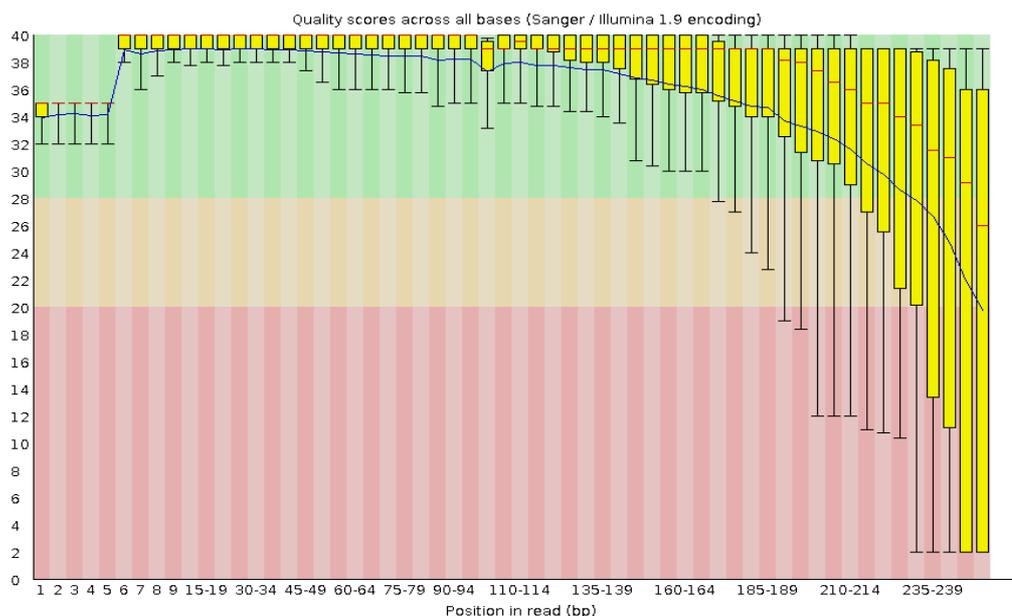
**Figura 16** – Imagem de um gel de agarose à 0,8% mostrando bandas para duas amostras enviadas para sequenciamento mostrando ausência de degradação, de proteínas e de RNA.

## 5.4.2 - SEQUENCIAMENTO E MONTAGEM DO GENOMA

A primeira etapa de sequenciamento gerou 1 Gb de dados PE250, divididos em dois arquivos de aproximadamente 500 Mb, com 5.325.194 *reads*. Após tentativa de montagem e acentuada presença de *contigs*, optou-se pelo sequenciamento de mais 1 Gb de dados em PE250.

Foram gerados mais dois arquivos de aproximadamente 500 Mb cada, contendo 5.529.978 *reads*. Cada arquivo foi inspecionado quanto a qualidade utilizando o software *FastQC*. A análise revelou grande número de *reads* duplicadas, adaptadores resultantes do sequenciamento e *reads* de baixa qualidade (Figura 17).

Ao todo 10.855.172 sequencias foram submetidas ao tratamento inicial como *Trimmomatic*, ajustado para preservar mesmo aquelas *reads* que perderam suas correspondentes por eliminação completa, devido a qualidade inferior a 33 em mais de 30% da extensão.

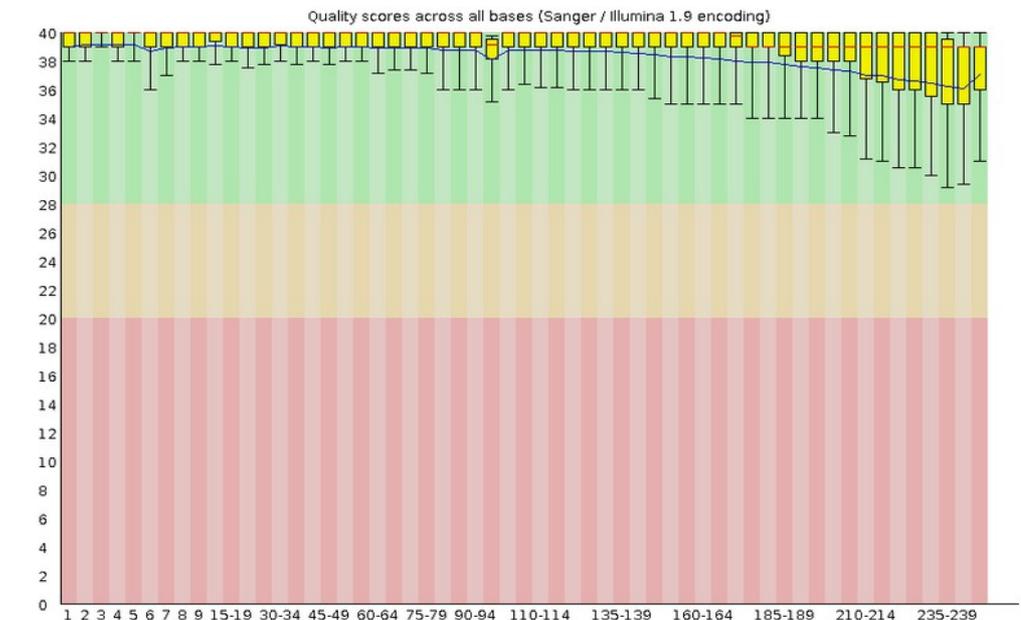


**Figura 17** – Gráfico de qualidade das sequências geradas obtido pelo software *FastQC*. O eixo x representa o valor de comprimento da sequência, o eixo y representa o valor de qualidade. As barras amarelas representam a qualidade atingida em relação ao comprimento das *reads* analisadas.

Restaram do total 10.645.826 *reads* do tipo *paired* e 97971 *reads unpaired*, todas utilizadas durante o *assembling*. Sequências *leadings* e *trailers* de baixa qualidade foram removidas e o resultado do tratamento pode ser observado na Figura 18.

O tratamento das sequências com *Trimmomatic* gera um padrão, identificado visualmente quando as barras de coloração amarela passam a se localizar em regiões superiores dos valores do eixo y no gráfico. Isto não corre necessariamente com as sequências *unpaireds* que são uma espécie de reaproveitamento.

Estas *reads* não são geradas nas configurações padrão do programa, mas podem ser de grande valia quando se utilizam *assemblers* programados a trabalharem com tais “resíduos”, pós correção.



**Figura 18** – Exemplo qualidade das sequências geradas. O eixo x representa o valor de comprimento da sequência, o eixo y representa o valor de qualidade.

Em média, 5% das extremidades a partir da posição aproximada do nucleotídeo 185 em direção ao último nucleotídeo, de cada sequência, foram identificadas como sendo de adaptadores advindos do processo de sequenciamento. Este valor foi reduzido para menos de 0,5%, após o tratamento das sequências.

Este resultado repercutiu na diminuição da quantidade de sequências duplicadas, uma vez que o adaptador se repetia. Negligências na retirada destas regiões poderiam gerar equívocos na produção das bibliotecas de *k-mers*, pelos softwares de *assembling*, que poderiam confundir as sequências de adaptadores com *overlappings*.

A eliminação de *reads* com comprimento menor do que 75 pb foi ajustada no *Timmomatic* de acordo com a experiência da equipe envolvida no auxílio do tratamento, na montagem e na anotação inicial do genoma.

O *assembler* MIRA reduziu as aproximadamente 10 milhões de *reads*, sequenciadas em 46 *contigs* com  $N_{50}$  de 534161 bp. Uma nova montagem com os *contigs* submetidos ao algoritmo *CAP3* reduziu-os para 27, com  $N_{50}$  de 574923 bp de acordo com a avaliação realizada pelo algoritmo *Abyssfac*.

A soma das sequências dos *contigs* resultou em um valor de comprimento de 8,4 Mb (8.460.408 nt), com o comprimento médio de *contigs* de 313.349 bp, e a razão de GC igual a 68,04 . A taxa de cobertura, considerando o número de *reads* e seu comprimento, foi de aproximadamente 150 vezes para cada biblioteca *PE*.

Os genomas bacterianos possuem uma ampla variedade de comprimento, desde 500 kb até aproximadamente 12 Mb. A maioria situa-se entre 2 e 6 Mb, aproximadamente. Tanto o tamanho dos genomas quanto a quantidade de GC em cada um deles, aumenta em virtude da complexidade do ambiente (LAND et al., 2015).

O taxa de GC nos organismos pode variar entre 17 e 75% e está diretamente ligada a presença de genes, aumentando proporcionalmente a medida em que aumenta a quantidade de genes por área de DNA (genoma). Este tipo de variação pode ser analisada como um todo ou intragenicamente, refletindo em variações sutis que envolvam melhorias evolutivas dentro de um mesmo gênero (BROCCHIERI, 2014).

Em virtude da utilização de muitos programas para a execução de diferentes análises e das diferentes padronizações, o mesmo arquivo de *contigs*, daqui em diante, ora é nomeado 23-cap3.fa, ora AML.fa nas figuras. Esta montagem resultou na publicação de um artigo sobre a primeira linhagem bacteriana com genoma sequenciado, relacionada a biorremediação de petróleo do Lago de Coari: “Draft Genome Sequence of *Burkholderia gladioli* Coa14, a Bacterium with Petroleum Bioremediation Potential Isolated from Coari Lake, Amazonas, Brazil” (Anexo 2). O indicativo da linhagem, Coa14, é uma homenagem a cidade e ao Lago de Coari, juntamente com o indicativo do ano de coleta. Esta nomenclatura foi atribuída para a linhagem, por exigência do banco de dados do NCBI durante o depósito da sequência.

## **5.5 - SISTEMÁTICA MOLECULAR**

### **5.5.1 - ANÁLISE SEGUNDO O INFERENCE RNA ALIGNER (INFERNAL)**

Na Figura 19 pode-se ver um exemplo da saída de dados do algoritmo *INFERNAL*, indicando três sequências SSU de RNA encontradas pelo programa, assim como suas posições nos arquivos de *contigs*. Um dos resultados do *BLASTn*, após a localização de uma destas sequências nos *contigs*, está ilustrado na figura 20.



indicadas pelo *INFERNAL* como SSU-RNA e isoladas utilizando o *ARTEMIS*. Uma vez que a análise foi realizada contra um banco de dados de sequências de RNA codificante, as regiões utilizadas no alinhamento contém traços de sequências conservadas (GRIFFITHS-JONES et al., 2003), neste caso, apenas regiões formadoras de SSUs bacterianas.

Um dos objetivos principais do *INFERNAL* é reunir informações sobre RNAs não codificantes, de diferentes espécies, através do alinhamento de sequências covariantes de interesse, para posterior cura destas sequências e abastecimento de bancos de dados com este fim, pela comunidade científica, como o *RFAM* (DAUB et al., 2008).

Ele é utilizado para alinhar estas sequências contra arquivos de genomas completos ou *drafts* e identificá-las (GRIFFITHS-JONES et al., 2005; SRIDHAR e GUNASEKARAN, 2013).

## 5.5.2 – ANÁLISE SEGUNDO KMERFINDER

A Figura 21 é uma imagem resultante da análise utilizando *Kmerfinder*, que gera um banco de dados de *k-mers* a partir de um arquivo .fasta e em seguida o compara utilizando o banco de dados de *k-mers* do *NCBI*. O resultado disponibilizado inclui as espécies que possuem os melhores *matches*, calculados pelo próprio algoritmo.

Hit	Score	z-score	Query Coverage [%]	Template Coverage [%]	Depth	Total Query Coverage [%]	Total Template Coverage [%]	Total Depth
Burkholderia gladioli, Burkholderia gladioli BSR3 <a href="#">get sequence</a>	5187	605.2	62.85	67.64	0.67	62.85	67.64	0.67
Sorangium cellulosum, Sorangium cellulosum So0157-2 <a href="#">get sequence</a>	102	10.2	1.24	0.65	0.01	4.01	2.10	0.02
Burkholderia lata <a href="#">get sequence</a>	87	12.6	1.05	0.78	0.01	6.56	4.82	0.05
Streptosporangium roseum, Streptosporangium	74	7.8	0.90	0.49	0.00	3.64	1.99	0.02

**Figura 21** – Saída de dados do *KmerFinder* mostrando os valores como *score* e *coverage*.

Um *k-mer* é uma sequência de nucleotídeos de comprimento *n* produzida de um arquivo de sequências, em nucleotídeos. Estas sequencias podem ser originadas de um arquivo de qualidade ou de um arquivo .fasta, obtido de um sequenciamento de genoma, um RNA-seq ou de uma sequencia de *contigs*. Programas relacionados com a análise de DNA podem se utilizar destas sequências para agrupamento de dados e / ou sistemática, como é o caso do *KmerFinder*.

Observa-se a distância entre os valores de comparação entre a primeira e a segunda colônia

indicadas. O *KmerFinder* é um algoritmo preditor de espécies bacterianas que se utiliza de um banco de dados de *k-mers* construído a partir da extração, via software, de sequências de 16 nucleotídeos de genomas bacterianos depositados no NCBI. Este *databank* é atualizado mensalmente e atribui sequências destas “frases” que sejam únicos para diferentes espécies (LARSEN et al., 2014).

De todas as tentativas utilizadas *in silico* para inferir qual a real bactéria com a qual estávamos trabalhando, foi a primeira vez que houve um indicativo em nível de espécie e, em seguida, da linhagem. Daqui em diante, a espécie definida como candidata para ser utilizada como genoma de referência passou a ser *Burkholderia gladioli* BSR3.

### 5.5.3 – ANÁLISE SEGUNDO O BLASTN (MEGABLAST)

A Figura 22 mostra os alinhamentos do arquivo com todos os *contigs* utilizando o *BLASTn* (*MEGABLAST*) contra o banco de dados total de genomas bacterianos do NCBI.

Sequences producing significant alignments:			Score (Bits)	E Value
NZ_CP009323.1	<i>Burkholderia gladioli</i> strain ATCC 10248 chromoso...	1.605e+05	0.0	
NZ_CP022213.1	<i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> strain FDAARG...	1.605e+05	0.0	
NZ_CP022005.1	<i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> strain KACC 1...	1.605e+05	0.0	
NC_015376.1	<i>Burkholderia gladioli</i> BSR3 chromosome 2, complete ...	1.459e+05	0.0	
NZ_CP033431.1	<i>Burkholderia gladioli</i> strain Co14 chromosome 2, ...	1.442e+05	0.0	
NZ_CP033430.1	<i>Burkholderia gladioli</i> strain Co14 chromosome 1, ...	1.360e+05	0.0	
NZ_CP009322.1	<i>Burkholderia gladioli</i> strain ATCC 10248 chromoso...	1.202e+05	0.0	
NZ_CP022210.1	<i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> strain FDAARG...	1.202e+05	0.0	
NZ_CP022006.1	<i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> strain KACC 1...	1.202e+05	0.0	
NZ_CP023523.1	<i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> strain FDAARG...	1.041e+05	0.0	
NC_015381.1	<i>Burkholderia gladioli</i> BSR3 chromosome 1, complete ...	96290	0.0	
NZ_CP023522.1	<i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> strain FDAARG...	91895	0.0	
NZ_CP034547.1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> strain YG-3 chromosome ...	17655	0.0	
CP034547.1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> strain YG-3 chromosome 3, ...	17655	0.0	
NZ_CP022084.2	<i>Burkholderia cepacia</i> strain FDAARG05_345 chromos...	16742	0.0	
NZ_CP023521.1	<i>Burkholderia cepacia</i> strain FDAARG05_388 chromos...	16742	0.0	
NZ_CP007748.1	<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416 chromosome 2, co...	16742	0.0	
NZ_CP012982.1	<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416 chromosome 2, co...	16742	0.0	
NZ_CP029825.1	<i>Burkholderia</i> sp. JP2-270 chromosome 2, complete ...	15897	0.0	
NZ_CP013376.1	<i>Burkholderia cepacia</i> strain INT3-BP177 chromosom...	15684	0.0	
NZ_CP002581.1	<i>Burkholderia plantarii</i> strain PG1 chromosome 2, ...	10770	0.0	
NZ_CP007213.1	<i>Burkholderia plantarii</i> strain ATCC 43733 chromos...	10704	0.0	
NZ_CP013400.1	<i>Burkholderia seminalis</i> strain FL-5-4-10-S1-D7 ch...	10525	0.0	
NZ_CP009434.1	<i>Burkholderia glumae</i> LMG 2196 = ATCC 33617 chromo...	10394	0.0	
NC_012721.2	<i>Burkholderia glumae</i> BGR1 chromosome 2, complete se...	10394	0.0	

Figura 22 – Alinhamento *Blastn* (*Megablast*) contra o banco de dados de genomas totais de microrganismos do NCBI.

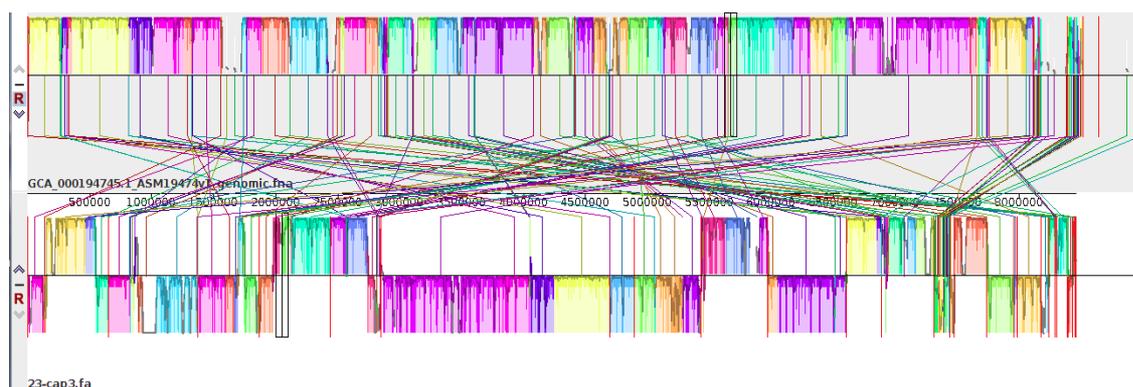
As quatro linhagens de bactérias com genomas totais depositadas no banco de dados de genomas do NCBI são *Burkholderia gladioli* BSR3 (SEO et al., 2011); *Burkholderia gladioli* ATCC 10248 (JOHNSON et al., 2015), *Burkholderia gladioli* pv. *KACC 11889* (NCBI, 2017) e *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* (NCBI, 2017). Duas destas linhagens se destacaram entre as demais na sistemática, primeiramente a linhagem *Burkholderia gladioli* BSR3 (*KamerFinder*), seguida da linhagem *Burkholderia gladioli* ATCC 10248 (*BLASTn*).

Após um *BLASTn* local do arquivo de *contigs* contra cada uma destas linhagens e tabulação dos dados quanto aos *scores* e *query coverages*, a linhagem *Burkholderia gladioli* BSR3 foi selecionada para a utilização nos experimentos de reordenamento de *contigs* e formação de *scaffolds*.

## 5.6 - REORDENAMENTO DE CONTIGS E FORMAÇÃO DE SUPERCONTIGS (SCAFFOLDS)

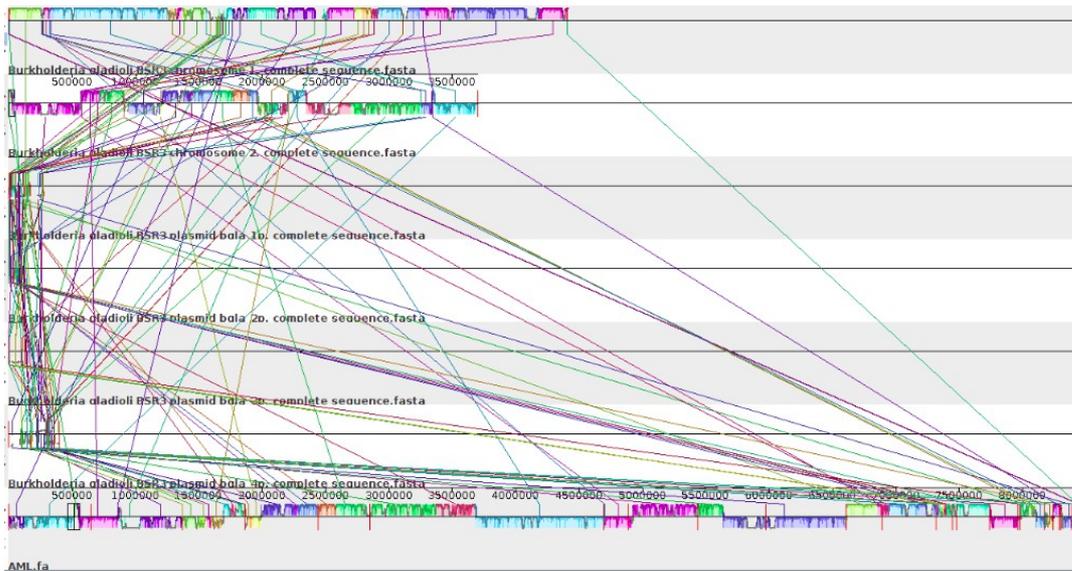
Considerando-se a montagem *de novo*, sem a utilização de um genoma de referência, é comum a não correspondência entre os blocos de seqüências do *draft* com o genoma de referência (Figura 23).

Esta análise revelou uma cobertura de 85,2 % em relação a linhagem BSR3, um déficit de cobertura de aproximadamente 590 kb. Foram 2772 *gaps* em relação a referência e 133050 SNPs. Este déficit não reflete necessariamente ausência de informação genética no microrganismo e sim uma abrangência insuficiente do sequenciamento.



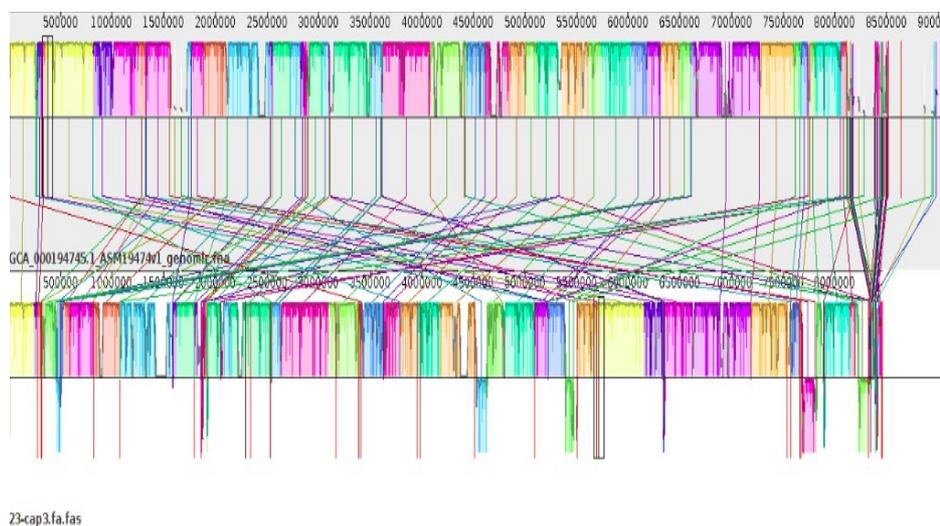
**Figura 23** – Gráfico do alinhamento de *contigs* da linhagem *Burkholderia gladioli* BSR3 em relação ao *draft* de *Burkholderia gladioli* do Lago de Coari (23.cap3.fa). As seqüências são coloridas e ordenadas conforme identidade pelo software *Mauve*.

A figura 24 mostra o alinhamento gráfico realizado entre o arquivo de *contigs* do *draft* de genoma do isolado do lago de Coari e as seqüências separadas dos dois cromossomos e quatro plasmídios da linhagem *Burkholderia gladioli* BSR3. O genoma sequenciado e montado neste trabalho possui seqüências equivalentes em todos os *replicons* do genoma escolhido como referência, o que é um indicativo que seu padrão genômico deve se manter semelhante.



**Figura 24** – Gráfico do alinhamento de cromossomos e plasmídios da linhagem *Burkholderia gladioli* BSR3 em relação ao *draft* de *Burkholderia gladioli* do Lago de Coari (23.cap3.fa). As seqüências são coloridas e ordenadas conforme identidade pelo software *Mauve*.

O reordenamento de *contigs* (Figura 25) não leva a uma diminuição em comprimento, como ocorre a montagem e não produz redução no número de nucleotídeos, apenas baseia sua ordem em um genoma selecionado pelo alto padrão do sequenciamento e da montagem (POP et al., 2004).



**Figura 25** – Reordenamento de contigs produzido pelo *Mauve* utilizando, como referência, o genoma de *Burkholderia gladioli* BSR3.

Quanto menor o número de *contigs*, menos *gaps* existirão, o que facilitaria análises futuras, como as comparativas, assim como o sequenciamento das regiões sem informação (RISSMAN et

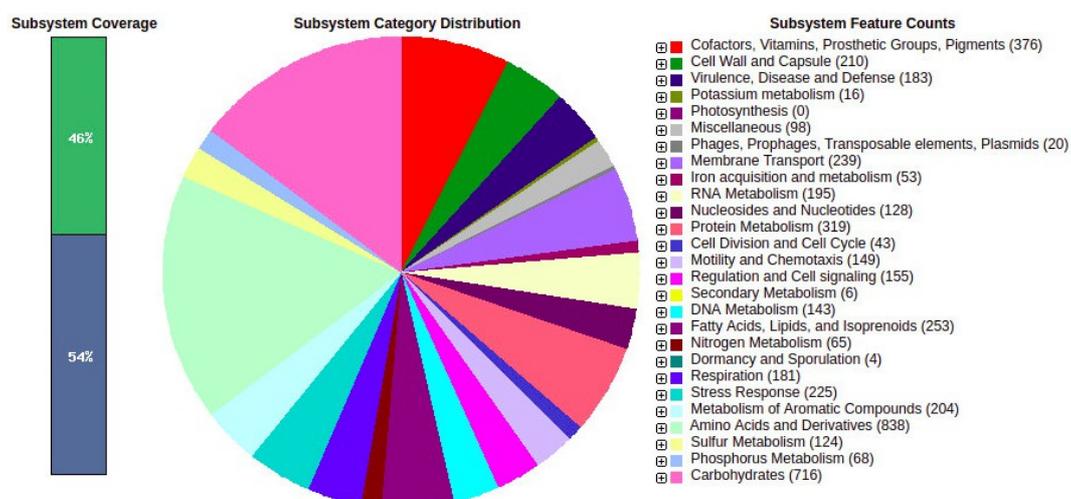
al., 2009), o que não é o alvo principal deste trabalho, mas poderá ser realizado no futuro.

O agrupamento final dos *contigs* em *scaffolds* resultou em um arquivo .fasta com três sequências, com comprimento mínimo de 126970 bp, máximo de 5916818 bp, N50 também de 5916818 bp e comprimento total de 8460408 bp, valor que aparece aproximado como 8,4 Mb ao longo deste texto.

## 5.7 - ANOTAÇÃO GÊNICA

O genoma possui amplo repertório enzimático relacionado a degradação de componentes de petróleo e derivados, assim como outros xenobióticos. A anotação foi realizada sob um genoma de montagem ainda não concluída e, desta forma, algumas vias não puderam ser reconstituídas inteiramente.

A Figura 26 categoriza grupos de genes encontrados na linhagem estudada, a *Burkholderia gladioli* Coa14 de acordo com subsistemas relacionados ao funcionamento celular e sua manutenção, potencial de virulência, genes extranucleares, bem como suas interações com o meio ambiente, como a resposta ao *stress*, por exemplo.



**Figura 26** – Subsistemas presentes, de acordo com a anotação realizada pelo *Rast-server*.

Do total de genes anotados, o maior grupo está relacionado com o metabolismo de aminoácidos, seguido dos genes para a produção de cofatores e proteínas e vias de produção de ácidos graxos, lipídios e isoprenóides.

Ao longo dos 8460426 nt resultantes da montagem, existem 7156 CDS, genes para 77 tRNAs, 6 rRNAs e uma região de tmRNA. Foram, em média, 7540 genes anotados entre os três

anotadores (Tabela 3).

Tabela 3 – Resumo dos dados de montagem e anotação gênica.

Atributo	Valor
Tamanho do Genoma (pb)	8460426
% de GC	67
Número de Contigs	27
Total de Genes	7540
Genes para rRNA	6
Genes para tRNA	77
CRISPS	1

## 5.8 - VIAS DE DEGRADAÇÃO DE COMPONENTES DO PETRÓLEO

Os resultados a seguir são referentes a genes que foram anotados automaticamente pelos três métodos utilizados e curados manualmente do genoma de *Burkholderia gladioli* Coa14.

### 5.8.1 - N-ALCANOS

Na Figura 27 temos as rotas mais comuns de degradação de n-alcenos, que envolvem oxidações terminais da cadeia de um grupamento metil, gerando um álcool ou sub-terminais, gerando um éster. O resultado final das duas rotas é a entrada na via de degradação de ácidos graxos ou no ciclo de Krebs, respectivamente (MINERDI et al., 2012; KOSHLAF e BALL, 2017).

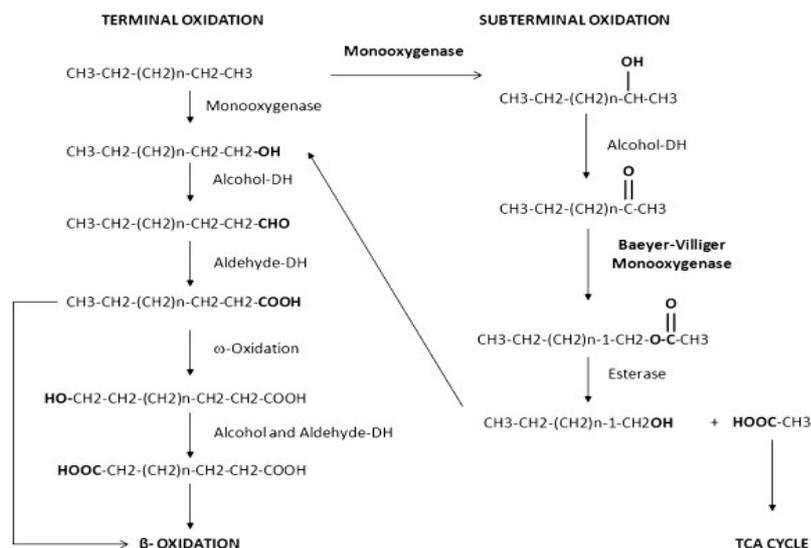


Figura 27 – Vias comuns de degradação de n-alcenos. Fonte: Minerdi et al. (2012).

Esta via normalmente é iniciada com a ativação da molécula de hidrocarboneto através da ligação de um átomo de oxigênio em uma de suas extremidades, formando um álcool primário, que entrará na via de degradação dos ácidos graxos. A anotação revelou a presença do gene para a enzima *alkA* (*alkano 1 monooxygenase*), catalizadora desta reação.

Entre as enzimas relacionadas com a via de ácidos graxos estão: *acyl-Coa dehydrogenase* (KIM et al., 1993); *acetyl-CoA C-acetyltransferase* (LYNEN e OCHOA, 1953); *acetyl-CoA acyltransferase* (FREVERT e KINDL, 1980); *enoyl-CoA hydratase* (FERRANDEZ et al., 1998); *long-chain acyl-CoA synthetase* (BLACK et al., 1992); *3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase* (MATSUOKA, 2007).

A degradação de n-alcenos de cadeias ramificadas, também presentes no petróleo de Urucu, termina, igualmente, na via de beta-oxidação e pode ser iniciada pela *alkano 1 monooxygenase*. Muitos microrganismos estão relacionados ao uso desta via (PIRNIK et al., 1974; WANGPENG e SHAO, 2013).

Apesar da ausência do gene para a enzima *alkB*, uma variante da *alkA* também presente nas reações de início da biodegradação de n-alcenos, esta via pode ser iniciada utilizando a enzima *citocromo P450 monooxygenase* (ROJO, 2009). A anotação revelou a presença do gene para a *ferredoxin reductase*, relacionada a transferência de elétrons para a P450 anteriormente citada. Todos os anotadores indicaram a presença de proteínas da “família” citocromo P450, sem especificar, entretanto, uma enzima.

Além dos genes envolvidos na via de degradação propriamente dita, a presença do gene para a proteína MCP (*methy-accepting chemotaxis protein*), que está relacionada ao deslocamento celular bacteriano em direção as regiões ricas em n-alcenos, reforça a tese de que a colônia isolada em Coari possa se beneficiar do petróleo como fonte de carbono, em locais de derramamento (SMITS et al., 2003).

## 5.8.2 – HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Ainda não é clara qual seria a atuação desta bactéria na degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, que não foram alvo da análise química. Entretanto, devido à sua intrínseca relação com o petróleo e a extensão do escopo da análise genômica para os componentes do óleo bruto relacionados com impactos ambientais importantes, destacam-se aqui genes identificados.

Na Tabela 4 estão todas as enzimas dos genes anotados que possam ter relação direta com a degradação deste tipo de substância. As rotas de degradação de PAHs se iniciam com a quebra do

anel aromático por uma oxigenase e convergem para uma de três vias comuns, a via do catecol, a via do gentisato ou a via do protocate.

**Tabela 4** – Genes e / ou locus gênicos e seus correspondentes enzimáticos relacionados à degradação de PAHs anotados. Famílias de genes aparecem como “fam”).

Gene	Enzima e / ou Subunidade Enzimática Relacionada
Cylst_6694	Aromatic ring-cleaving dioxygenase
bphD	2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate hydrolase
pcaC	4-carboxymuconolactone decarboxylase
mhpE	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase
APZ15_RS31815	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
carF	Acetaldehyde dehydrogenase
APZ15_RS32055	Aromatic-amino-acid aminotransferase
benA	Benzoate 1,2-dioxygenase alpha subunit
benB	Benzoate 1,2-dioxygenase beta subunit
pcaD	beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase
catA	Catechol_1,2-dioxygenase
nahH	Catechol_2,3-dioxygenase
fam	Cytochrome P450
hmtB	hydroxymuconate tautomerase
maiA	Maleylacetoacetate isomerase
catB	Muconate cycloisomerase
catC	Muconolactone isomerase
pcaG	Protocatechuate_3,4 dioxygenase alpha
pcaG	Protocatechuate_3,4 dioxygenase beta
BPHY_RS31735	Protocatechuate_4,5 dioxygenase
APZ15_RS18310	Salicylate hydroxylase
tol4	Toluene-4-monooxygenase

O sistema Citocromo P450, a *aromatic ring-cleaving dioxygenase*, e a *protocatechuate 3,4-dioxygenase* são as três enzimas candidatas para cumprirem esta função de iniciadores em *Burkholderia gladioli* Coa14 graças, a presença de seus respectivos genes.

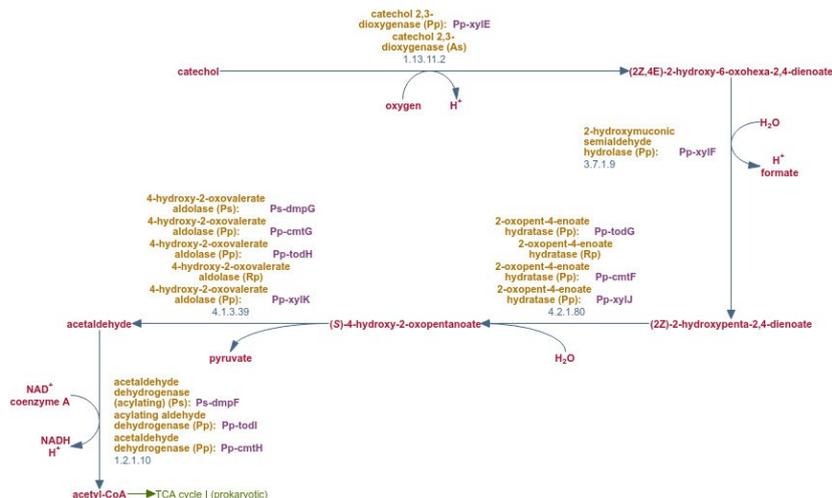
A *aromatic ring-cleaving dioxygenase* relaciona-se com a degradação aeróbica de compostos aromáticos por microrganismos, justamente realizando sua conversão em intermediários catecóis (FETZNER, 2012). O nome anotado de maneira mais genérica trouxe dificuldades em se relacionar esta enzima como produtora de clivagem intradiol ou extradiol, o que define qual via de degradação o composto aromático deve seguir.

Três genes para enzimas relacionadas com a via do Citocromo P450 foram anotados: para a *alcohol dehydrogenase* (THEORELL, 1958), para a *glutathione transferase* (TU e QIAN, 1987) e para a *S-(hydroxymethyl) glutathione dehydrogenase* (GUTHEIL et al., 1992). Esta é uma via de grande versatilidade, relacionada na biorremediação de petróleo, biotransformação de pesticidas e fármacos.

A *protocatechuate 3,4-dioxygenase* é uma enzima ferro dependente que, ocupa um papel chave na degradação de PAHs (GUZIK et al., 2014) e pode assumir a função da enzima *P450 oxigenase*. Esta enzima realiza uma quebra oxidativa dos anéis aromáticos estáveis nos PAHs, que tornam esta moléculas recalcitrantes (WÓJCIK et al., 2011). A anotação demonstrou a presença de genes para a formação de suas duas subunidades, alfa (GROSS et al., 1956 ; FUJISAWA e

HAYAISHI, 1968) e beta (STANIER e INGRAHAM, 1954).

A quebra dos anéis aromáticos gera intermediários ativos dihidroxilados em forma de anéis, como o catecol e o gentisato. Duas dioxigenases relacionadas a via do catecol estão presentes, a *catechol 1,2-dioxygenase* e a *catechol 2,3-dioxygenase*. Estas quebram anéis do catecol e geram cis-muconato, um intradiol. O destino final desta via é a conversão de um acetaldeído em acetil-CoA e seu ingresso no ciclo de krebs (Figura 28).



**Figura 28** – Principais enzimas presentes na via de degradação do catecol.  
Fonte: ALTMAN et al. 2014.

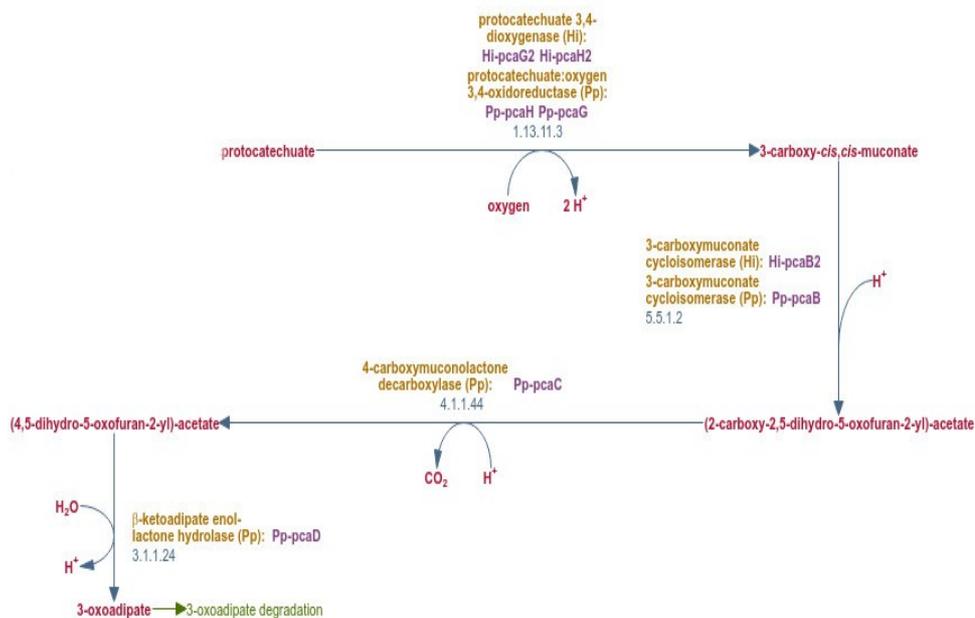
A Figura 28 mostra as enzimas envolvidas na via do catecol, um intermediário na *meta-clivagem* de compostos aromáticos. Genes para todas as etapas relacionadas com esta encontram-se presentes (Tabela 5).

**Tabela 5** – Genes anotados da via do catecol.

Gene	Enzima e / ou Subunidade Enzimática Relacionada
catA	Catechol_1,2-dioxygenase
nahH	Catechol_2,3-dioxygenase
bphD	2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate hydrolase
mhpE	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase
carF	Acetaldehyde dehydrogenase

Na Figura 29 estão as principais enzimas da via do protococatecuto, ou simplesmente, via do protocate, cujos genes anotados para *Burkholderia gladioli* Coa14 encontram-se na Tabela 6.

Nem todos os genes relacionados a via do protocate anotados para *Burkholderia gladioli* Coa14 (Tabela 6) encontram-se na via principal descrita (Figura 29), ocorrendo a inexistência do gene para a enzima *3-carboximuconate cycloisomerase*, referente ao segundo passo da via em questão.



**Figura 29** – Principais enzimas presentes na via de degradação do protocate.  
 Fonte: ALTMAN et al. 2014.

**Tabela 6** – Genes anotados para a via do protocate.

Gene	Enzima e / ou Subunidade Enzimática Relacionada
pcaG	Protocatechuate_3,4 dioxygenase alpha
pcaG	Protocatechuate_3,4 dioxygenase beta
hmtB	hydroxymuconate tautomerase
pcaC	4-carboxymuconolactone decarboxylase
pcaD	beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase

A ausência de algumas enzimas de determinadas vias em nossa anotação pode ser resultado de sua ausência no genoma ou apenas do “gap” gerado pelo não sequenciamento desta região, em específico. Mesmo em genomas totalmente sequenciados, é comum a ausência de determinadas enzimas dentro de uma via (VENTER et al., 2004; FENG et al., 2007). Isto pode ser um indicativo que outras enzimas, ainda não relacionadas, assumam a função da enzima ausente, em desvios da rota principal, sem prejuízo para o microrganismo.

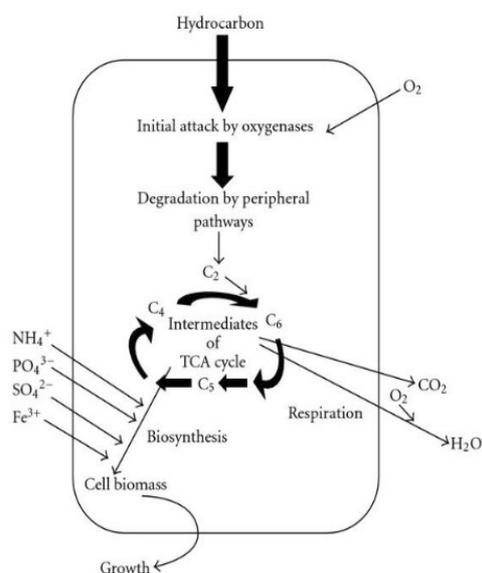
O naftaleno, fenantreno, fluoranteno, pireno e o benzo-a-pireno (CHAPMAN e HOPPER, 1968; SEO et al., 2009; FATHEPURE, 2014) são hidrocarbonetos policíclicos aromáticos degradáveis pelas vias do catechol e do protocate. Três genes estão presentes e relacionam-se diretamente com a via de degradação do naftaleno e do antraceno, para as enzimas *aromatic-ring hydroxylating dioxygenase* (DEMANÈCHE et al., 2004), a *alpha/beta hydrolase* (TOMÁS-

GALLARDO et al., 2014) e a *salicylate hydroxylase* (PINYAKONG et al., 2003)

### 5.8.3 – GENES PARA OXIGENASES

As oxigenases são enzimas chave na quebra de compostos complexos (Figura 30), quanto maior a presença de seus genes, mais robusto pode ser considerado o genoma. Sem elas a mineralização de xenobióticos seria impossível (ARORA et al., 2009). Foram anotadas mais de 70 genes para estas enzimas na linhagem *Burkholderia gladioli* Coa14.

Elas atuam em condições aeróbicas adicionando um ou dois átomos de oxigênio aos anéis aromáticos, no caso das mono e dioxigenases, respectivamente (PEIXOTO et al., 2011). A adição deste(s) átomo(s) provoca desestabilização e abertura do anel que, uma vez linear, pode sofrer ataque de enzimas para degradação de hidrocarbonetos alifáticos, como a *alkA*, por exemplo.



**Figura 30** - Esquema simplificado de degradação de hidrocarbonetos iniciada pelas oxigenases. Fonte: Das e Chandran, 2011.

A *aromatic ring-cleaving dioxygenase* está diretamente relacionada com a biodegradação do pireno (BADEJO et al., 2013), a *xylene monooxygenase* e a *toluene 4-monooxygenase* são importantes nas vias de degradação do xileno e tolueno, respectivamente. Ambos fazem parte do grupo de substâncias derivadas do petróleo denominadas BTEX (WITHED e GIBSON, 1991).

Existe uma relação entre a quantidade de oxigênios que uma oxigenase pode incorporar e o tamanho da cadeia de n-alcenos em que ela atua. Monooxigenases estão relacionadas à degradação de moléculas entre 5 e 16 átomos (McDONALD et al., 2006) e dioxigenases degradam moléculas

maiores, entre 10 e 30 átomos de carbono (MAENG et al., 1996). A Tabela 7 indica resumidamente todas as vias presentes e o número de genes relacionados com as oxigenases anotadas, utilizando-se o *KAAS Server*.

**Tabela 7** – Vias relacionadas à oxigenases presentes de acordo com *KAAS Server*.

Processo	Número de Genes Anotados
Degradação do Benzoato	26
Degradação do Aminobenzoato	15
Degradação do Cloroalcano e Cloroalceno	7
Degradação Clorocicloexano e Clorobenzeno	6
Degradação do Xileno	8
Degradação do Etilbenzeno	1
Degradação do Nitrotolueno	1
Degradação do Styreno	9
Degradação da Atrazina	5
Degradação do Caprolactam	5
Degradação da Dioxina	3
Degradação do Furfural	1

#### 5.8.4 – GENES PARA BIOSURFACTANTES

De acordo com a Figura 26, existem seis vias neste microrganismo relacionadas a produção de metabólicos secundários, de onde derivam, normalmente, os biossurfactantes (NIE et al., 2012). Onze genes anotados pelo *RAAST-Server* possuem relação com a produção de biossurfactantes (Tabela 8).

**Tabela 8** – Genes e / ou locus gênicos e seus correspondentes enzimáticos relacionados à produção de biossurfactantes de acordo com *RAAST-server*.

Gene	Enzima e / ou Subunidade Enzimática Relacionada
fabG	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase
pfam01757	Acyltransferase
manB	Phosphomannomutase
rafB	Glycosyltransferase
Transcriptional regulator, LuxR family	Transcriptional regulator, LuxR family
LuxR	DNA-binding response regulator, LuxR family
LuxR	Sensory box transcriptional regulator, LuxR family
LuxR	Transcriptional regulator, LuxR family
OmpA / MotB	OmpA/MotB precursor
ImpK / VasF	Outer membrane protein ImpK/VasF, OmpA/MotB domain
Non-ribosomal peptide synthetase	Non-ribosomal peptide synthetase modules, pyoverdine

Biossurfactantes são moléculas com capacidade de interações hidrofílicas e hidrofóbicas que

aumentam a biodisponibilidade de compostos insolúveis ou de baixa solubilidade, como os componentes de petróleo (DESAI e BANAT, 1997). São estruturalmente diversos, possuem sua produção relacionada aos *operons* e sua secreção a grupos particulares de enzimas (NAKANO e ZUBER, 1993), o que torna a reconstrução das vias de produção mais difícil ao se tratar de um *draft* de genoma. Sendo assim, a discussão a seguir enfoca mais na presença de genes individuais presentes do que na tentativa de reconstruir vias metabólicas.

Os quatro primeiros genes da Tabela 8 são utilizados na biossíntese de glicolipídios, a família *LuxR* está relacionada com a regulação destas vias (MAIER e SOBERON-CHAVES, 2000; SATPUTE et al., 2010). Os genes *OmpA* e *OmpB* relacionam-se com a degradação de compostos hidrofóbicos, atuando como constituintes na biossíntese de proteínas externas da membrana plasmática que interagem com estes.

Genes assinalados como “*non-ribosomal peptide synthetase*” ou NRPS estão relacionados com vias “ribossomo-independentes” de produção de lipopeptídeos, que também interagem com componentes apolares (SCHNEIKER et al., 2006). Em suma, estes genes podem ser considerados constituintes base para a produção de biossurfactantes (ROONGSAWANG et al., 2010).

É comum na literatura a relação entre a produção de surfactantes por colônias bacterianas e sua capacidade de atuação junto ao petróleo e derivados. Pode-se citar a ação de *Pseudomonas aeruginosa* sobre fenantreno e hexadecano (FORTIN et al., 1997; NOORDMAN et al., 2002) e n-alcenos e PAHs em *Pseudomonas sp.* (XIA et al., 2014).

No gênero *Burkholderia*, Almatawah (2017) descreve a presença do que chama “bactéria indígena potente produtora de biossurfactante”, referindo-se a uma *Burkholderia cepacia*. Hörman et al. (2010) relacionam a produção de ramnolipídeos com capacidade surfactante em *Burkholderia plantarii* e Wattanaphon et al. (2008) descrevem um aumento na solubilização de pesticidas através de biossurfactantes, produzido por *Burkholderia cenocepacia*.

Não foram encontrados *papers* na literatura, enquanto este item era escrito relacionando *Burkholderia gladioli*, biossurfactantes e biodegradação de petróleo e seus derivados, como n-alcenos ou PAHs, uma evidência que esta colônia deve ser melhor estudada com este enfoque.

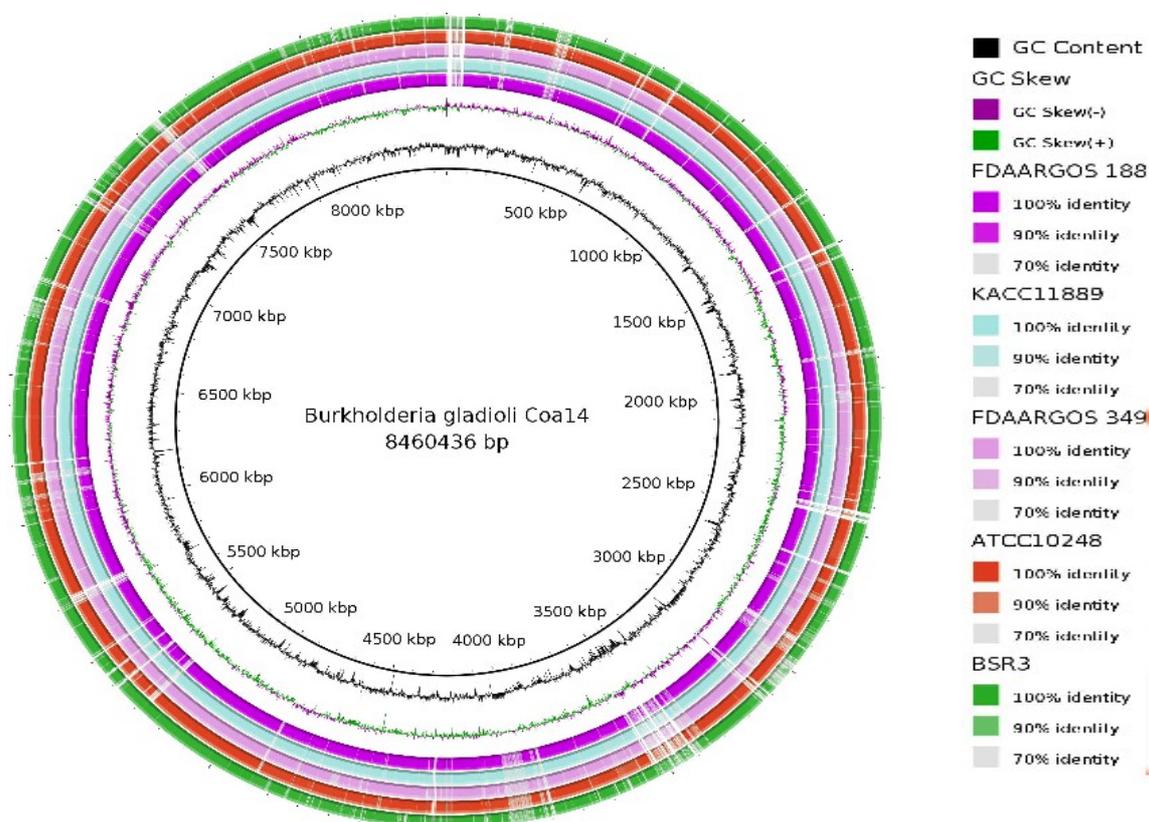
## 5.9 – GENÔMICA COMPARATIVA

A Tabela 9 relaciona os cinco genomas completos de *Burkholderia gladioli* depositados no NCBI, em comparação ao *draft* de *Burkholderia gladioli* *Coal4* quanto ao tamanho, número de genes e razão de GC.

**Tabela 9** – Dados dos genomas completos das 5 linhagens de *Burkholderia* presentes no banco de dados do NCBI associados ao *draft* de *Burkholderia gladioli* Coa14.

Linhagem	Tamanho do Genoma (Mb)	Número de Genes	%GC
<i>Burkholderia gladioli</i> Coa14	8.40	7350	68.04
<i>Burkholderia gladioli</i> BSR3	9.05	7938	67.41
<i>Burkholderia gladioli</i> ATCC10248	8.89	8034	67.41
<i>Burkholderia gladioli</i> FDAARGOS389	8.28	7271	67.97
<i>Burkholderia gladioli</i> KACC11889	8.85	7653	67.65
<i>Burkholderia gladioli</i> FDAARGOS188	8.89	7731	67.62

A Figura 31 mostra um gráfico em anel gerado através do *BRIG*, com todos os genomas completos de *Burkholderia gladioli* depositados no NCBI em alinhamento, utilizando como “*query*” o genoma de *Burkholderia gladioli* Coa14. A legenda mostra variações de cores dos valores de identidade entre as sequências.

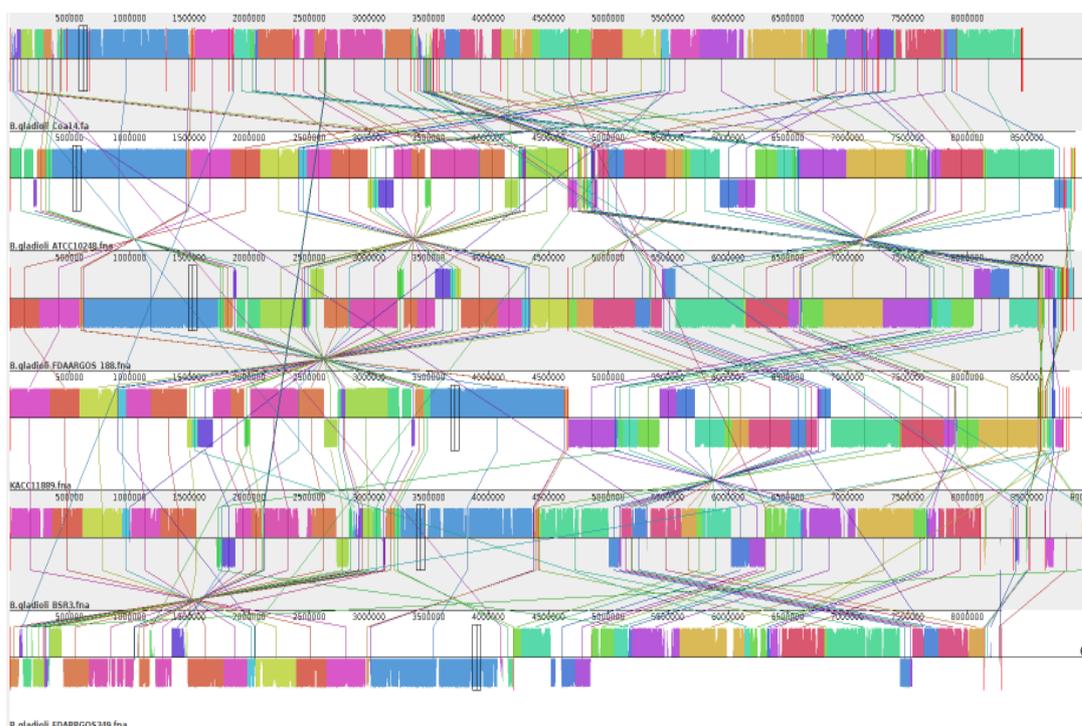


**Fig 31:** Comparativo entre genomas utilizando o *draft* de *Burkholderia gladioli* Coa14 como “*query*”. Dentro para fora: Anel1: de *Burkholderia gladioli* Coa14, Anel2: conteúdo de GC, Anel3: GC skew, Anel4: genoma de *Burkholderia gladioli* FDAARGOS188, Anel5: genoma de *Burkholderia gladioli* KACC889, Anel6: genoma de *Burkholderia gladioli* FDAARGOS349, Anel6: genoma de *Burkholderia gladioli* ATCC10248 e Anel7: genoma de *Burkholderia gladioli* BSR3. A legenda mostra os valores de identidade entre as linhagens.

O *draft* possui um tamanho 5,51% menor do que o da linhagem *Burkholderia gladioli* ATCC10248, referência do NCBI e é 7,18% menor do que a linhagem *Burkholderia gladioli* BSR3, que possui o maior genoma depositado publicamente no mesmo banco de dados. A razão de GC é relativamente a mesma para todos os genomas (Tabela 9).

Em termos de identidade, pode-se perceber a semelhança entre todos os genomas utilizados e o genoma objeto de estudo deste trabalho, uma vez que a similaridade é mantida entre a maior porção dos anéis. Regiões marcadas com linhas em branco representam sequências com nenhuma identidade ou ausentes, quando a comparação é feita com a referência, no caso em questão, Coa14.

A Figura 32 mostra um gráfico produzido pelo software *Mauve* mostrando blocos de DNA dos genomas completos contra si e contra o *draft* de *Burkholderia gladioli* Coa14. Ao contrário do algoritmo que gerou o gráfico anterior, nesta figura os *contigs* estão mantidos em suas posições originais e são coloridos conforme identidade.



**Fig 32:** Mapa dos genomas de *Burkholderia gladioli* mostrando rearranjos: de cima para baixo: *Burkholderia gladioli* Coa14 (1), *Burkholderia gladioli* ATCC10248 (2), *Burkholderia gladioli* FDAARGOS188 (3), *Burkholderia gladioli* KACC11889 (4), *Burkholderia gladioli* BSR3 (5) e *Burkholderia gladioli* FDAARGOS349 (6).

Vários blocos foram conservados, em todos genomas utilizados na análise, em relação a nossa linhagem, estando, porém, rearranjados. Uma vez que foram identificadas sequências CRISPRs no *draft* do genoma da linhagem Coa14, sugere-se que estas estejam relacionadas aos

rearranjos demonstrados, já que costumam ocorrer devido a infecções por bacteriófagos, durante a história evolutiva do microrganismo (CHOI et al., 2013).

Foram encontradas 40 repetições de regiões CRISP com tamanho médio de 28 bp, com regiões espaçadoras com tamanho médio de 32 bp. Surpreendentemente, nenhum tipo de sequência CRISPR e nem genes associados foram encontradas no genoma utilizado como referência pelo NCBI, *Burkholderia gladioli* BSR3.

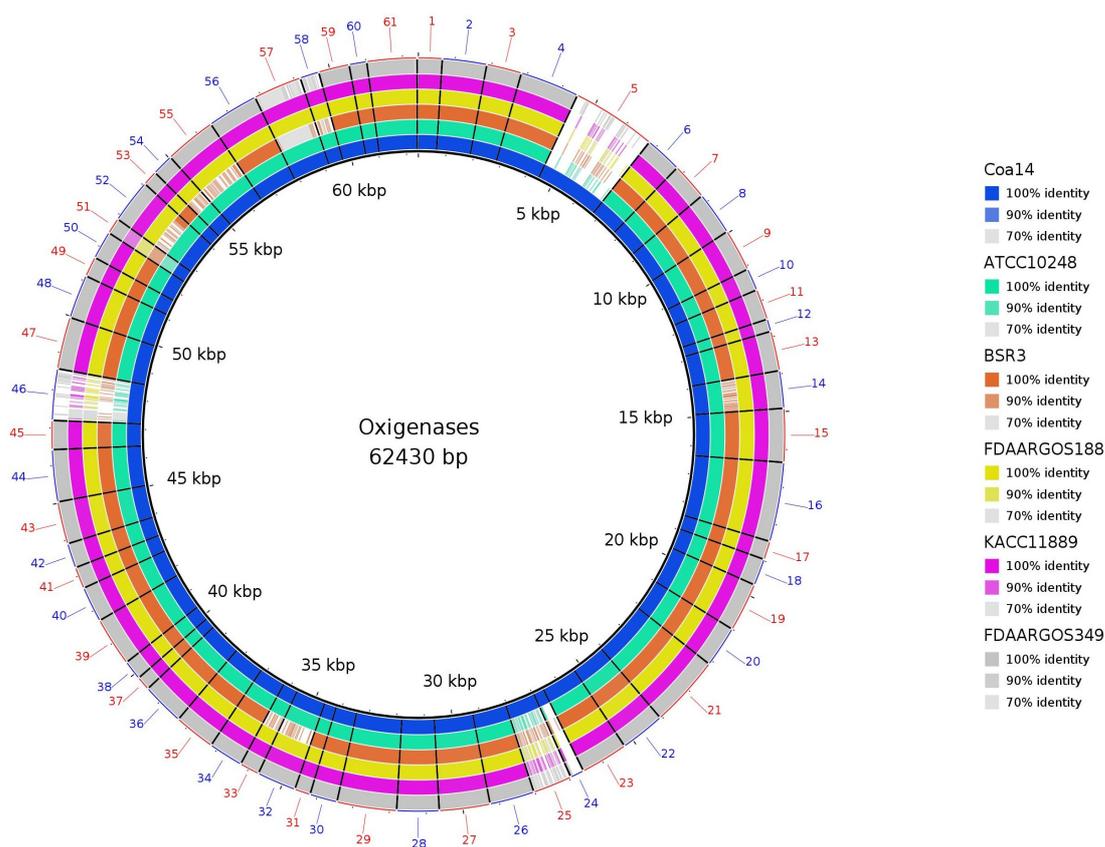
A anotação revelou a presença dos genes *CRISPR-associated protein Cas1* (BABU et al., 2011); *CRISPR-associated helicase Cas3* (WESTRA et al., 2012), *Yersinia Type*; *CRISPR-associated protein Csy1 family* (HAURWITZ et al., 2012); *CRISPR-associated protein Csy2 family* (HAURWITZ et al., 2012); *CRISPR-associated protein Csy3 family* (HAURWITZ et al., 2012); *CRISPR-associated protein Csy4 family* (HAURWITZ et al., 2012).

Análises do mesmo tipo realizadas nas outras 3 principais linhagens com genomas depositados no NCBI, entre elas *Burkholderia gladioli ATCC10248*, *Burkholderia gladioli FDAARGOS389* e *Burkholderia gladioli KACC11889*, não encontraram evidências da presença destas regiões.

Apesar da semelhança em termos de sequência propriamente dita, diversos rearranjos são observados na comparação realizada (Figura 32). Nosso interesse em comparar estes genomas é encontrar características únicas em nossa linhagem, que possam refletir em adaptações regionais e que sejam utilizáveis para o desenvolvimento de tecnologias locais de biorremediação do óleo de Urucu.

É o que ocorre, por exemplo, quando se compara todos estes genomas utilizando-se como “query” um arquivo com as sequências gênicas do grupo de oxigenases, encontradas na linhagem amazônica (Figura 33). Uma vez que estas enzimas normalmente estão relacionadas com a degradação de xenobióticos, é de se esperar um aumento da robustez para lidar com danos ambientais, a medida que um gênero as acumule em detrimento a outros, dentro de uma mesma família, mas que sofreram diferentes pressões evolutivas.

O gênero *Burkholderia* é considerado um dos que possui um maior aparato enzimático para fins de limpeza ambiental (RAJU e SCALVENZI, 2018). A linhagem Coa14 se destaca das demais pela a presença da *Tolueno 4-monooxygenase*, *3-phenylpropionate dioxygenase*, *arachidonate 15-lipoxygenase* e uma possível *phthalate. 4,5-dioxygenase / oxygenase* (Anexo 1), a primeira enzima inicia a via de degradação do tolueno.



**Fig 33:** Comparação entre os genomas de *Burkholderia gladioli* Coa14, *Burkholderia gladioli* FDAARGOS188, *Burkholderia gladioli* ATCC10248, *Burkholderia gladioli* FDAARGOS349, *Burkholderia gladioli* BSR3 e *Burkholderia gladioli* KACC11889 quanto à presença de oxigenases, representadas pelos números de 1 a 61 (vide: Anexo 2).

A Tabela 10 relaciona o tamanho do genoma de 20 linhagens de bactérias capazes de biorremediar algum tipo de componente de petróleo, juntamente com o fenótipo observado. Estas linhagens foram selecionadas utilizando-se como base uma revisão realizada por Xu e colaboradores, em 2018. Na linha número 1 desta tabela encontra-se a *Burkholderia gladioli* Coa14, cujo fenótipo foi confirmado apenas para a atuação junto aos n-alcenos, entre os quesitos explorados.

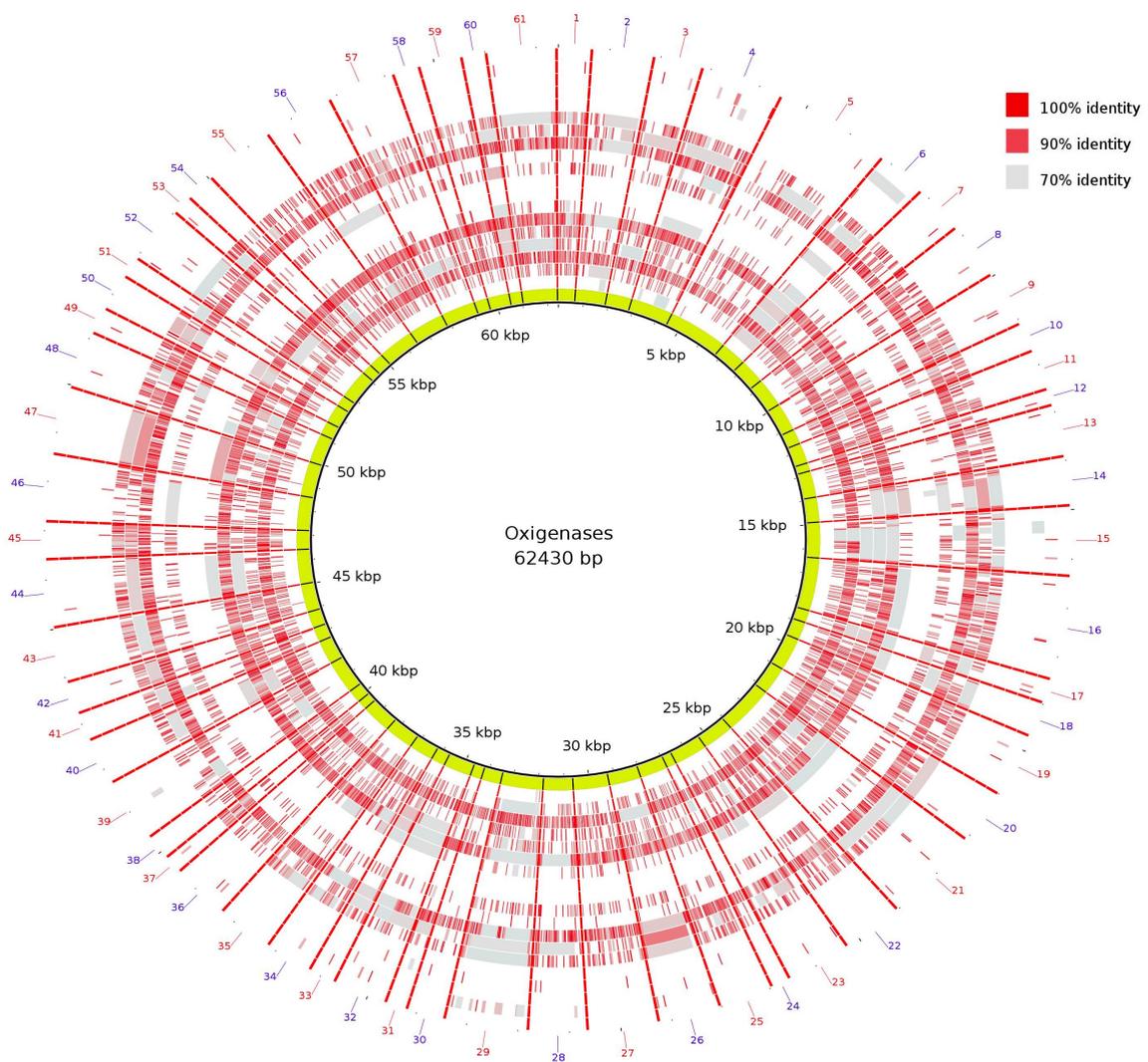
Uma comparação entre todos estes genomas e a presença de oxigenases, de acordo com as sequências para os genes anotadas em Coa14, pode ser visualizada na Figura 34. Cada anel representa uma linhagem diferente de microrganismo. O primeiro anel, de cor amarela, representa a bactéria do Lago de Coari, os anéis seguem a mesma ordem da Tabela 10, de dentro para fora.

**Tabela 10:** linhagens bacterianas, tamanho do genoma e fenótipo quanto à capacidade de degradação de componentes do petróleo (adaptada de XU et al., 2018).

Linhagem	Tamanho do Genoma (pb)	Perfil de Degradação
1 – <i>Burkholderia gladioli</i> Coa14	8.460.408	n-alcanos; PAHs?; asfaltenos?
2 – <i>Oleispira antarctica</i>	4.406.383	n-alcanos (C10-C18)
3 – <i>Dietzia</i> sp	3.679.573	n-alcanos (C6-C40)
4 – <i>Aeribacillus pallidus</i>	4.985.863	mono / poliaromáticos
5 – <i>Novosphingobium</i> sp	5.313.905	poliaromáticos
6 – <i>Bacillus mojavensis</i>	3.957.021	poliaromáticos
7 – <i>Sphingomonas</i> sp	4.633.613	poliaromáticos
8 – <i>Rhodococcus ruber</i>	5.303.098	ciclohexano
9 – <i>Pseudomonas</i> sp	6.183.388	n-alcanos (C14-C30) / asfaltenos
10 – <i>Staphylococcus</i> sp	2.738.396	asfaltenos
11 – <i>Bacillus</i> sp	4.815.602	asfaltenos
12 – <i>Sphingobium</i> sp	4.348.133	poliaromáticos
13 – <i>Enterobacter</i> sp	4.676.461	asfaltenos
14 – <i>Gordonia sihwensis</i>	4.140.890	n-alcanos lineares / ramificados
15 – <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.264.404	monoaromáticos
16 – <i>Mycobacterium cosmeticum</i>	6.462.090	monoaromáticos
17 – <i>Lysinibacillus</i> sp	4.584.915	asfaltenos
18 – <i>Bacillus licheniformis</i>	4.222.597	poliaromáticos
19 – <i>Cycloclasticus</i> sp	2.363.215	poliaromáticos
20 – <i>Alcanivorax</i> sp	3.095.415	n-alcanos lineares / ramificados
21 – <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	6.813.182	mono / poliaromáticos

Os genes utilizados para a comparação foram anotados do genoma de *B. gladioli* Coa14, o que explica a visualização de 100 % de identidade com o primeiro anel, representante do *draft* desta linhagem. De acordo com a comparação realizada, as espécies *Aerobacillus pallidus*, *Gordonia sihwensis* e *Rhodococcus ruber* são as que mais se aproximam da *Burkholderia gladioli* Coa14, em termos de presença e identidade para os genes destas enzimas. Elas estão relacionadas com biorremediação de compostos mono e poliaromáticos, n-alcanos lineares, ramificados e ciclohexano, respectivamente.

A robustez associada a presença das oxigenases também associa-se ao fato de que cada uma delas possa estar ligada a outras vias de degradação, que não sejam aquelas principalmente associadas a elas através de cometabolismo, por exemplo, como ocorre na biodegradação de organoclorados (ÇEÇEM et al., 2010).



**Fig 34:** Comparação entre 22 genomas linhagens biorremediadoras de componentes de petróleo quanto à presença de oxigenases, representadas pelos números de 1 a 61 (Anexo 2). Os genomas nos anéis estão dispostos de dentro para fora conforme Tabela 9.

## ***CONCLUSÕES***



## 6 - CONCLUSÕES

- A linhagem isolada em meio enriquecido com petróleo da região do Lago de Coari, identificada como *Burkholderia gladioli* Coa14 mostrou potencial para a degradação de n-alcenos de petróleo, sem enriquecimento de meio de cultura.
- A mesma é resistente a três antibióticos do grupo das cefalosporinas, mas apresenta sensibilidade a nove antibióticos para o grupo das bactérias Gram Negativas.
- O sequenciamento do genoma foi suficiente para cobrir mais de 80% da sequência em relação ao genoma de referência e permitiu a anotação de mais de 7.500 genes.
- A sequência obtida como um *draft* revelou estrutura similar a outros genomas sequenciados de *Burkholderia gladioli* em relação a características importantes, como a quantidade de genes para as oxigenases.
- A quantidade de genes anotados indica a presença de vias relacionadas com a degradação de PAHs.
- A anotação gênica demonstrou potencial para biorremediação de outros componentes do petróleo, como os BTEX.
- A genômica comparativa indicou superioridade da linhagem isolada do Lago de Coari em relação a outras bactérias reconhecidas como biorremediadoras de petróleo quanto a quantidade de genes presentes para as oxigenases.
- A capacidade de resistência da linhagem de *Burkholderia gladioli* Coa14 ao óleo de Urucu está relacionada a genes de degradação de xenobióticos presentes em seu genoma, que a qualificam para ingresso em programas de desenvolvimento de processos / produtos relacionados à biorremediação de petróleo e seus derivados.

***ANEXOS***



## ANEXO 1 – LISTA DE GENES ANOTADOS PARA OXIGENASES

Número	Enzima	Sigla
1	Nitrilotriacetate monooxygenase component B	BPSS1708
2	Alkane-1 monooxygenase	alkB
3	Tryptophan 2,3-dioxygenase	BPSL0846
4	Ubiquinone biosynthesis monooxygenase	BPSL3059
5	Arachidonate 15-lipoxygenase precursor	CMQ_2141
6	Dioxygenases related to 2-nitropropane dioxygenase	RCC_07422
7	Gentisate 1,2-dioxygenase	BM43_RS37260
8	Phenylpropionate dioxygenase	BW23_RS10870-2
9	Phenylacetate-CoA oxygenase/reductase	paaK
10	Phenylacetate-CoA oxygenase	paaJ
11	Phenylacetate-CoA oxygenase	paal
12	Phenylacetate-CoA oxygenase	paaH
13	Phenylacetate-CoA oxygenase	paaG
14	Alpha-ketoglutarate-dependent taurine dioxygenase	BPSS0665
15	Nitrilotriacetate monooxygenase component A	BPSS0851
16	Nitric oxide dioxygenase	PA1S_gp0466
17	prob. diox.	prob. diox.
18	Nitrilotriacetate monooxygenase component B	MYA_5864
19	put. oxy.	put. oxy.
20	Alkanesulfonate monooxygenase	APZ15_RS11675
21	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	APZ15_RS31815
22	Gamma-butyrobetaine,2-oxoglutarate dioxygenase	BPSS1110
23	3-phenylpropionate dioxygenase	BW23_RS10870
24	3-phenylpropionate dioxygenase ferredoxin	hcaC
25	Toluene-4-monooxygenase	tol4
26	Sulfonate monooxygenase	PA1S_gp1844
27	Lignostilbene-alpha,beta-dioxygenase	NH44784_051211
28	Vanillate O-demethylase oxygenase subunit	vanA
29	Cyclohexanone monooxygenase	BMULJ_03473
30	Fe(2+)/alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase	MYA_4580
31	prob. ring-cleaving dioxy	prob. ring-cleaving dioxy
32	lipoxigenase	LOX1
33	2-chlorobenzoate 1,2-dioxygenase reductase component	MYA_RS25515
34	Benzoate 1,2-dioxygenase beta subunit	benB
35	Catechol 1,2-dioxygenase	Bcen_1307
36	BPSL1646 monooxygenase	BPSL1646
37	3-phenylpropionate dioxygenase	BW23_RS10870-3
38	Fer. Sub. Nit. Red. ring-hydroxylating dioxygenases	BMULJ_01051
39	Ortho-halobenzoate 1,2-dioxygenase beta-ISP	OhbA
40	Ortho-halobenzoate 1,2-dioxygenase beta-ISP	OhbB
41	Catechol 1,2-dioxygenase	Bcen_1307-2
42	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	Bamb_5345
43	Cysteine dioxygenase	BamMC406_4156
44	Alkanesulfonate monooxygenase	APZ15_RS11675
45	Homogentisate 1,2-dioxygenase	hmgA
46	Haem oxygenase	Bphyt_1281
47	Put. phthal. 4,5-dioxy. oxy.	Put. phthal. 4,5-dioxy. oxy.
48	put. mon.	put. mon.
49	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	APZ15_RS31815
50	2,4'-dihydroxyacetophenone dioxygenase	APZ15_RS25330
51	Protocatechuate 3,4-dioxygenase	MYA_4482
52	prob. ring-cleav.	prob. ring-cleav.
53	put. monooxy.	put. monooxy.
54	Aromatic ring-cleaving dioxygenase	Bamb_4881
55	Aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase	Bamb_5503
56	Ring hydroxylating dioxygenase	Bcep18194_C7073
57	Protocatechuate 4,5-dioxygenase	ligBII
58	Ortho-halobenzoate 1,2-dioxygenase	OhbB
59	Ortho-halobenzoate 1,2-dioxygenase	OhbA
60	phytanoyl-CoA dioxygenase family protein	phyh
61	prob. dioxy.	prob. dioxy.

# ANEXO 2 - ARTIGO



AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY



genomeAnnouncements™

Published as Microbiology Resource Announcements starting 12 July 2018

---

Genome Announc. 2018 Apr; 6(16): e00301-18.PMCID: PMC5908936

Published online 2018 Apr 19. doi: [10.1128/genomeA.00301-18](https://doi.org/10.1128/genomeA.00301-18)PMID: [29674552](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29674552/)

---

## Draft Genome Sequence of *Burkholderia gladioli* Coa14, a Bacterium with Petroleum Bioremediation Potential Isolated from Coari Lake, Amazonas, Brazil

Eraldo Ferreira Lopes,<sup>1a</sup> Josemar Gurgel Da Costa,<sup>1a</sup> Ivan Rodrigo Wolf,<sup>1b</sup> José Paulo de Araújo Lima,<sup>1a</sup> and Spartaco Astolfi-Filho<sup>1c</sup>

► Author information ► Article notes ► Copyright and License information [Disclaimer](#)

---

### ABSTRACT

*Burkholderia gladioli* Coa14 is a bacterium isolated from water collected from Coari Lake (Amazonas, Brazil) that shows a capacity for survival in a medium containing only oil as a carbon source. Here, we report its draft genome sequence, highlighting some genes involved with petroleum derivative degradation.

---

### GENOME ANNOUNCEMENT

*Burkholderia gladioli* is a mobile, Gram-negative, and catalase-positive bacterium that belongs to the *Burkholderia cepacia* complex. It has symbiotic fungal activities and is able to produce disease in plants and in immunosuppressed humans (1). This genus has biotechnology applications, including biological control, biostimulation, and bioremediation (2, 3). Thus far, there are different lineages of *B. gladioli* associated with bioremediation (4–6).

This lineage was isolated through culture enrichment (7) by means of water collected from Coari Lake, which belongs to the city of Coari (Amazonas, Brazil), along the Petrobrás SA Rio Solimões Oil Pipeline (ORSE-1). Isolation was conducted using a minimal mineral medium containing crude oil from the Uruçu oil-producing province, in Coari's urban area. Afterwards, the *B. gladioli* sample was grown for 21 days in Bushnell Haas medium containing crude oil as the only carbon source.

The cells were isolated in order to extract DNA using the phenol-chloroform method. Extraction quality and concentration were evaluated by NanoDrop and Qubit instruments, respectively. There were 2 rounds of DNA sequencing with an Illumina QTE HiSeq instrument, generating 10,855,172 paired-end reads of 250 nucleotides (nt).

The reads were evaluated for quality and had their sequencing adapters removed using Trimmomatic v0.32 (8). The *de novo* assembly was made with MIRA v4.0-1 (9) and CAP3 (10), which generated 23 contigs and a draft genome of 8.4 Mb. The *N*<sub>50</sub> value obtained was 574,923 bp, the genome was 95.06% of the *B. gladioli* ATCC 10248 reference genome size (11), and the G+C content estimated for the draft genome sequence was 68.04%. Prokka 1.12 (12) and the Rapid Annotations using Subsystem Technology (RAST) Web server (13) identified the presence of 7,155 coding sequence (CDS) regions and 7,540 genes, 76 of them for tRNA and 1 for transfer-messenger RNA (tmRNA).

Genome Announc. 2018 Apr; 6(16): e00301-18. doi: [10.1128/genomeA.00301-18](https://doi.org/10.1128/genomeA.00301-18)

#### Formats:

Article | [PubReader](#) | [ePub \(beta\)](#) | [PDF \(132K\)](#) | [Citation](#)

#### Share

[Facebook](#) | [Twitter](#) | [Google+](#)

---

#### Save items

---

#### Similar articles in PubMed

Draft Genome Sequence of Broad-Spectrum Antifungal Bacterium *Burkholderia gladioli* Strain NGJ1, Isolat [Genome Announc. 2015]

Draft Genome Sequence of the Novel Enterobacter cloacae Strain amazonensis, a Highly Heavy Metal-Resistant [Genome Announc. 2018]

Comparative genome analysis of rice-pathogenic *Burkholderia* provides insight into capacity to adapt to di [BMC Genomics. 2015]

Draft genome of *Nocardia farcinica* TRH1, a linear and polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium [Braz J Microbiol. 2017]

Four additional cases of *Burkholderia gladioli* infection with microbiological correlates and review. [Clin Infect Dis. 1997]

[See reviews...](#)  
[See all...](#)

---

#### Links

[BioProject](#)

[Nucleotide](#)

[PubMed](#)

[Taxonomy](#)

---

#### Recent Activity

[Turn Off](#) [Clear](#)

 Draft Genome Sequence of *Burkholderia gladioli* Coa14, a Bacterium with Petroleum...

[See more...](#)

---

Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. [Bioinformatics. 2014]

CAP3: A DNA sequence assembly program. [Genome Res. 1999]

Complete genome sequences for 59 *Burkholderia* isolates, both pathogenic and near neighbor. [Genome Announc. 2015]

[See more...](#)

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5908936/>

## ***BIBLIOGRAFIA DE REFERÊNCIA***



## 8 - BIBLIOGRAFIA DE REFERÊNCIA

ACC. American Chemistry Concil. **n-Alkane Category: decane, undecane, dodecane**. Disponível em: <http://www.tera.org/Peer/VCCEP/n-alkanes/VCCEP%20n-Alkanes%20Submission%20Jun%2017%202004%20-%20revised.pdf>. Acesso em: setembro de 2017.

AKBAR, E.; YAAKOB, Z.; KAMARUDIN, S. K.; ISMAIL, M.; SALIMON, J. **Characteristic and Composition of Jatropha Curcas Oil Seed from Malaysia and its Potential as Biodiesel Feedstock**. European Journal of Scientific Research, v.29(3), p.396-403, 2009.

ALBERS, P.H. **Handbook of Ecotoxicology**. Boca Raton: Lewis Publishers, 2003.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. Segunda Edição. New York: Academic Press, 1999.

ALEXANDRE, F. A.; FARIA, J. A. F.; CARDOSO, C. F. **Avaliação da eficiência da radiação ultravioleta na esterilização de embalagens plásticas**. Ciência e Agrotecnologia, v.35(5), p.1524-1530, 2008.

ALIKHAN, N.; PETTY, N. K.; ZAKOUR, N. L. B.; BEATSON, S. A. **BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons**. Genomics, v.12(402), p.1-12, 2011.

ALMATAWAH, Q. **An indigenous biosurfactant producing *Burkholderia cepacia* with high emulsification potential towards crude oil**. Env. and Anal. Toxicology, 7(6), 1-6, 2017.

ALTMAN, C. R. et al. **The Metacyc Database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases**. Nucleic Acids Research, 42(1), pD459-D471, 2014.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. **Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs**. Nucleic Acids Res, v.25, p.3389-3402, 1997.

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

AMSA. Australian Marine Safety Authority. **Management and disposal of oil spill debris**. Disponível em: <https://www.amsa.gov.au/environment/national-plan/Supporting-Documents/documents/management-and-disposal-oil-spill-debris.pdf>. Acesso em: 09 outubro de 2017.

ANDREWS, S. **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data**. Disponível em: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Acesso em: 08 de julho de 2017.

ANP. **Boletim da produção de petróleo e gás natural**. ANP, 2014.

ANP. **Resolução nº125/2016**. ANP, 2016.

ARORA, P. K.; KUMAR, M.; CHAUHAN, A.; RAGHAVA, G. P. S.; JAIN, R. K. **OxDBase: a database of oxygenases involved in biodegradation**. BMC Research Notes, v.2(67), 1-8, 2009.

- ATAGANA, H. I. (2008). **Compost bioremediation of hydrocarbon- contaminated soil inoculated with organic manure.** African Journal of Biotechnology, v.7(10), p.1516-1525, 2008.
- ATLAS, R. M. **Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation.** Marine Pollution Bulletin, v.31(4-12), p.178-182, 1995.
- AZIZ, R. K. et al. **The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology.** BMC Genomics, v.9(75), p.1-15, 2008.
- BABU, M. et al. **A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair.** Molecula Microbiology v.79, p.484-502, 2011.
- BADEJO, A. C.; BADEJO, A. O; SHIN, K. H.; CHAI, Y. G. **A gene expression study of the activities of aromatic ring-cleavage dioxygenases in *Mycobacterium gilvum* PYR-GCK to changes in salinity and pH during pyrene degradation.** Plos One, v.8(2), p.1-8, 2013.
- BALASHOVA, N. V.; KOSHELEVA, I. A.; GOLOVCHENKO, N. P.; BORONIN, A. M. **Phenanthrene metabolism by *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains.** Process Biochemistry, v.35(3-4), p. 291-296, 1999.
- BALLAMINUT N.; MATHEUS, D. R. **Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation.** Brazilian Journal of Microbiology, v.38(2), p.248-252, 2007.
- BAMPUS, J.A. **Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*.** Applied Environmental Microbiolgy v.61, p.2631-2635, 1989.
- BARQUIST, L.; BURGE, S.; GARDNER, P. P. **Studying RNA homology and conservation with Infernal: from single sequences to RNA families.** Currents Protochol in Bioinformatics, v.54, p.1-37, 2016.
- BARR, D. **Biological methods for assessment and remediation of contaminated land: case studies.** Construction Industry Research and Information Association, London, 2002.
- BAYOUMI, R. A. **Bacterial Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Heavy Oil Contaminated Soil.** Journal of Applied Scienes Research, v.5(2), p.197-211, 2009.
- BHATTACHARYA, M.; GUCHHAIT, S.; BISWAS, D.; DATTA, S. **Waste lubricating oil removal in a batch reactor by mixed bacterial consortium: a kinetic study.** Bioprocess Biosyst. Eng. v.38, p.2095-2106, 2015.
- BRASIL, K. **Vazamento da Petrobrás no Amazonas atinge subafluente do rio Urucu.** Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/folha/cotidiano/ult95u32272.shtml>. Acesso em: julho de 2014.
- BREAKWELL, D.; McDONALDS, B.; WOOLVERTON, C.; SMITH, K.; ROBISON, R. **Colony Morphology Protocol.** American Society for Microbiology, p.1-7, 2007.
- BROOIJMANS, R. J. W.; PASTINK, M. I.; SIEZEN, R. J. **Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew.** Microbial Biotechnology, v.2(6), p.587-594, 2009.

BLACK, P. N.; DIRUSSO, C.C.; METZGER, A. K.; HEIMERT, T. L. **Cloning, sequencing, and expression of the fadD gene of Escherichia coli encoding acyl coenzyme A synthetase.** J. Biol. Chem, v.267, p.25513-25520, 1992.

BOEHM, P. D.; PAGE, D. S.; GILFILLAN, E. S.; BENCE, A. E.; BURNS, W. A.; MANKIEWICZ, P. J. **Study of the fates and effects of the Exxon Valdez oil spill on benthic sediments in two bays in Prince William Sound, Alaska. 1 Study, Design, Chemistry and Source Fingerprint.** Environ. Sci. Technol., v.32, p.567-576, 1998.

BOJES, H. K.; POPE, P. G. **Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas.** Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 47(3), p. 288-295, 2007.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. **Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data.** Bioinformatics, v.30(15), p.2114-2120, 2014.

BOLONNUY, V. **Formation of soil pollution area by oil when there is break of airtightness of main pipeline.** Metallurgical and Mining Industry, v.7, p.56-62, 2016.

BORONIN, A. M.; KOCHETKOV, V. V.; SKRYABIN, G. K. **Incompatibility groups of naphthalene degradative plasmids in Pseudomonas.** FEMS Microbiol. Lett., v.7, p.249-252, 1980.

BOUCHEZ, M.; BLANCHET, D.; VANDECASTEELE, J. P. **Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism.** Appl Environ Microbiol, v.43, p.156-164, 1995.

BROCCHIERI, L. **The GC Content of Bacterial Genomes.** Journal of Phylogenetics and Evolutionary Biology, v.2(1), p.1-3, 2014.

BROWN, D. M.; OKORO, S.; GILS, J. V.; SPANNING, R. V.; BONTE, M.; HUTCHINGS, T.; LINDEN, O.; EGBUCHE, U.; BRUUN, K. B.; SMITH, J. W. N. **Comparison of landfarming amendments to improve bioremediation of petroleum hydrocarbons in Niger Delta soils.** Science of the Total Environment, p.284-292, 2017.

BUCK, J. D. **Nonstaining (KOH) Method for Determination of Gram Reactions of Marine Bacteria.** Applied and Environmental Microbiology, v.44(4), p.992-993, 1982.

BURAIMOH, O. M.; OGUNYEMI, A. K.; IBRAHIM, N. H.; ADEBUSOYE, A. S. ; ILORI, M. O.; AMUND, O. O. **Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in polluted soil microcosm.** FE Journal of Science, v.19(2), p.303-313, 2017.

BURLAGE R. S.; HOOPER S. W.; SAYLER, G. S. **The TOL (pWW0) catabolic plasmid.** Applied Environmental Microbiology, v.55, p.1323-132, 1989.

CAMACHO, C.; COULOURIS, G.; RAYTSELIS, Y.; MADDEN, T. L.; AGARWALA, R.; SCHÄFFER, A. A. **Database indexing for production MegaBLAST searches.** Bioinformatics, v.15, p.1757-1764, 2008.

CARDENES, G. O. **Seleção e caracterização molecular de bactérias degradadoras de petróleo isoladas de amostras do Lago de Coari**. Monografia. Instituto de Saúde e Biotecnologia de Coari, Coari, 2014.

CARMO, M. R. **Análise morfotectônica da região entre Tefé e Coari, Amazonas**. 2010. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Geociências, Departamento de Geociências, Universidade Federal do Amazonas, 2010.

CARVER, T.; HARRIS, S. R.; BERRIMAN, M.; PARKHILL, J.; McQUILLAN, J. A.; **Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data**. *Bioinformatics*, v.28(4), p.469-469, 2012.

ÇEÇEM, F.; KOCAMEMI, B. A.; AKTAS, O. **Metabolic and co-metabolic degradation of industrially important chlorinated organics under aerobic conditions**. In: FATTA-KASSINOS; D.; BESTER, K.; KÜMMERER, K. *Xenobiotics in the Urban Water Cycle: Mass Flows, Environmental Processes, Mitigation and Treatment Strategies*. Springer, Ontario, 2010.

CEPEK, M. **The Loss of Oil: Constituting Disaster in Amazonian Ecuador**. *The Journal of Latin American and Caribbean Anthropology*, v.17(3), p.393-412, 2012.

CERNIGLIA, C.E. **Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons**. *Biodegradation*, v.3, p.351-368, 1992.

CHAILLANA, F.; LE FLÈCHE, A.; BURY, E.; PHANTAVONG, Y.; GRIMONT, P.; SALIOT, A.; OUDOT, J. **Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms**. *Research in Microbiology*, v.155(7), p.587-595, 2004.

CHAPMAN, P. J.; HOPPER, D. J. **The Bacterial Metabolism of 2,4-Xylenol**. *Biochemistry Journal*, v.110, p.491, 1968.

CHEVREUX, B.; WEVER, J.; HÖRSTER, A.; DLUGOSH, K. **Sequence assembly with MIRA 4. The definitive guide**. San Francisco, CA, USA, 2014.

CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C.; CHIKERE, B. O. **Bacterial diversity in a tropical crude oil-polluted soil undergoing bioremediation**. *African Journal of Biotechnology*, v.8(11), p.2535-2540, 2009.

CHIKERE, C.B.; CHIKERE, B.O.; OKPOKWASILI, G.C. **Bioreactor-based bioremediation of hydrocarbon-polluted Niger Delta marine sediment, Nigeria**. *Biotech* v.2, p.53-66, 2012.

CHO, K. S.; JUN, Y. S.; JUNG, D. J.; KIM, D.; LEE, E. Y.; LEE, T. H.; RYU, H. W. **Stenotrophomonas maltophilia t3-c, and method for bioremediation of oil contamination using the strain**. KR1020020015567, 2002.

CHO, K. S.; KIM, T. J.; PARK, J. W.; RYU, H. W. **Burkholderia cepacia 2a-12 and method for bioremediation of PAH contamination using the strain**. KR1020030066948, 2003.

CHOI, E. J.; JIM, H. M.; LEE, S. H.; MATH, R. K.; MADSEN, E. L.; JEON, C. O. **Comparative genomic analysis and Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and o-, m-, and p-Xylene (BTEX) degradation pathways of Pseudoxanthomonas spadix BD-a59**. *App. and Environ. Microbiology*,

v.19(2), p.663-671, 2013.

CHOROM, M.; SHARIF, H.S.; MUTAMEDI, H. **Bioremediation of a crude oil-polluted soil by application of fertilizers.** Iran J. Environ. Health Sci. Eng., v.7, p.319-326, 2010.

COATES, J. D. et al. **The ubiquity and diversity of dissimilatory (per)chlorate-reducing bacteria.** Appl. Environ. Microbiol., v.65, p.5234-5241, 1999.

COOLBAUGH, T. S.; CHOPRA, A. **Recent Technology Advances for Effective Oil Spill Response.** Society of Petroleum Engineers, p.1-21, 2017.

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

CORRÊA, G. G.; MALHÃO, T. A.; ASMUS, C. I. R. F.; COELI, C. M. **A socio-economic profile of exposed populations to petroleum exploration residues.** Revista Brasileira de Epidemiologia, v.14(3), p.372-385, 2011.

COENYE, T.; VANDAMME, P. **Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches.** Environmental Microbiology, v.5(9), p.719-729, 2003.

COENYE, T.; VANDAMME, P. **Burkholderia: Molecular Biology and Genomes.** Univerisiteit Gent. Gent, 2007.

CUEVA-MÉNDEZ, G.; PIMENTEL, B. **Gene and cell survival: lessons from prokaryotic plasmid R1.** EMBO, v.8(5), p.458-464, 2007.

CUZZI, B.; HERASIMENKAL, Y.; SILIPO, A.; LANZETTA, R.; LIUT, G.; RIZZO, R.; CESCUTTI, P. **Versatility of the *Burkholderia cepacia* Complex for the Biosynthesis of Exopolysaccharides: A Comparative Structural Investigation.** Plos One, 2014.

COSTA, J. G. **Degradação de bifenilos policlorados (PCBs) e ácidos clorobenzóicos por bactérias aeróbias isoladas de ambientes contaminados.** Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

DADRASNIA, A; AGAMUTHU, P. **Potential biowastes to remediate diesel contaminated soils.** Global NEST Journal, v.15(4), p.474-484, 2013.

DAUB, J.; GARDNER, P. P; TATE, J.; RAMSKÖLD, D.; MANSKE, M.; SCOTT, W. G.; WEINBERG, Z.; GRIFFTHS-JONES, S.; BATEMAN, A. **The RNA WikiProject: Community annotation of RNA families.** v.14, p.2462-2464, 2008.

DARLING, A. C. E.; MAU, B.; BLATTNER, F. R.; PERNA, N. T. **Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements.** Genome Research, v.14(7), p.1394-1403, 2004.

DAS, N.; P. CHANDRAN. **Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview.** Biotechnology Research International, p.1-13, 2011.

DATE, A. W. **Analytic Combustion.** Cambrid, 2011.

- DAVIES, J.; DAVIES, D. **Origins and Evolution of Antibiotic Resistance.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, v.74(3), p.417-433, 2010.
- DEMANÈCHE, S.; MEYER, C.; MICOUD, J.; LOUWAGIE, M.; WILLISON, J. C.; JOUANNEAU, Y. **Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a *Sphingomonas* strain that degrades various Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.** App. and Environm. Micorbiology, v.70(11), 6714-6725, 2004.
- DENEF, V. J.; PARK, J.; TSOI, T. V.; ROUILLARD, J. M.; ZHANG, H.; WIBBENMEYER, A. J.; VERSTRAETE, W.; GULARI, E.; HASHSHAM, S. A.; TIEDJE, J. M. **Biphenyl and Benzoate Metabolism in a Genomic Context: Outlining Genome-Wide Metabolic Networks in *Burkholderia xenovorans* LB400.** Appl. Environ. Microbiol., v.70(8), p.4961-4970, 2004.
- DENG, L.; REN, Y.; WEI, C. **Pyrene degradation by *Pseudomonas* sp. and *Burkholderia* sp. enriched from coking wastewater sludge.** Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic / Hazardous Substances and Environmental Engineering, v.47(13), p.1984-1991, 2012.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. **Microbial production of surfactants and their commercial potential.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. v.61, p.47-64, 1997.
- DOUGLAS, G. S.; PRINCE, R. C.; BUTLER, E. L.; STEINHAUER, W. G. **The use of internal chemical indicators in petroleum and refined products to evaluate the extent of biodegradation.** In: HINCHEE, R. E.; MILLER, R. N.; HOEPEL, R. E. Hydrocarbon Bioremediation. Lewis Publisher, Boca Ratón, p.219-241, 1994.
- DOUMENQ, P.; ARIES, E.; ASIA, L.; ARTAUD, J.; GILEWICS, M.; MILLE, G.; BERTRAND, G. C. **Influence of n-alkanes and petroleum on fatty acid composition of a hydrocarbonoclastic bacterium: *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* strain 617.** Chemosphere, v.44(4), p.519-528, 2001.
- DOWTY, R. A.; SHAFFER, G. P.; HESTER, M. W.; CHILDERS, G. W.; CAMPO, F. M. GREENE, M. C. **Phytoremediation of small-scale oil spills in fresh marsh environments: a mesocosm simulation.** Mar. Environ. Res. v. 52, p. 195-211, 2001.
- EBERL, L.; VANDAMME, P. **Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys.** F1000Research, v.5(107), p.1-10, 2016.
- EGGINK, G.; ENGEL, H.; MEIJER, W. G.; OTTEN, J.; KINGMA, J.; WITHOLT, B. **Alkane utilization in *Pseudomonas oleovorans*. Structure and function of the regulatory locus alkR.** Journal of Biology and Chemistry, v.263, p.13400-13405, 1988.
- ERIKSSON, M.; DALHAMMAR, G.; MOHN, W. W. **Bacterial growth and biofilms production on pyrene.** FEMS Microbiology Ecology, v.40, p.21-27, 2002.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. **Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error Probabilities.** Genome Research, v.8, p.186-194, 1998.
- EWING, B.; GREEN, P. **Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy Assessment.** Genome Research, v.8, p.175-185, 1998.

FARAG, S.; SOLIMAN, N. A. **Biodegradation of crude petroleum oil and environmental pollutants by *Candida tropicalis* strain.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v.54(4), p.821-830, 2011.

FATHEPURE, B. Z. **Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments.** Frontiers in Microbiology, v.5, p.173, 2014.

FERRANDEZ, A.; MINAMBRES, B.; GARCIA, B.; OLIVERA, E.R.; LUENGO, J.M.; GARCIA, J.L.; DIAZ, E. **Catabolism of phenylacetic acid in *Escherichia coli*. Characterization of a new aerobic hybrid pathway.** J. Biol. Chem. v.273, p.25974-86 1998.

FENG, L. et al. **Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. v.104, p.5602-5607, 2007.

FENNEWALD, M.; BENSON, S.; OPPICI, M.; SHAPIRO, J. **Insertion element analysis and mapping of the *Pseudomonas* plasmid alk regulon.** Journal of Bacteriology, v.139, p.940-952, 1979.

FETZNER, S. **Ring-Cleaving Dioxygenases with a Cupin Fold.** App. Environ. Microbiology, v.78(8), p.2505-2514, 2012.

FILHO, A. V. **O Brasil no contexto energético mundial.** NAIPPE/USP, São Paulo, 2009.

FIRMINO, P. I. M.; FARIAS, R. S.; BARROS, A. N.; BUARQUE, P. M. C.; RODRÍGUEZ, E.; LOPES, A. C.; dos SANTOS, A. B. **Understanding the anaerobic BTEX removal in continuous-flow bioreactors for ex situ bioremediation purposes.** Chem. Eng. J. v.281, p.272-280, 2015.

FREIJE, A. M. **Heavy metal, trace element and petroleum hydrocarbon pollution in the Arabian Gulf: Review.** Journal of Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences v.17, p.90-100, 2015.

FREVERT, J.; KINDL, H. **Purification of Glyoxysomal Acetyl-CoA Acyltransferase.** De Gruyter, v.361(5), p.537-542, 1980.

FRUTOS, F. J. G.; ESCOLANO, O.; GARCÍA, S.; MAR BABÍN, M.; FERNÁNDEZ, M.D. **Bioventing remediation and ecotoxicity evaluation of phenanthrene-contaminated soil.** J. Hazard Mater v.183, p.806-813, 2010.

FOGHT, J.; SEMPLE, K.; WESTLAKE, D. W.; BLENKINSOPP, S.; SERGY, G.; WANG, Z.; FINGAS, M. **Development of a standard bacterial consortium for laboratory efficacy testing of commercial freshwater oil spill bioremediation agents.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 21(6), p. 322-330, 1998.

FONDI M., RIZZI E., EMILIANI G. **The genome sequence of the hydrocarbon-degrading *Acinetobacter venetianus* VE-C3.** Research in Microbiology, v.164(5), p.439-449, 2013.

FUENMAYOR, S. L. ; WILD, M.; BOYES, A. L.; WILLIAMS, P. A. **A Gene Cluster Encoding Steps in Conversion of Naphthalene to Gentisate in *Pseudomonas* sp. Strain U2.** Journal of Bacteriology, v.180(9), p.2522-2530, 1998.

FORTIN, J.; JURY, W. A.; ANDERSON, M. A. **Enhanced removal of trapped non-aqueous phase liquids from saturated soil using surfactant solutions.** J. Contam. Hydrol., v.24, p.247-267, 1997.

FUJISAWA, H.; HAYAISHI, O. **Protocatechuate 3,4-dioxygenase. I. Crystallization and characterization.** J. Biol. Chem., v.243, p.2673-81, 1968.

GAILLARD, M.; VALLAEYS, T.; VORHOLTER, F. J. et al. **The clc element of Pseudomonas sp. strain B13, a genomic island with various catabolic properties.** J. Bacteriol, v.188, p.1999-2013, 2006.

GAUTHIER, M. J.; LAFAY, B.; CHRISTEN, R. **Marinobacter hydrocarbonoclasticus gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium.** International Journal of Systematic Bacteriology, v.42(4), p.568-576, 1992.

GKOREZIS, P. et al. **The Interaction between Plants and Bacteria in the Remediation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective.** Front Microbiol, v.7, p.1836, 2016.

GENOVESE, M.; DENARO, R.; CAPPELLO, S.; DI MARCO, F.; LA SPADA, G.; GIULLIANO, L.; GENOVESE, L.; YAKIMOV, M. M. **Bioremediation of benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes-contaminated soil: a biopile pilot experiment.** Journal of Applied Microbiology, v.105(5), p.1694-1702, 2008.

GENTLEMEN, R. **The R Project for Statistical Computing.** Disponível em: <https://www.r-project.org/>, Acesso em: Agosto de 2016.

GIBSON, J.; HARWOOD, C. S. **Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes.** Ann. Rev. Microbiol., v.56, p.345-369, 2002.

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.

GODHEJA, J.; DIXIT, K.; SHARMA, P. **Diversity, activity, antibiotic and heavy metal resistance of bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated soils located in different sites.** Rec. Res. in Science and Technology, v.6(1), p.263-267, 2014.

GOOGLE. **Google Earth.** Version X. 2017. Disponível em: <https://www.google.com/earth/download/ge/>. Acesso em: 01 de Agosto de 2017.

GOLDEMBERG, J.; LUCON, O. **Energia e meio ambiente no Brasil .** Estudos Avançados, v. 21 (59), p. 7-20, 2007.

GRADOVA, N. B.; GORNOVA, I. B.; EDDAUDI, R.; SALINA, R. N. **Use of Bacteria of the Genus Azotobacter for Bioremediation of Oil-Contaminated Soils.** Applied Biochemistry and Microbiology, v.39(3), p.279-281, 2003.

GRIFFITHS-JONES, S.; BATEMAN, A.; MARSHALL, M.; KHANNA, A.; EDDY, S. R. **Rfam: an RNA family database.** Nucleic Acids Research, v.31(1), p.439-441, 2003.

GRIFFITHS-JONES, S.; MOXON, S.; MARSHALL, M.; KHANNA, A.; EDDY, S. R. BATEMAN, A. **Rfam: annotating non-coding RNAs in complete genomes.** Nucleic Acids Research,

v.33(Database Issue), p.d121-d124, 2005.

GROSS, S. R.; GAFFORD, R. D.; TATUM, E. L. **The metabolism of protocatechuic acid by *Neurospora***. *J. Biol. Chem.*, v.219, p.781-96, 1956.

GUNSALUS, I. C.; GRUND, A.; YEN; K. M. **Aromatic oxygenation, genetics and regulation**. In: NOZAKI M; YAMAMOTO S; ISHIMURA Y; COON MJ; ERNSTER L; EASTBROOK, R.W. *Oxygenases and oxygen metabolism*. Academic Press, London, p.79-91, 1982.

GURAV, R.; LYU, H.; MA, J.; TANG, J.; LIU, Q.; ZHANG, H. **Degradation of n-alkanes and PAHs from the heavy crude oil using salt-tolerant bacterial consortia and analysis of their catabolic genes**. *Environ. Scie. Pollut. Res.*, v.24(12), p.11392-11403, 2017.

GUTHEIL, W.G.; HOLMQUIST, B.; VALLEE, B.L. **Purification, characterization, and partial sequence of the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*: a class III alcohol dehydrogenase**. *Biochemistry*, v.31, p.475-81, 1992.

GUZIK, U.; HUPERT-KOCUREK, K.; KRYSIAK, M.; WOJCIESZŃSKA, D. **Degradation Potential of Protocatechuate 3,4-Dioxygenase from Crude Extract of *Stenotrophomonas maltophilia* Strain KB2 Immobilized in Calcium Alginate Hydrogels and on Glyoxyl Agarose**. *BioMed Research International*, v.2014, p.1-8, 2014.

HAFT D. H. et al. **RefSeq: an update on prokaryotic genome annotation and curation**. *Nucleic. Acids. Res.*, v. 4(46), p.D851-D860, 2018.

HALEYUR, N; SHAHSAVARI, E.; MANSUR, A. A.; KOSHLAF, E.; MORRISON, D.; OSBORN, M.; BALL, A. S. **Comparison of rapid solvent extraction systems for the GC-MS/MS characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in aged, contaminated soil**. *MethodsX*, v. 3, p.364-370, 2016.

HASMAN, H.; SAPUTRA, D.; SICHERITZ-PONTÉN, T.; LUND, O.; SVENDESEN, C. A.; FRIMODT-MOLLER, N.; AARESTRUP, F. M. **Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples**. *Journal of Clin Microbiology*, v.52(1), p.139-146, 2014.

HASSLER, B. **Accidental versus operational oil spills from shipping in the Baltic Sea: risk governance and management strategies**. *AMBIO*, v.40, p.170-178, 2011.

HAURWITZ, R.E.; STERNBERG, S.H.; DOUDNA, J.A. **Csy4 relies on an unusual catalytic dyad to position and cleave CRISPR RNA**. *EMBOSS Journal* v.31, p.2824-32, 2012.

HAZEN, T. C. et al. **Deep-Sea Oil Plume Enriches Indigenous Oil-Degrading Bacteria**. *Science*, v.330(6001), p.204-208, 2010.

- HEAD, M. I.; SWANNELL, R. P. J.; **Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats.** Environmental Biotechnology, v. 10, p. 234-239, 1999.
- HEIDELBERG, J. F et al. **The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough.** Nature Biotechnology, v.22(5), p.554-559, 2004.
- HÖHENER, P.; PONSIN, V. **In situ vadose zone bioremediation.** Curr. Opin. Biotechnol v.27, p.1-7, 2014.
- HOOD, A.; GUTJHAR, C. C.; HEACOCK, R. L. **Organic Metamorphism and the Generation of Petroleum.** AAPG Bulletin, v.59(6), p.986-996, 1975.
- HSE. Health and Safety Executive. **The Approved List of biological agents.** 2013. Disponível em: <http://www.hse.gov.uk/pubns/misc208.pdf>. Acesso em: Março de 2014.
- HU, C.; MÜLLER-KARGER, F. E.; TAYLOR, C.; MYHRE, D.; MURCH, B.; ODRIOZOLA, A. L.; GODOY, G. **MODIS detects oil spills in Lake Maracaibo, Venezuela.** EOS, v.84(33), p. 313-319, 2003.
- HUANG, X.; MADAN, A.; **CAP3: A DNA Sequence Assembly Program.** Genome Research, v.9, p.868-877, 1999.
- HUDZICKI, J. **Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol.** American Society for Microbiology, p.1-23, 2016.
- HUETTEL, M.; RUSCH, A. **Transport and degradation of phytoplankton in permeable sediment.** Limnology and Oceanography v.45, p.534-549, 2000.
- IHAKA R AND GENTLEMAN R. **R: A Language for Data Analysis and Graphics.** Journal of Computational and Graphical Statistics, v.5(3), p.299-314, 1996.
- JOHNSON, S. L. et el. **Complete Genome Sequences for 59 Burkholderia Isolates, Both Pathogenic and Near Neighbor.** Genome Announcements, v.3(2), p.1-3, 2015.
- JORGENSEN, K. S.; PUUSTINEN, J.; SUORTTI, M. **Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles.** Environmental Pollution, v.107(2), p.245-254, 2000.
- JUHASZ A. L.; NAIDU, R. **Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene.** Biodeterior Biodegrad v.45, p.57-88, 2000.
- JUHASZ, A. L.; Britz, M.L.; Stanley, G.A. **Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene and dibenz[a,h]anthracene by *Burkholderia cepacia*.** Journal of Applied Microbiology, v.83(2), p.189-198, 1997.
- KA, J. O.; YU, Z.; MOHN, W. W. **Monitoring the size and metabolic activity of the bacterial community during biostimulation of fuel-contaminated soil using competitive PCR and RT-PCR.** Microb. Ecol., v.42, p.267-273, 2001.
- KACHIENG'A, L.; MOMBA, M. N. B. **Kinetics of petroleum oil biodegradation by a**

**consortium of three protozoan isolates (*Aspidisca* sp., *Trachelophyllum* sp. And *Peranema* sp.).** Biotechnol Rep (Amst), v.15, 2017.

KACZOREK, E.; JESIONOWSKI, T.; GIEC, A.; OLSZANOWSKI, A. **Cell surface properties of *Pseudomonas stutzeri* in the process of diesel oil biodegradation.** Biotechnology Letters v.34(5), p.857–862, 2012.

KANEHISA, M.; GOTO, S. **KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes.** Nuclei Acids Research, v.1(28), p.27-30, 2000.

KANEHISA, M.; SATO, Y; KAWASHIMA, M.; FURUMICHI, M.; TANABE, M.; **KEGG as a reference resource for gene and protein annotation.** Nuclei Acids Research, v.45(D1), p.D457-D462, 2016.

KANEHISA, M.; SATO, Y; FURUMICHI, M.; TANABE, M.; MORISHIMA, K. **KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs.** Nuclei Acids Research, v.45(D1), p.D353-D361, 2017.

KANEHISA, M.; SATO, Y; MORISHIMA, K. **BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences.** Journal of Molecular Biology, v.428(4), p.726-731, 2016.

KANG, H.; HWANG, S. Y.; KIM, Y. M.; KIM, E.; KIM, Y. S.; KIM, S. K.; KIM, S. W.; CERNIGLIA, C. E.; SHUTTLEWORTH, K. L.; ZYLSTRA, G. J. **Degradation of phenanthrene and naphthalene by a *Burkholderia* species strain.** Canadian Journal of Microbiology, v.49(2), p.139-144, 2003.

KAO, C. M.; CHEN, C. Y.; CHEN, S. C.; CHIEN, H. Y.; CHEN, Y. L. **Application of in situ biosparging to remediate a petroleum- hydrocarbon spill site: field and microbial evaluation.** Chemo- sphere v.70, p.1492-1499, 2008.

KARAMALIDIS, A.K.; EVANGELOU, A.C.; KARABIKA, E.; KOUKKOU, A.I.; DRAINAS, C.; VOUDRIAS, E.A. **Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain Spet.** Bioresource Technology v.101, p.6545-6552, 2010.

KASAI, Y.; INOUE, J.; HARAYAMA, S.; **The TOL Plasmid pWW0 xylN Gene Product from *Pseudomonas putida* Is Involved in m-Xylene Uptake.** Journal of Bacteriology, v.183(22), p.6662-6666, 2001.

KHAVARI-KHORASANI, G.; DOLSON, J. C.; MICHELSEN, J. K. **The factors controlling the abundance and migration of heavy versus light oils, as constrained by data from the Gulf of Suez. Part I. The effect of expelled petroleum composition, PVT properties and petroleum system geometry.** Organic Geochemistry, v.29, p.255-282, 1998.

KEITH, L. M. **Isolation and Characterization of *Burkholderia gladioli* from Orchids in Hawaii.** Plant Disease, v.89(12), p.1273-1278, 2005.

KENNEDY, M. P. et al. ***Burkholderia gladioli*: Five year experience in a cystic fibrosis and lung transplantation center.** Journal of Cystic Fibrosis, v.6, p.267-273, 2007.

KIM, J.J.; WANG, M.; PASCHKE, R. **Crystal structures of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase from pig liver mitochondria with and without substrate.** Proc Natl Acad Sci U S A v.90, p.7523-7527, 1993.

KISSIN, Y.V. **Catagenesis and composition of petroleum: Origin of n-alkanes and isoalkanes in petroleum crudes.** Geochimica et Cosmochimica Acta, v.51(9), p.2445-2457, 1987.

KOK, M.; OLDENHUIS, R.; VAN DER LINDEN, M. P.; MEULENBERG, C. H.; KINGMA, J.; WITHOLT, B. **The Pseudomonas oleovorans alkBAC operon encodes two structurally related rubredoxins and an aldehyde dehydrogenase.** Journal of Biology and Chemistry, v.264, p.5442-5451, 1989.

KOSHLAF, E.; BALL, A. S. **Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments.** Aims Microbiology, v3(1), p.25-49, 2017.

KUMAR, S.; VIKRAM, S.; RAGHAVA, G. P. S. **Genome Annotation of Burkholderia sp. SJ98 with Special Focus on Chemotaxis Genes.** Plos One, v.8(8), p.1-8, 2013.

KUMAR, M.; SINGH, M. P.; DUA, H. K.; KAGDIYAL, V.; SARPAL, A. S.; CHHATWAL, V. K.; MALHOTRA, R. K.; KUMAR, A. **Method for bioremediation of highly aromatic hydrocarbon wastes.** US20100274069A1, 2009.

KURTZ, S. S.; HEADINGTON, C. E. **Analisis of Light Petroleum Fractions.** Ind. Eng. Chem. An., v.9(1), p.21-25, 1937.

LAND, M. et al. **Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. Funcional and Integrative Genomics,** v.15(2), p.141-161, 2015.

LARSEN, M. V. et al. **Benchmarking of methods for genomic taxonomy.** Journal of Clinic Microbiology, v.52(5), p.1529-1539, 2014.

LAWS, E. A. **Aquatic Pollution: an introductory text.** Third Edition. John Willey and Sons, Inc., New York, 2000.

LĂZĂROAIE, M. M. **Multiple responses of Gram-positive and Gram-negative bacteria to mixture of hydrocarbons.** Brazilian Journal of Microbiology, v.41, p.649-667, 2010.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. **Microbial degradation of hydrocarbons in the environment.** Microbiological Reviews, v. 54(3), p.305-315, 1990.

LESSIE, G. L.; HENDRICKSON, W.; MANNING, B. D.; DEVEREUX, R. **Genome complexity and plasticity of Burkholderia cepacia.** Microbiol Lett, v.144, p. 117-128, 1996.

LIMA, C .A. **Quantificação do decréscimo de risco Associado biorremediação de um solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo.** Tese de Doutorado, UFRJ/EQ, Rio de Janeiro, 2004.

LIN, Q.; MENDELSSOHN, I. A. **A comparative investigation of the effects of South Louisiana Crude oil on the vegetation of fresh, brackish, and salt marshes.** Marine Pollution Bulletin, v.32,

p.202-209, 1996.

LIN, T.; PANB, P.; CHENG, S. **Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil.** Journal of Hazardous Materials, v.176, p.27-34, 2010.

LYNEN, F; OCHOA, S. **Enzymes of fatty acid metabolism.** Bioch. Biophys. Acta. v.12(1-2), p.299–314, 1953.

MABERY, C. F. **Solubility of the Petroleum Hydrocarbons.** Ind. Eng. Chem. v.16(9), p. 937-939, 1924.

MAHON, C. R.; MANUSELIS, G. Jr. **Textbook of diagnostic microbiology.** Saunders Co., Philadelphia, 1997.

MAENG, J. H. O.; SAKAI, Y.; TANI, V.; KATO, N. **Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of n-alkane oxidation in Acinetobacter sp. strain M-1.** Journal of Bacteriology, v.178(13), p.3695-3700, 1996.

MAHENTHIRALINGAM, E.; URBAN, T. A.; GOLDBERG, J. B. **The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex.** Nature Reviews Microbiology v.3, p.144–156, 2005.

MAIER, R. M.; SOBERON-CHAVEZ, G. **Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications.** Appl. Microbiol. Biotechnol., v.54, p.625-633, 2000.

MAILA, M. P. ; CLOETE, T. E. **Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages?** Reviews in Environmental Science and Bio / Technology, v.3, p.349-360, 2004.

MAKAROVA, K. S. et al. **Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics.** Microbiology and Molecular Biology Review, v.65, p.44–79, 2001.

MARLOWE, E. M.; WANG, J. M.; PEPPER, I. L.; MAIER, R. M. **Application of a reverse transcription-PCR assay to monitor regulation of the catabolic nahAc gene during phenanthrene degradation.** Biodegradation, v.13(4), p.251-60, 2002.

MARSHALL, A.G.; RODGERS, R.P. **Petroleomics: The Next Grand Challenge for Chemical Analysis.** Accounts of Chemical Research, v.37(1), p.53-59, 2004.

MATH, R. K.; JIN H. M.; KIM, J. M.; HAHN, Y.; PARK, W.; MADSEN, E. L.; JEON, C. O. **Comparative genomics reveals adaptation by *Alteromonas* sp. SN2 to marine tidal-flat conditions: cold tolerance and aromatic hydrocarbon metabolism.** PLoS One v.7, p.e35784, 2012.

MÁTHÉ, I. et al. **Diversity, activity, antibiotic and heavy metal resistance of bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated soils located in Harghita County (Romania).** Internacional Deterioration and Biodegradation, v.73, p.41-49, 2012.

MATHIS, M. J. **Compositions and methods for waste remediation.** US20130196420, 2013.

MATHIYAZHAGAN, N. **Amplification of biosurfactant gene (rhlB) from *Pseudomonas aeruginosa* isolated form oil contaminated soil.** International Journal of Pharma and Bio Sciences, v2(1). p.497-504, 2011.

MATSUOKA, H.; HIROOKA K.; FUJITA, Y. **Organization and function of the YsiA regulon of *Bacillus subtilis* involved in fatty acid degradation.** J. Biol. Chem. v.282, p.5180-94, 2007.

McCAIN, B. B.; HODGINS, H. O.; GRONLUND, W. D.; HAWKES, J. W.; BROWN, D. W.; MYERS, M. S.; VANDERMEULEN, J. H. **Bioavailability of Crude Oil from Experimentally Oiled Sediments to English Sole (*Parophrys vetulus*), and Pathological Consequences.** Journal of the Fisheries Research Board of Canada, v.35(5), p.657-664, 2011.

MCDONALD, I. R.; MIGUEZ, C. B.; ROGGE, G.; BOURQUE, D.; WENDLANDT, K. D.; GROLEAU, D.; MURRELL, J. **Diversity of soluble methane monooxygenase-containing methanotrophs isolated from polluted environments.** FEMS Microbiology Letters, v.255(2), p. 225-232, 2006.

MIJUS, B.; JONKER, M. T. O. **Evaluation of clean-up agents for total petroleum hydrocarbon analysis in biota and sediments.** Journal of Chromatography A, v.23(3), p.5182-5189, 2009.

MINERDI, D.; ZGRABLIC, I.; SADEGHI, S. J.; GILARDI, G. **Identification of a novel Baeyer-Villiger monooxygenase from *Acinetobacter radioresistens*: close relationship to the *Mycobacterium tuberculosis* prodrug activator EtaA.** Microbial Biotechnology, v.5(6), p.700-716, 2012.

MIYATA, N.; IWAHORI, K.; FOGHT, J. M.; GRAY, M. R. **Saturable, energy-dependent uptake of phenanthrene in aqueous phase by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135.** Applied and Environmental Microbiology, v.70, p.363-369, 2004.

MORIYA, Y.; ITOH, M.; OKUDA, S.; YOSHIKAWA, A.; KANEHISA, M. **KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server.** Nucleic. Acids Res., v.35, p.W182-W185, 2007.

MORGULIS, A.; COULOURIS, G.; RAYTSELIS, Y.; MADDEN, T. L.; AGARWALA R.; SCHÄFFER, A. A. **"Database indexing for production MegaBLAST searches."** Bioinformatics, v.15, p.1757-1764, 2008.

MUELLER J. G.; DEVEREUX R.; SANTAVY D. L.; LANTZ S. E.; WILLIS S. G.; PRITCHARD P. H. **Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from physiologically diverse soils.** Antonie Leeuwenhoek, v.71, p.329-343, 1997.

NAKANO, M. M.; ZUBER, P. **Mutational analysis of the regulatory region of the *srfA* operon in *Bacillus subtilis*.** Journal of Bacteriology, v.175(10), p.31883191, 1993.

NANDAKUMAR, R.; RUSH, M. C. **Association of *Burkholderia glumae* and *B. Gladioli* with Panicle Blight Symptoms on Rice in Panama.** Plant Disease, v.91(6), p.767, 2007.

NANDAKUMAR, R. et al. ***Burkholderia glumae* and *B. Gladioli* Cause Bacterial Panicle Blight in Rice in the Southern United States.** Plant Disease, v.93(9), p.896-905, 2009.

NAYAK, A. S.; SANJEEV, K. S.; SANTOSH, K. M.; ANJANEYA, O.; KAREGOUDAR, T. B. **A catabolic pathway for the degradation of chrysene by Pseudoxanthomonas sp. PNK-04.** FEMS Microbiol. Lett. v.320, p.128 -134, 2011.

NAWROCKI, E. P.; BURGE, S. W.; BATEMAN, A.; DAUB, J.; EDERHARDT, R. Y.; EDDY, S. R.; FLODEN, E. W.; GARDNER, P. P.; JONES, T. A.; TATE, J.; FINN, R. D. **Rfam 12.0: updates to the RNA families database.** Nucleic Acids Research, v.43, p.D130-D137, 2015.

NAWROCKI, E. P.; EDDY, S. R. **Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches.** Bioinformatics, v.29(22), p.2933-2935, 2013.

NCBI Resource Coordinators. **Database resources of the National Center for Biotechnology Information.** Nuclei Acids Research, v.44, p.D7-D19, 2016.

NCBI. NCBI Resource Coordinators. **Burkholderia gladioli pv. gladioli strain: KACC11889 Genome sequencing and assembly.** Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/3602?genome\\_assembly\\_id=322377](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/3602?genome_assembly_id=322377). Acesso em: 2 de agosto de 2017.

NCBI NCBI Resource Coordinators. **Burkholderia gladioli pv. gladioli. Database for Reference Grade Microbial Sequences (FDA-ARGOS).** Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/3602?genome\\_assembly\\_id=333426](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/3602?genome_assembly_id=333426). Acesso em: 2 de agosto de 2017.

NELSON, K. E. et al. **Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile Pseudomonas putida KT2440.** Environmental Microbiology v.4(12), p.799–808, 2002.

NESATY, V. J.; SUTER, M. J. F. **Analysis of environmental stress response on the proteome level.** Mass Spectrometry Reviews, v.27, p.556-574, 2008.

NEU, T. R. **Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces.** Microbiology Reviews, v.60, p.151-166, 1996.

NIE, Y., TANG, Y. Q., LI, Y., CHI, C. Q., CAI, M., AND WU, X. L. **The genome sequence of Polymorphum gilvum SL003B-26A1(T) reveals its genetic basis for crude oil degradation and adaptation to the saline soil.** PLoS ONE v.7, p.e31261, 2012.

NIERMAN et al. **Structural flexibility in the Burkholderia mallei genome.** Proceedings of the National Academy os Sciences, v. 101(39), p. 14246-14251, 2004.

NIKOLOPOULOU, M.; PASADAKIS N.; NORF H. ; KALOGERAKIS, N. **Enhanced ex situ bioremediation of crude oil contaminated beach sand by supplementation with nutrients and rhamnolipids.** Marine Pollution Bulletin, v. 77, p. 37-44, 2013.

NOORDMAN, W. H. et al. **The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by Pseudomonas aeruginosa varies with substrate availability.** J. Biotechnol., v.94, p.195-212, 2002.

NYSSÖNEN, M. **Functional genes and gene array analysis as tools for monitoring hydrocarbon biodegradation.** Tese de Doutorado, Faculty of Biosciences, University of Helsinki,

Finland, 2009.

O'SULLIVAN, L.A.; MAHENTHIRALINGAM, E. **Biotechnological potential within the genus *Burkholderia***. Letters in Applied Microbiology, v.41(1), p.8-11, 2005.

OKERENTUGBA, P. O.; EZERONYE, O. U. **Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria**. African Journal of Biotechnology, v.2(9), p.288-292, 2003.

ÖSTERREICHER-CUNHA, P. et al. **Evaluation of bioventing on a gasoline-ethanol contaminated undisturbed residual soil**. Journal of Hazardous Materials, v.110, p.63-76, 2004.

PAINE, R. T. et al. **Trouble on oiled waters: lessons from Exxon Valdez oil spill**. Annual Review Ecology System, v.27, p.197-235, 1996.

PAMPANIN, D. M.; SYDNES, M. O (2013). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons a Constituent of Petroleum: Presence and Influence in the Aquatic Environment. Disponível em: <https://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/41885.pdf>. Acesso em : setembro de 2017.

PATHAK, A.; GREEN S. J.; OGRAM, A.; CHAUHAN, A. **Draft Genome Sequence of *Rhodococcus opacus* strain M213 Shows a Diverse Catabolic Potential**. Genome Announc., v.1(1), p.e00144-12, 2013.

PATEL, V.; CHETURVEDULA, S.; MADAMWAR, D. **Phenanthrene degradation by *Pseudoxanthomonas* sp. DMVP2 isolated from hydrocarbon contaminated sediment of Amlakhadi canal, Gujarat, India**. J. Hazard. Mater, v.201-202, p.43-51, 2012.

PAUDYN K.; RUTTER, A.; ROWE, R. K.; POLAND, J. S. **Remediation of hydrocarbon contaminated soils in the Canadian Arctic by landfarming**. Cold. Reg. Sci. Technol. v.53, p.102-114, 2008.

PEIXOTO, R. S.; ROSADO, A. S.; TAKETANI, R. G. **Bioprospeção da diversidade microbiana cultivável e não cultivável**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Microbiologia Ambiental. 2a Ed. Embrapa Meio Ambiente, 2008.

PEIXOTO, R. S.; VERMELHO, A. B.; ROSADO, A. S. **Petroleum-Degrading Enzymes: Bioremediation and New Prospects**. Enzyme Research, v.2011, p.1-8, 2011

PELLIZARI, V. H. 1995. **Aspectos moleculares e fenotípicos de bactérias isoladas do ambiente e envolvidas na biodegradação de bifenilos policlorados – PCBs**. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

PERERA, J. R. A.; GIL, E. R.; SANTANA, A. F. **Farmacodivulgación: cefalosporinas**. Revista Cubana de Farmacologia, v.35(3), p.219-224, 2001.

PERPETUO, E. A.; SOUZA, C. B.; NASCIMENTO, C. A. O. **Engineering Bacteria for Bioremediation**. In: Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications. InTech, 2011.

PERIN, L.; ARAÚJO, J. L. S.; REIS, V. M. **O gênero Burkholderia: um importante componente da comunidade microbiana.** Seropédica. Embrapa Agrobiologia, Rio de Janeiro, 2006.

PETROBRAS. **Balço social e ambiental, 2007.** Petrobras, 2007.

PETROBRAS. **Blog fatos e fotos, 2016.** Disponível em: <http://www.petrobras.com.br/fatos-e-dados/urucu-completamos-30-anos-na-amazonia-com-gestao-responsavel.htm>. Acesso em: 10 de agosto de 2017.

PETROBRAS. **Coari Terminal – ORSOL I and II Pipelines.** Disponível em: <http://www.petrobras.com.br/en/our-activities/main-operations/terminals-and-pipelines/coari-terminal-orsol-i-and-ii-pipelines.htm>. Acesso em: 10 de agosto de 2017.

PETTERSON, C. H. **The “Exxon Valdez” oil spill in Alaska: Acute, indirect and chronic effects on the ecosystem.** Advances in Marine Biology, v.39, p1-103, 2001.

PHILP, J.C.; ATLAS, R.M. **Bioremediation of contaminated soils and aquifers.** In: ATLAS R.M; PHILP J.C. Bioremediation: applied microbial solutions for real-world environmental cleanup. American Society for Microbiology Press, p. 139-236, 2005.

PIEPER, D. H.; REINEKE, W. **Engineering bacterial for bioremediation.** Current Opinion in Biotechnology, v.11, p.262-270, 2000.

PINYAKONG, O.; HABE, H.; YOSHIBA, T.; NOJIRI, H.; OMORI, T. **Identification of three novel salicylate 1-hydroxylases involved in the phenanthrene degradation of Sphingobium sp. strain P2.** v.301(2), p.350-357, 2003.

PIRNIK, M. P.; ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Hydrocarbon Metabolism by Brevibacterium erythrogenes: Normal and Branched Alkanes.** Journal of Bacteriology, v.119(3), p.868-878, 1974.

POP, M; PHILLIPPY A.; DELCHER, A. L.; SALZBERG, S. L.; **Comparative genome assembly.** Briefings in Bioinformatics, v.5(3), 237-248, 2004.

PRAY, L. **Antibiotic resistance, mutation rates and MRSA.** Nature Education, v.1(1), p.30, 2008.

QUON, B. S.; REID, J. D.; WONG, P.; WILCOX, P. G.; JAVIER, A.; WILSON, J. M.; LEVY, R. D.; **Burkholderia gladioli – a predictor of poor outcome in cystic fibrosis patients who receive lung transplants? A case of locally invasive rhinosinusitis and persistent bacteremia in a 36-year-old lung transplant recipient with cystic fibrosis.** Canadian Respiratory Journal, v.18(4), p.e64-e65, 2011.

RAJU, M. N.; SCALVENZI, L. Petroleum Degradation: **Promising Biotechnological Tools for Bioremediation.** In: ZOVEIDAVIANPOOR, M. Recent insights in petroleum science and engineering. IntechOpen, London, 2018.

RANYA, A. A.; MAPELLI, F.; EL GENDI, H. M.; BARBATO, M.; GODA, D. A.; CORSINI, A. C.; CAVALCA, L.; FUSI, M.; BORIN, S.; DANFFONCHIO, D.; ABDEL-FATTAH, Y. R. **Bacterial diversity and bioremediation potential of the highly contaminated marine sediments at El-Max District (Egypt, Mediterranean Sea).** Biomed Research International, v.2015, p.1-17, 2015.

REDDY, C. M., et al. **Composition and fate of gas and oil released to the water column during the Deepwater Horizon oil spill.** Proc Natl Acad Sci USA, v.109(50), p. 20229-20234, 2012.

REHMAN, A.; ASHRAF, S.; QAZI, J. I.; SHAKOORI, A. R. **Uptake of Lead by a Ciliate, *Stylonychia mytilus*, Isolated from Industrial Effluents: Potential Use in Bioremediation of Wastewater.** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v.75(2), p.290-296, 2005.

RICE, P. **EMBOSS: European Molecular Biology Open Software Suit.** Disponível em: <http://emboss.sourceforge.net>. Acesso em: Julho de 2017.

RISSMAN, A. I.; MAU, B.; BIEHI, B.; DARLING, A. E.; GLASNER, J. D.; PERNA, N. T. **Reordering contigs of draft genomes using the Mauve Aligner.** Bioinformatics, v.25(16), p.2071-2073, 2009.

ROJO, F. **Degradation of alkanes by bacteria.** Environ. Microbiol. v.11, p.2477-2490, 2009.

ROONGSAWANG, N., WASHIO, K., AND MORIKAWA, M. **Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants.** Int. J. Mol. Sci., v.12, p.141-172, 2010.

ROSS, J. P.; HOLLAND, S. M.; GILL, V. J.; DeCARLO, E. S.; GALLIN, J. I. **Severe Burkholderia (*Pseudomonas*) gladioli Infection in Chronic Granulomatous Disease: Report of two successfully treated cases.** Clinical Infectious Diseases, v.21(5), p.1291-1293, 1995.

RUBERTO, L.; VAZQUEZ, S. C.; CORMACK, W. P. M. **Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil.** International Biodeterioration and Biodegradation, v.52(2), p.115-125, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform.** Commonly Used Techniques in Molecular Cloning, Cold Springs Harbor Protocols, New York, USA, 2006.

SANTIS et al. **Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium.** Brazilian Journal of Microbiology, v.46(2), p.377-387, 2015.

SARAVANAN. V.; RAJASIMMAN, M.; RAJAMOCHAN, N. **Performance of packed bed biofilter during transient operating conditions on removal of xylene vapour.** Int. J. Environ. Sci. Technol., v.12, p.1625-1634, 2015.

SATPUTE, S. K. et al. **Molecular genetics of biosurfactant synthesis in microorganisms.** Adv. Exp. Med. Biol. v.672, p.14-41, 2010.

SCHIMIDT, H.; HENSEL, M. **Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis.** Clin. Microbiol. Rev., v.17, p.14-56, 2004.

SCHNEEGURT, M. A; KULPA, C. F. **The application of molecular techniques in environmental biotechnology for monitoring microbial systems.** Biotechnology and Applied Biochemistry, v.27, p.73-79, 1998.

- SCHNEIKER, S. et al. **Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon- degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis***. Nat. Biotechnol., v.24, p.997-1004, 2006.
- SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L. **A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima?** Química Nova, v. 24 (2), p.247-251, 2001.
- SCHWARZ, H. **Energia, Geopolítica e a Política da Biosfera**. Nação e Defesa, v. 116(3), p. 7-29, 2007.
- SEABRA, P. N. **Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Microbiologia Ambiental. 2a ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008.
- SEEMANN, T. **Prokka: rapid prokaryotic genome annotation**. Genome Analysis, v.30(14), p.2068-2069, 2014.
- SEKHON, K. K.; KHANNA, S.; CAMEOTRA, S. S. **Enhanced biosurfactant production through cloning of three genes and role of esterase in biosurfactant release**. Microbial Cell Factories, v.10(49), p.1-10, 2011.
- SEO, Y. S. et al. **Complete genome sequence of *Burkholderia gladioli* BSR3**. Journal of Bacteriology, v.193(12), p.3149, 2011.
- SEO, J.; KEUM, Y.; LI, O. X. **Bacterial Degradation of Aromatic Compounds**. International Journal of Environment Research an Public Health, v.6(1), p.278-309, 2009.
- SHARMA, S.; SUNDARAM, C. S.; LUTHRA, P. M.; SINGH, Y.; SIRDESHMUKH, R.; GADE, STATISTA. **Daily demand for crude oil worldwide from 2006 to 2018 (in million barrels)**. Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/271823/daily-global-crude-oil-demand-since-2006/>>. Acesso em: 19 de agosto de 2018.
- SHI, S.; QU, Y.; MA, Q.; ZHANG, X.; ZHOU, J.; MA, F. **Performance and microbial community dynamics in bioaugmented aerated filter reactor treating with coking wastewater**. Bioresour. Technol. , v.190, p.159-166, 2015.
- SHUKLA, D. P.; MISHRA, A. Y.; VAGHELA, K. B.; JAIN, N. K. **Eco-friendly approach for environment pollution: a review on bioremediation**. International Journal of Current Advanced Research, v.6(10), p.6956-6961, 2017.
- SIMPSON, J. T.; WONG, K.; JACKMAN, S. D.; SCHEIN, J. E.; JONES, S. J. M.; BIROL, I. **ABYSS: a parallel assembler for short read sequence data**. Genome research, v.19(6), p.1117-1123, 2009.
- SINGH, A., WARD, O. P. **Applied Bioremediation and Phytoremediation**. Berlin, 2004.

SILVA, G. G. Z. et al. **Combining de novo and reference-guided assembly with scaffold\_builder**. Source Code for Biology and Medicine, v.8(23), p.1-5, 2013.

SILVA-CASTRO, G.A.; UAD, I.; GÓNZALEZ-LÓPEZ, J.; FANDIÑO, C. G.; TOLEDO, F. L.; CALVO, C. **Application of selected microbial consortia combined with inorganic and oleophilic fertilizers to recuperate oil-polluted soil using land farming technology**. Clean. Technol. Environ. Policy v.14, p.719-726, 2012.

SOLÉ, M. ; PORTE, C. ; BIOSCA, X; MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K.; LIVINGSTONE, D. R.; ALBAGIGÉS, J. **Effects of the “Aegean Sea” oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulus L.*)**. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: [Pharmacology, Toxicology and Endocrinology](#), v.113(2), p.257-265, 1996.

SMITS, T. H.; WITHOLT, B.; van BEILEN, J. B. **Functional characterization of genes involved in alkane oxidation by *Pseudomonas aeruginosa***. Antonie Van Leeuwenhoek, v.4(3), p.193-200, 2003.

SRIDHAR, J.; GUNASEKARAN, P. **COMPUTATIONAL SMALL RNA PREDICTION IN BACTERIA**. BIOINFORMATIC AND BIOLOGY INSIGHTS, V.7, P.83-95, 2013.

STALLWOOD, B.; SHEARS, J.; WILLIAMS, P. A.; HUGHES, K. A. **Low temperature bioremediation of oil-contaminated soil using biostimulation and bioaugmentation with a *Pseudomonas sp.* from maritime Antarctica**. Journal of Applied Biotechnology, v.9(4), p.794-802, 2005.

STANIER, R. Y.; INGRAHAM, J. L. **Protocatechuic acid oxidase**. J. Biol. Chem., v.210, p.799-808, 1954.

STOPNISEK N, ZÜHLKE D, CARLIER A. **Molecular mechanisms underlying the close association between soil Burkholderia and fungi**. ISME J., v.10(1), p.253-64, 2016.

STOTHARD, P.; WISHART, D. S. **Circular genome visualization and exploration using CGView**. Bioinformatics, v.21, p.537-539, 2005.

ULEIMAN, S. A. **Petroleum hydrocarbon toxicity in vitro: effect of n-alkanes, benzene and toluene on pulmonary alveolar macrophages and lysosomal enzymes of the lung**. Arch. Toxicol, v.59, p.402-407, 1987.

TAN, H. M. **Bacterial catabolic transposons**. Applied Microbiology and Biotechnology, v.51, p. 1–12, 1999.

TAN, H. M.; MASON, J. R. **Cloning and expression of the plasmid-encoded benzene dioxygenase genes from *Pseudomonas putida ML2***. FEMS. Microbiol. Lett. v.72, p259-264, 1990.

TATUSOVA, T.; DICUCCIO, M.; BADRETDIN, A.; CHETVERNIN, V.; NAWROCKI, E. P.; ZASLAVSKY, L.; LOMSADZE, A.; PRUITT, K. D.; BORODOVSKY, M.; OSTELL, J. **NCBI prokaryotic genome annotation pipeline**. *Nucleic Acids Res.*, v.44(14), p.6614-24, 2016.

TENERELLI, J.; WALKER, M. (1995). "Sustainable energy strategy". Disponível em: <http://www.ems.psu.edu/~radovic/Chapter8.pdf>. Acesso em: 12 de Setembro 2017.

THEORELL, H. **Kinetics and equilibria in the liver alcohol dehydrogenase system**. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* b.20, p.31-49, 1958.

THOMPSON, K. F. M. **Classification and thermal history of petroleum based on light hidrocarbons**. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v.47, p. 303-316, 1983.

TIKU, D. R.; ASITOK, A. D.; ANTAI, S. P.; EKPENYONG, M. G. **Hydrocarbon Biodegradation, Heavy Metal Tolerance, And Antibiotic Resistance Among Bacteria Isolates From Petroleum Polluted And Pristine Soil Samples In Calabar Metropolis**. *Imp. Jour. of Inderdisc. Resource*, v.2(11), p.1448-1462, 2016.

TIMMIS, K. N.; PIEPER, D. H. **Bacteria designed for bioremediation**. *Trends in Biotechnology*, v.17(5), p.201-204, 1999.

TISSOT, B. P.; WELTE, D. H. **Petroleum formation and occurrence**. Springer- Verlag, p. 375-423, 1984.

TOMÁS-GALLARDO, L.; GÓMEZ-ÁLVAREZ, H.; SANTERO, E.; FLORIANO, B. **Combination of degradation pathways for naphthalene utilization in Rhodococcus sp. strain TFB**. *Microbial Biotechnology*, v.7(2), p.100-113, 2014.

TSUDA, M.; LINO, T. **Genetic analysis of a transposon carrying toluene degrading genes on a TOL plasmid pWWO**. *Mol. Gen. Genet.*, v.210, p.270-276, 1987.

TU, C. P.; QIAN, B. **Nucleotide sequence of the human liver glutathione S-transferase subunit 1 cDNA**. *Biochem Soc Trans*, v.15, p.734-6, 1987.

TYERS, M.; MANN, M. **From genomics to proteomics**. *Nature*, v.422, p.193-197, 2003.

UDHHS. U.S. Department of Health and Human Services. **Toxicological Profile for Total Petroleum Hydrocarbons**. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp123.pdf>. Acesso em: setembro de 2017.

UPRETI, M. K.; DUA, H. K.; SINGH, M. P.; SINGH, A. P.; MALHOTRA, R. K.; VERMA, R. P. **Method for bio-assisted treatment of hydrocarbon contaminated soil**. US20090325271A1, 2006.

URBANCE, J. W.; COLE, J.; SAXMAN, P.; TIEDJE, J. M. **BSD: the biodegradative strain database**. *Nucleic Acids Research*, v.31, p.152-155, 2003.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **CLEAN Water Act**. Boston, 2007.

URA, H.; FURUYA, N.; LIYAMA, K.; HIDAKA, M.; TSUCHIYA, K.; MATSUYAMA, N.

- Burkholderia gladioli* associated with symptoms of bacterial grain rot and leaf-sheath browning of rice plants.** Journal of General Plant Pathology, v.72(2), p.98-103, 2006.
- van BEILEN, J. B.; EGGINK, G.; ENEQUIST, H.; BOS, R.; WITHOLT, B. **DNA sequence determination and functional characterization of the OCT-plasmid-encoded alkJKL genes of *Pseudomonas oleovorans*.** Molecular Microbiology v.6, p.3121-3136, 1992.
- van BEILEN, J. B.; SMITHS, T. H. M.; WHYTE, L. G.; SCHORCHT, S.; RÖTHLISBERGER, M.; PLAGGEMEIER, T. P.; ENGESSER, K.; WITHOLT, B. **Alkane hydroxylase homologues in Gram-positive strains.** Environmental Microbiology, v.4(11), p.676-682, 2002.
- van der MEER, J. R.; DE VOS, W. M.; HARAYAMA, S.; ZEHNDER, A. J. B. **Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds.** Microbiological Reviews, v.56, p. 677-694, 1992.
- VANZELLA, T. P.; MARTINEZ, C. B. R.; CÓLLUS, I. M. S. **Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species.** Mutation Research / Genetica Toxicology and Environmental Mutagenesis, v.631(1), p.36-43, 2007.
- VENTER, J. C., et al. **Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea .** Science, v.304, p.66-74, 2004.
- VIAL, L.; GROLEAU, M.; DEKIMPE, V.; DÉZIEL, E. **Burkholderia Diversity and Versatility: An Inventory of the Extracellular Products.** Journal of Microbiology Biotechnology, v.17(9), p.1407-1429, 2007.
- VIDALI, M. **Bioremediation. An overview.** Pure. Appl. Chem., v.73, p.1163-1172, 2001.
- VOMBERG, A.; KLINNER, U. **Distribution of alkB genes within n-alkane-degrading bacteria.** Journal of Applied Microbiology, v.89(2), p.339-48, 2000.
- XIA, W.; DU, Z.; CUI, Q.; DONG, H.; WANG, F.; HE, P.; TANG, Y. **Biosurfactant produced by novel *Pseudomonas* sp. WJ6 with biodegradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons.** Journ. Hazard. Materials, v.276(15), p.489-498, 2014.
- XU, P.; MA, W.; HAN, H.; JIA, S.; HOU, B. **Isolation of a naphthalene-degrading strain from activated sludge and bioaugmentation with it in a MBR treating coal gasification wastewater.** Bull. Environ. Contam. Toxicol., v.94, p.358-364, 2015.
- XU, P.; MA, W.; HAN, H.; JIA, S.; HOU, B. **Isolation of a Naphthalene-Degrading Strain from Activated Sludge and Bioaugmentation with it in a MBR Treating Coal Gasification Wastewater.** Bull. Environ. Contam. Toxicol., v.94, p.358-364, 2015.
- XU, H.; WU, J.; SHI, X.; SUN, Y. **Petroleum degrading strain P-6 and application thereof.** CN104651280, 2015.

XU, X.; LIU, W.; TIAN, S.; WANG, W.; QI, Q.; JIANG, P.; GAO, X.; LI, F.; LI, H.; YU, H. **Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis.** *Frontiers in Microbiology*, v.9, p.1-8, 2018.

WANG, J.; WANG, J.; ZHANG, Z.; LI, Y.; ZHANG, B.; ZHANG, Z.;ZHANG, G. **Cold-adapted bacteria for bioremediation of crude oil-contaminated soil.** *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v.91(8), p.1-12, 2015.

WANG, Z.; FINGAS, M. **Differentiation of the source of spilled oil and monitoring of the oil weathering process using gas chromatography-mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, 712, 321-343, 1995.

WANG, Y.; HUANG, Y. **Hydrogen isotopic fractionation of petroleum hydrocarbons during vaporization: implications for assessing artificial and natural remediation of petroleum contamination.** *Applied Geochemistry*, v. 18, p. 1641-1651, 2003.

WANG, Z.; FINGAS, M. **Developments in the analysis of petroleum hydrocarbons in oils, petroleum products and oil-spill-related environmental samples by gas chromatography.** *Journal of Chromatography A*, v.774, pp.51-78, 1997.

WANG, Z; HOLLEBONE, B. P.; FINGAS, M.; FIELDHOUSE, B.; SIGOUIN, L; LANDRIAUT, M.; SMITH, P.; NOONAN, J.; THOUIN, P. **Characteristics of spilled oils, fuels, and Petroleum products: 1. Composition and properties of selected oils.** USEPA, 2003.

WANGPENG, W.; SHAO, Z. **Enzymes and genes involved in aerobic alkane degradation.** *Frontiers in Microbiology*, v.4, p.116, 2013.

WATTANAPHON, H. T.; KERDSIN, A.; THAMMACHAROEN, C.; SANGVNICH, P.; VANGNAI, A. S. **A biosurfactant from *Burkholderia cenocepacia* BSP3 and its enhancement of pesticide solubilization.** v.105(2), p.416-423, 2008.

WESTRA, E. R. et al. **CRISPR immunity relies on the consecutive binding and degradation of negatively supercoiled invader DNA by Cascade and Cas3.** *Mol Cell* v.46, p.595-605, 2012.

WHELAN, M. J.; COULON, F.; HINCE, G.; RAYNER, J.; MCWATTERS, R.; SPEDDING, T.; SNAPE, I. **Fate and transport of petroleum hydrocarbons in engineered biopiles in polar regions.** *Chemosphere*, v.131, p.232-240, 2015.

WILLIAMS, P. A.; WORSEY, M. J. **Ubiquity of plasmids in coding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria: evidence for the existence of new TOL plasmids.** *Journal of Bacteriology*, v.125, p. 818-828, 1976.

WHITED, G. M.; GIBSON, D. T. **Toluene-4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to p-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1.** *J. of Bacteriology*, v.173(9), p.310-316, 1991.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI,

T.; ARAKAWA, M. **Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and Transfer of Seven Species of the Genus *Pseudomonas* Homology Group II to the New Genus, with the Type Species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov.** *Microbiology and Immunology*, v.36(12), p.1251-1275, 1992.

YAN, H.; WANG, L.; FU, P. P.; YU, H. **Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list.** [\*Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis\*](#), v. 557(10), p. 99-108, 2004.

YIN, C., ; XIA, D. **A study of the distribution of sulfur compounds in gasoline produced in China. Part 1. A method for the determination of the distribution of sulfur compounds in light petroleum fractions and gasoline.** *Fuel*, v.80(4), p.607-610, 2001.

YU, Y.; SHANG, W.; CHEN, G.; GAO, Y. WANG, J. **Preparation of petroleum-degrading bacterial agent and its application in remediation of contaminated soil in Shengli Oil Field, China.** *Environ Sci Pollut Res Int.*, v.21(13), p.7929-7937, 2014.

YUAN, S. Y.; CHANG, J. S.; YEN, J.H.; CHANG, B.V. **Biodegradation of phenanthrene in river sediment.** *Chemosphere* v.43, p.273-278, 2001.

WEC. **World Energy Resources.** London, 2013.

WÓJCIK, A.; BOROWSKY, T.; BROCLAWIK, E. **The mechanism of the reaction of intradiol dioxygenase with hydroperoxy probe: A DFT study.** *Catalysis Today*, v.169(1), p.207-216, 2011.

ZAMANI, J. et al. **The effect of *Piriformospora indica* on the root development of maize (*Zea mays* L.) and remediation of petroleum contaminated soil.** *International Journal of Phytoremediation*, v.18(3), 2016.

ZAVAREH, M. S. H.; EBRAHIMPOUR, G.; MOGHADAM, M. S; FAKHARI, J.; ABDOLI, T. **Bioremediation of Crude Oil Using Bacterium from the Coastal Sediments of Kish Island, Iran.** *Iran Journal of Health*, v.45(5), p.670-679, 2016.

ZHANG, S.; HUANG, H. **Geochemistry of Palaeozoic marine petroleum from the Tarim Basin, NW China: Part 1. Oil family classification.** *Organic Geochemistry*, v36(8), p.1204-1214, 2005.

ZHANG, Z.; HOU, Z.; YANG, C; MA, C.; TAO, F.; XU, P. **Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8.** *Bioresource Technology*, v.102, p.4111-4116, 2011.

ZHONGTANG, Y.; MOHN, W. W. **Bioaugmentation with resin-acid-degrading bacteria enhances resin acid removal in sequencing batch reactors treating pulp mill effluents.** *Water Research*, v.35(4), p.883-890, 2001.

ZHOU, L; LI, K.; MBADING, S. M.; YANG, S.; GU, J.; MU, B. **Analyses of n-alkanes degrading community dynamics of a high-temperature methanogenic consortium enriched from production water of a petroleum reservoir by a combination of molecular techniques.** *Ecotoxicology*, v.21(6), p.1680-1691, 2012.

ZHU, X.; LIU, R.; LIU, C.; CHEN, L. **Bioaugmentation with isolated strains for the removal of toxic and refractory organics from coking wastewater in a membrane bioreactor.** *Biodegradation*, v.26, p.465-474, 2015.

ZYLSTRA, G. J.; McCOMBIE, W. R.; GIBSON, D. T.; FINETTE, B. A. **Toluene Degradation by *Pseudomonas putida* Fl: Genetic Organization of the tod Operon.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.54(6), 1498-1503, 1988.