

## Artigo

**Biodegradação Bacteriana de Petróleo e seus Derivados****Wetler-Tonini, R. M. C.;**\* **Rezende, C. E.;** **Grativol, A. D.***Rev. Virtual Quim.*, 2011, 3 (2), 78-87. Data de publicação na Web: 30 de junho de 2011<http://www.uff.br/rvq>**Bacterial Biodegradation of Petroleum and Oil Compounds**

**Abstract:** Petroleum compounds can be degraded by several bacterial species. Thus, these microorganisms are of great interest to the industry and to the recovery of contaminated environments. Methods to isolate, cultivate and identify bacteria able to degrade these pollutants have been developed in the field of chemistry, biochemistry, microbiology and molecular biology, allowing for a better understanding of bacterial communities ecology and dynamics in the environmental context and in the laboratory. Finally, there is a growing need for multidisciplinary research in order to meet the greatest possible number of species, their metabolic properties and their respective roles in the degradation process of oil compounds and, with this information, develop strategies for decontamination of environments polluted with these substances.

**Keywords:** microbial ecology; petroleum biodegradation; bacterial identification methods.

**Resumo**

Componentes do petróleo podem ser degradados por diversas espécies de bactérias. Estes microrganismos são de grande interesse para a indústria e na recuperação de ambientes contaminados. Métodos de isolamento, cultivo e de identificação de bactérias degradadoras de poluentes foram desenvolvidos nos domínios da química, bioquímica, microbiologia e biologia molecular, possibilitando conhecer melhor a ecologia e dinâmica das comunidades bacterianas no ambiente e em laboratório.

Há a necessidade crescente de pesquisas multidisciplinares para conhecer o maior número possível de espécies, das suas características metabólicas e das suas respectivas funções para a biodegradação de petróleo e de seus derivados para a descontaminação de ambientes poluídos por estes compostos.

**Palavras-chave:** ecologia microbiana; biodegradação de petróleo; métodos de identificação de bactérias.



\* Laboratório de Ciências Ambientais, P5, sala 211. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, CEP: 28013-602, Campos dos Goytacazes-RJ, Brasil.

✉ [micro\\_rita@yahoo.com.br](mailto:micro_rita@yahoo.com.br)

DOI: [10.5935/1984-6835.20110013](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20110013)

## Biodegradação Bacteriana de Petróleo e seus Derivados

Rita Maria C. Wetler Tonini,\* Carlos E. de Rezende, Adriana D. Grativol

Laboratório de Ciências Ambientais, P5, sala 211. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, CEP: 28013-602, Campos dos Goytacazes-RJ, Brasil.

\* [micro\\_rita@yahoo.com.br](mailto:micro_rita@yahoo.com.br)

*Recebido em 30 de junho de 2011. Aceito para publicação em 30 de junho de 2011*

1. Biodegradação de petróleo
2. Detecção de microrganismos degradadores de poluentes do petróleo
  - 2.1. Indicadores físico-químicos de poluição no solo
3. Identificação de microrganismos degradadores
  - 3.1. Métodos dependentes de cultura
  - 3.2. Métodos independentes de cultura
4. Considerações Finais

### 1. Biodegradação de petróleo

---

O petróleo pode ser utilizado por diversos microrganismos como fonte de carbono e energia. Uma grande quantidade de substratos e metabólitos presentes em solos impactados por hidrocarbonetos fornece condições para o desenvolvimento de uma complexa comunidade microbiana.<sup>1-7</sup>

As populações de bactérias que degradam hidrocarbonetos em sedimentos marinhos contaminados com petróleo são maiores do que nos sedimentos não contaminados por estas substâncias<sup>8</sup>. Normalmente, as populações destes microrganismos representam menos de 1% do total das comunidades microbianas em ambientes naturais. Entretanto, quando poluentes derivados do petróleo estão presentes, as populações de bactérias degradadoras destes compostos aumentam para 10% da comunidade.<sup>9</sup> Derrames sucessivos de petróleo no mesmo ambiente aceleram o aumento da biomassa bacteriana. Desta forma, uma alta concentração dessas bactérias pode ser utilizada como um indicador de ambiente impactado cronicamente por petróleo.<sup>10</sup> Portanto, o estudo da diversidade

microbiana autóctone torna-se fundamental para a compreensão das funções exercidas pelos microrganismos diante da contaminação dos habitats por petróleo e seus derivados.<sup>11</sup>

Ecologicamente, microrganismos degradadores de hidrocarbonetos são amplamente distribuídos. As dificuldades encontradas para caracterizar comunidades microbianas de ambientes impactados por hidrocarbonetos do petróleo são agravadas pela grande quantidade de substratos específicos e interações metabólicas possíveis. Apesar da complexidade destas comunidades, ferramentas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de caracterizar a abundância e distribuição microbiana em ambientes naturais, a fim de associar estruturas comunitárias com as funções do ecossistema. Métodos baseados em cultura e independentes de cultura têm sido desenvolvidos e aplicados para fornecer uma compreensão destas comunidades microbianas, e a evolução destas pesquisas tem gerado e disponibilizado listas-referência de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos para consulta, uma vez que técnicas para isolar e identificar microrganismos responsáveis pelo metabolismo destes compostos são fundamentais

para a biorremediação de ambientes poluídos.<sup>5</sup>

## 2. Detecção de microrganismos degradadores de poluentes do petróleo

### 2.1. Indicadores físico-químicos de poluição no solo

As taxas de infiltração de água estão sujeitas as características físicas (ex.: granulometria) e químicas (ex.: conteúdo da matéria orgânica) dos solos e, conseqüentemente, controlam a distribuição de poluentes e microrganismos.<sup>12,7</sup> Os intervalos de densidade do solo, em geral, variam de <1,0 (em solos orgânicos) a 1,7 g cm<sup>-3</sup> e são dependentes das rochas formadoras dos sedimentos e das características das partículas (areia, silte, argila e matéria orgânica). Camadas de solo compactado têm densidades elevadas, e inibem o movimento do ar e da água, dificultando a ação de microrganismos aeróbios. Neste caso, deve-se direcionar a prospecção para microrganismos anaeróbios. Os solos com texturas mais finas tendem a agregar partículas de matéria orgânica e a ter maior quantidade de bactérias aeróbias.<sup>12,7</sup>

Características químicas como o pH, a condutividade elétrica e a presença de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) devem ser levados em consideração, pois o pH pode ser alterado pela presença de poluentes e influencia diretamente a solubilidade de minerais e de matéria orgânica do solo, na disponibilidade de nutrientes e na atividade de microrganismos.<sup>12,7</sup> A condutividade elétrica é uma indicação da quantidade de íons (sais dissolvidos) presentes no solo, e o excesso de sais afeta diretamente a atividade microbiana.<sup>12</sup> A detecção de HPAs de origem petrogênica, pirogênica ou biogênica pode ser utilizada como indicadora da presença de microrganismos biodegradadores de petróleo, uma vez que estes possuem vias metabólicas para a degradação de compostos orgânicos aromáticos.<sup>13,14,6,7</sup>

## 3. Identificação de microrganismos degradadores

Abordagens para a detecção da diversidade microbiana e as funções de cada microrganismo na

comunidade podem ser divididas em métodos dependentes de cultura e independentes de cultura.<sup>5</sup>

### 3.1. Métodos dependentes de cultura

Os métodos tradicionais, dependentes de cultura, são os mais conhecidos e baseiam-se na diferenciação morfológica, metabólica e fisiológica dos microrganismos. As técnicas incluem o isolamento e cultivo em meios sólidos contendo compostos do petróleo como única fonte de carbono, técnica de número mais provável (NMP) e, mais recentemente, Biolog que emprega placas de utilização do substrato.<sup>1,5</sup>

Técnicas de cultura tradicionais produziram informações essenciais sobre interações microbianas com hidrocarbonetos no ambiente. Isto pode ser demonstrado em estudos, onde catálogos de microrganismos foram compilados com base no isolamento convencional e técnicas de plaqueamento. Estas pesquisas documentaram que há uma coleção diversa, amplamente distribuída de bactérias, leveduras e fungos, capazes de utilizar hidrocarbonetos.<sup>1,5</sup> Outras investigações contemporâneas continuam registrando comunidades microbianas em ambientes impactados por hidrocarbonetos em todo o mundo.<sup>1,5</sup> Embora possibilitem isolar e identificar microrganismos presentes em ambientes impactados por hidrocarbonetos, as descrições de comunidades microbianas por métodos dependentes de cultivo são baseadas apenas nas características morfológicas e funcionais.<sup>5</sup>

Após o isolamento, são feitas análises morfológicas e testes bioquímicos para a identificação das bactérias ao nível de gênero. O primeiro passo consiste na caracterização morfológica da colônia, coloração de Gram, e na visualização e descrição ao microscópio das bactérias coradas. A seguir, são feitos testes bioquímicos primários, a saber: catalase e oxidase, oxidação-fermentação e motilidade. Testes secundários consistem na avaliação do crescimento em meios específicos (MacConkey®, DNase e Marine Agar), susceptibilidade a penicilina, utilização de hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia, hidrólise do amido, requerimento de íons de sódio, teste de utilização de citrato, fermentação e produção de gás a partir da glicose e fermentação de D-manitol.<sup>15</sup>

Para estudos em que não há necessidade de obtenção de isolados, para os hidrocarbonetos não-voláteis com base na formação das emulsões, pode-se

aplicar a técnica de NMP (número mais provável) em placas de 96 poços, utilizando-se um programa de computador para estimar o número de microrganismos degradadores no meio de cultivo. Ensaio de NMP dividem comunidades em tipos fisiológicos, podendo apresentar maior eficiência com o uso de vários meios seletivos em associação com uma detalhada caracterização do local de estudo. Esta técnica tem se mostrado particularmente útil para estudar sistemas anaeróbios, pois se mostra sensível, mesmo quando anaeróbios de crescimento lento estão sendo analisados. A técnica de NMP também se mostra bastante útil para a caracterização de comunidades microbianas de ambientes impactados por petróleo, e é utilizada para avaliar o papel de grupos microbianos específicos durante o processo de remediação.<sup>5,15,16</sup>

A técnica de Biolog pode ser aplicada para verificar padrões de substrato para avaliar a diversidade funcional de comunidades microbianas. Neste teste, a amostra é incubada com até 95 diferentes fontes de carbono em placas de 96 poços, e o corante azul de tetrazólio é usado para indicar a atividade microbiana. O resultado do ensaio é um perfil qualitativo fisiológico das potenciais funções metabólicas exercidas pela porção cultivável da comunidade microbiana. As diferenças nos perfis podem então ser analisadas por métodos de estatística multivariada.<sup>12</sup> No entanto, algumas identificações incorretas e a constatação de que o tempo de incubação pode causar modificações prejudica a confiabilidade do ensaio. Parte das falhas encontradas na identificação de organismos pode ser minimizada complementando o Biolog com testes bioquímicos quando a microplaca é inoculada.<sup>18</sup>

Com base em estudos de cultivo de bactérias utilizando hidrocarbonetos como única fonte de carbono, observou-se que os isolados obtidos apresentaram especificidade quanto ao uso de substratos e, foram identificadas várias vias metabólicas de degradação de HPAs para diferentes microrganismos.<sup>5,19,20</sup> Para utilizar estes compostos, o microrganismo deve ter a capacidade de quebrar pelo menos parte da molécula de hidrocarboneto, transformando-o em outro composto intermediário da via degradativa.<sup>5,19,20</sup> Em laboratório, utilizando-se culturas puras, as condições de crescimento podem ser controladas para otimizar a capacidade de biodegradação, uma vez que é possível controlar fatores físicos e químicos intervenientes na atividade microbiana, como pH, temperatura, umidade e concentração de nutrientes.<sup>7</sup>

A presença de co-metabolismo é essencial para a degradação de alguns hidrocarbonetos em condições

de laboratório, uma vez que estes podem apresentar toxicidade para certos microrganismos e, em contrapartida, servir de fonte de carbono para outros. Assim, o metabolismo de compostos tóxicos por alguns microrganismos resistentes gera subprodutos que serão utilizados por outras espécies como substrato de crescimento. A biodegradação do petróleo em ambientes naturais ou em laboratório, não pode ser realizada por uma única espécie de bactéria, uma vez que este poluente é constituído por vários tipos de hidrocarbonetos. Nenhum microrganismo é capaz de degradar sozinho todos os compostos ali presentes, exigindo a formação de consórcios de várias espécies microbianas, os quais, têm demonstrado maior eficiência na degradação, podendo chegar à mineralização completa do poluente em função da complementaridade metabólica entre seus membros.<sup>2,5,10,21</sup>

Diversas pesquisas têm tentado descrever as interações entre microrganismos e entre os hidrocarbonetos e microrganismos, por extrapolação de estudos detalhados em laboratório com isolados de ambientes contaminados por hidrocarbonetos. Por exemplo, as avaliações funcionais e fisiológicas de grupos de isolados, com o objetivo de quantificar a capacidade de emulsificação do óleo e a forma utilizada por isolados ambientais para assimilar hidrocarbonetos.<sup>5</sup> Os pesquisadores também têm elaborado consórcios microbianos, contendo várias linhagens já estudadas com a finalidade de descrever processos ecológicos específicos de vários ambientes naturais.<sup>5</sup>

Nos últimos anos, os métodos dependentes apenas de cultivo microbiano têm demonstrado que a contagem utilizando estas técnicas apresenta discrepâncias quando comparadas à comunidade de microrganismos no ambiente, uma vez que, as células bacterianas se mostraram sensíveis ao cultivo. Deve-se considerar que apenas uma pequena fração dos microrganismos pode ser cultivada a partir de amostras ambientais, e mesmo que um microrganismo seja cultivado, o seu papel e função na comunidade e sua contribuição para o ecossistema não são, necessariamente, identificados.<sup>5,22</sup>

Outro aspecto a ser ressaltado é que a contagem microscópica direta excede as contagens de células viáveis em meio de cultura em várias ordens de grandeza.<sup>23</sup> Algumas explicações podem incluir i) a presença de um grande número de células muito pequenas e, provavelmente, inativas, que não são capazes de crescer em condições de laboratório; ii) normalmente, o cultivo em laboratório apresenta seletividade, permitindo o crescimento de algumas espécies e reprimindo o crescimento de outras; iii) a

composição da fração cultivável da comunidade pode ser distorcida pelo método de cultura, uma vez que o tempo de replicação varia de acordo com a espécie microbiana, e, com o crescimento rápido de algumas espécies, outras de replicação mais lenta são excluídas por competição; iv) os meios de cultura são extremamente ricos em fontes de carbono quando comparados aos substratos encontrados em ambientes naturais, podendo falsear a composição da comunidade original. Assim, devido às limitações dos meios de cultura em reproduzir as condições adequadas, a diversidade e equitabilidade obtidas por cultivo não podem representar com precisão a comunidade real encontrada *in situ*.<sup>22-24</sup>

De acordo com Felske e colaboradores (1999)<sup>22</sup>, apesar das limitações supracitadas, é possível cultivar vários tipos de bactérias em laboratório com o uso de nutrientes e condições adequadas. Membros de vários grupos microbianos onipresentes e de difícil cultivo já foram isolados por ajustes das condições de cultura, até mesmo por modificações simples, tais como o uso de formulações sólidas em lugar de líquidas, redução das concentrações de nutrientes e minerais, ou aumento do tempo de incubação.<sup>25</sup>

A diversidade de microrganismos é muito ampla, no entanto, ainda é pouco conhecida. Estima-se que um grama de solo contenha de 10 a 20 bilhões de microrganismos, representando milhares de espécies de fungos, bactérias e leveduras. Com os avanços nas pesquisas, o número de espécies microbianas identificadas cresce a cada ano, indicando que foram descobertas e nomeadas, talvez, menos de 0,1% e no máximo 10% das espécies microbianas existentes, dependendo do habitat estudado. Acredita-se que menos de 1% de todas as células bacterianas do solo podem ser cultivadas pelos métodos tradicionais.<sup>5,17,22</sup> A extração direta de ácidos nucleicos de amostras ambientais têm comprovado que uma grande proporção de microrganismos (90-99,9%) não é facilmente cultivada em laboratório, mas que pode ser responsável pela maior parte da atividade biodegradativa de interesse biotecnológico.<sup>24</sup>

Microrganismos não cultiváveis compõem a maior parte da comunidade microbiana. No entanto, até pouco tempo, o cultivo era indispensável para sua identificação. Além disso, a frequência de ocorrência das populações, a sazonalidade, e em muitos casos, a dependência de hospedeiros e/ou substratos específicos para sua sobrevivência e replicação também consistiam em importantes limitações à identificação.<sup>17,22</sup>

O uso de técnicas de cultivo é indispensável aos estudos de microrganismos ambientais, auxiliando no

isolamento e proporcionando a compreensão detalhada das características e do metabolismo dos organismos separadamente. Entretanto, na análise de comunidades, são limitados em reproduzir a alta diversidade existente, os nichos ecológicos e as relações simbióticas encontradas em ambientes naturais complexos.

A identificação direta de bactérias do solo por meio de técnicas que independem de cultura prévia, com o uso do gene 16S rDNA, indicou a presença de muitas espécies bacterianas não cultiváveis.<sup>22-24</sup> No entanto, existe a hipótese de que as bactérias cultiváveis representem as células viáveis, enquanto as sequências de 16S rDNA podem ser obtidas a partir de células mortas presentes na amostra. Esta possibilidade, indicaria que a análise de sequências clonadas do 16S rDNA fornece informações, principalmente de interesse taxonômico, podendo não indicar as principais bactérias vivas agindo nos processos biogeoquímicos dos solos e sedimentos.<sup>22</sup>

Os métodos microbiológicos clássicos combinados às técnicas de análise molecular podem proporcionar uma caracterização mais abrangente da comunidade microbiana presente no ambiente e sua resposta à biorremediação induzida e aos processos naturais de atenuação.<sup>24</sup>

### 3.2. Métodos independentes de cultura

A disparidade entre a diversidade microbiana no ambiente e a cultivada em laboratório aumentou a importância das abordagens moleculares independentes de cultura, mas recentemente, a análise do DNA tornou-se o alvo dominante de estudo. Métodos baseados na assinatura do DNA bacteriano por meio do gene 16S rDNA demonstram as relações filogenéticas nas comunidades microbianas e têm aumentado substancialmente o conhecimento sobre a diversidade de microrganismos em ambientes naturais. A caracterização de um organismo em termos de fílotipo requer apenas uma sequência de genes, e não uma célula metabolicamente ativa. Estes genes podem ser obtidos por clonagem de DNA, isolado diretamente da amostra ambiental por várias técnicas já padronizadas. Estes métodos tornaram-se ferramentas indispensáveis não somente na ecologia microbiana clássica, mas também em outras áreas de pesquisa, uma vez que muitas características de algumas espécies só podem ser explicadas em um contexto de comunidade.<sup>23,24,26,27</sup>

As sondas de DNA podem detectar genes ou sequências de genes no DNA total isolado e purificado a partir de amostras ambientais. De acordo com Widada e colaboradores,<sup>24</sup> técnicas de hibridização de DNA, usando DNA marcado como uma sonda específica foram utilizadas em diversas pesquisas para identificação de microrganismos específicos em amostras ambientais.

Um dos primeiros estudos para a utilização de técnicas de hibridização direta de monitoramento para degradadores de xenobióticos consistiu no uso de plasmídeos em microcosmos no solo. Bactérias foram hibridizadas com plasmídeos como sondas para quantificar as células que continham a sequência responsável pela utilização do poluente. Uma correlação positiva foi observada entre as concentrações de plasmídeo e as taxas de mineralização. A exposição aos substratos aromáticos causou um aumento na quantidade de plasmídeos encontrados nas amostras.<sup>24</sup>

Microrganismos podem ser usados para determinar a biodisponibilidade de um determinado composto químico no solo e sedimento. Para tal, é indicada a medição de plasmídeos em bactérias, uma vez que o gene que codifica a resistência aos xenobióticos são, geralmente, codificados nestes plasmídeos; estes servem como indicadores de contaminantes no ambiente. É possível usar abordagem endógena ou exógena. Na abordagem endógena, plasmídeos são extraídos das bactérias e isolados em placas de ágar. Na abordagem exógena, uma amostra de solo ou sedimento é misturada com bactérias sem plasmídeo, que, por conjugação, posteriormente, os adquirem naturalmente das bactérias que contêm plasmídeos. Se o número de plasmídeos encontrado apresentar aumento em um determinado local, uma investigação dos fatores de estresse pode ser iniciada.<sup>12</sup>

A ecologia microbiana sofreu uma mudança profunda nas duas últimas décadas quanto aos métodos empregados para a análise das comunidades naturais. As técnicas de investigação da diversidade microbiana estrutural mudaram de cultivo para métodos que se baseiam na investigação de parte da sequência do DNA, com maior ênfase para o gene 16S rDNA, em bactérias, e 18S rDNA, para fungos. A caracterização pode ser feita através da clonagem e sequenciamento direto, por hibridização do DNA da amostra com sondas ou, alternativamente, pelo uso da técnica de PCR (*polymerase chain reaction*, em inglês), com o uso de iniciadores universais que amplificam as sequências-alvo de diversos organismos e, posteriormente, os fragmentos amplificados podem ser analisados através de outras

técnicas.<sup>1,17,23,27</sup> De acordo com Felske e colaboradores<sup>22</sup> estudos moleculares podem fornecer informações sobre a maioria dos membros metabolicamente ativos da comunidade bacteriana no solo e também são aplicáveis em sedimentos, porém algumas adaptações se fazem necessárias devido as características de cada tipo de matriz ambiental.

Com a rápida expansão da genética, a ecologia e a biogeoquímica molecular têm apresentado uma série de abordagens baseadas na técnica de PCR. Desta forma, os estudos de microrganismos através dos fragmentos de DNA amplificados usando clonagem ou sequenciamento ou submetidos a uma série de métodos de caracterização genética são empregados para avaliar perfis de comunidades.<sup>5,17,22-24,28</sup> A evolução da utilização de DNA *microarrays* tem atraído a atenção dos microbiologistas ambientais, uma vez que esta técnica permite o acompanhamento de milhares de genes ao mesmo tempo.<sup>5</sup> Diante da evolução das técnicas de ecologia microbiana, é possível afirmar que a identificação filogenética e a caracterização da dinâmica das comunidades dos microrganismos, em breve, serão pré-requisitos essenciais para a realização de estudos de qualidade nesta área, tornando possível a obtenção de dados taxonômicos e quantitativos tão confiáveis quanto os da ecologia de macro-organismos.<sup>26</sup>

A seguir, serão apresentadas algumas técnicas baseadas em PCR, comumente usadas com a finalidade de estudar a diversidade e identificar microrganismos ambientais.

ARDRA (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*) é uma ferramenta comumente empregada para estudar a diversidade microbiana, que se baseia no polimorfismo do DNA. Assim, clones contendo fragmentos do gene 16S rDNA, obtidos através do uso de iniciadores universais ou específicos, são amplificados por PCR e digeridos por enzimas de restrição. A seguir procede-se a separação dos fragmentos em gel de agarose de alta densidade ou gel de acrilamida. Os perfis resultantes são, então, utilizados para classificar a comunidade em grupos genotípicos específicos ou para a tipagem de linhagens.<sup>29</sup>

RISA (*ribossomal intergenic space analysis*) é um método de análise da comunidade microbiana, que fornece estimativas de diversidade e composição da comunidade. Foi usado originalmente para a comparação da diversidade em solos e mais recentemente para analisar a diversidade microbiana na rizosfera e em ambientes marinhos. O método envolve a PCR do DNA total da comunidade

bacteriana, amplificando a região intergênica entre a subunidade pequena (16S) e a subunidade grande (23S) do gene rRNA, com iniciadores específicos para regiões conservadas dos genes ribossomais 16S e 23S. Nesta técnica, as diferenças no comprimento do espaçador intergênico são exploradas. A região intergênica 16S-23S, que pode codificar tRNAs dependendo da espécie bacteriana, apresenta significativa heterogeneidade no comprimento e na sequência de nucleotídeos, que podem ser utilizadas para distinguir cepas bacterianas e espécies estreitamente relacionadas. O produto da PCR passa por uma eletroforese em gel de poliacrilamida, e o DNA é corado e visualizado. O resultado é um padrão complexo de bandas que fornece um perfil da comunidade específica, onde cada banda de DNA correspondente a, pelo menos, um organismo da comunidade original. Embora esta técnica forneça estimativas relativamente rápidas da composição de comunidades microbianas, a eletroforese em gel de poliacrilamida tende a ser demorada e complicada.<sup>20,30</sup> Diante das limitações existentes, a técnica foi aprimorada com o uso da automatização, sendo, assim, criada a técnica de ARISA (*automated ribosomal intergenic spacer analysis*), que pode ser utilizada para investigar a dinâmica espacial e temporal das assembleias bacterianas, para análises de estruturas das comunidades microbianas ambientais, obtendo-se uma estimativa do número de táxons de bactérias. Esta técnica difere da RISA pela análise dos produtos da PCR em um sistema de eletroforese capilar automatizado. Assim, é produzido um eletroferograma, cujos picos correspondem a fragmentos distintos de DNA, que são diferenciados por um sistema de detecção de fluorescência a laser. A sensibilidade deste método é muito elevada (detecta diferenças de um único nucleotídeo), e a reprodutibilidade é garantida pela automatização instrumental. A técnica de ARISA tem sido utilizada para analisar a estrutura genética de várias comunidades de bactérias e/ou de fungos em amostras de água doce, bacterioplâncton, e diferentes solos, permitindo uma estimativa bastante confiável da complexidade da comunidade.<sup>31,32</sup> A utilização de uma técnica automatizada e a fácil análise dos dados gerados tem demonstrado que ARISA é uma técnica apropriada para analisar e comparar um grande número de amostras e os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis.<sup>31,32</sup>

A técnica de T-RFLP (*terminal restriction fragment length polymorphism*) necessita de iniciadores marcados com fluorescência, produzindo fragmentos de DNA amplificados (*amplicons*) de mesmo tamanho com marcadores terminais através da reação de PCR.

Após a purificação, os produtos amplificados são digeridos por enzimas de restrição selecionadas, produzindo fragmentos de tamanhos diferentes. A última etapa é realizada em um sequenciador automático, no qual os fragmentos marcados são identificados por densitometria e desenhado um perfil de picos com base no comprimento dos fragmentos. Esta técnica permite obter estimativas semi-quantitativas da importância relativa de cada fílotipo detectado e, em certos casos, permite através da comparação com banco de dados internacionais a identificação do gênero ou mesmo espécie correspondente ao comprimento do fragmento de cada eletroferograma.<sup>12,24,27,31,33</sup>

O DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) é um método que pode ser utilizado para amostras de solo, sedimento ou água. Consiste na amplificação de fragmentos do gene 16S rRNA e posterior corrida dos produtos da PCR em um gel com gradiente de desnaturação 30-60% ureia/formamida. Com base no grau de desnaturação, os fragmentos de DNA correm pelo gel, produzindo bandas em locais diferentes, possibilitando distinguir populações ao nível de gênero, estimar a diversidade bacteriana e comparar com outros locais, contaminados ou não com hidrocarbonetos, além da observação dos efeitos destes poluentes na diversidade bacteriana. Ainda é possível retirar e sequenciar as bandas obtidas no gel a fim de identificar as espécies presentes na comunidade. Esta técnica pode ser utilizada para identificar populações responsáveis pela descontaminação durante a biorremediação em associação com métodos de avaliação da taxa de degradação a fim de definir melhores estratégias para a remoção do poluente.<sup>5,20,24,25</sup>

TGGE (*temperature gradient gel electrophoresis*) é um método pelo qual fragmentos de DNA de mesmo tamanho, mas apresentando diferentes sequências são obtidos por PCR e podem ser diferenciados por eletroforese. A separação é baseada na diminuição da mobilidade eletroforética do fragmento de DNA parcialmente desnaturado em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear de temperatura. Assim, esta técnica segue a mesma lógica do DGGE, porém ao invés da desnaturação, utiliza-se um gradiente de temperatura para a separação dos fragmentos de DNA.<sup>24</sup>

SSCP (*single strand conformation polymorphism*) nesta técnica, a sequência de interesse do DNA é amplificada pela PCR usando iniciadores marcados. Os produtos resultantes da PCR são desnaturados e visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida, detectando-se mutações quando há alterações na motilidade das fitas simples. Assim, a

mutação pode ser posteriormente caracterizada por eluição do alelo mutado, que é usado para uma nova amplificação e sequenciamento. Uma importante aplicação deste método é avaliar se duas sequências de DNA são iguais, reduzindo a necessidade de sequenciamento. Apesar de haver algumas descrições do uso do SSCP na biologia de populações, esta técnica ainda é pouco usada a identificação de variações genéticas em ecologia molecular.<sup>24,34,35</sup>

A análise de RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) é conceitualmente simples; pequenas quantidades de DNA genômico total são submetidas à PCR utilizando iniciadores com sequência aleatória. O protocolo de amplificação difere das condições normais de PCR, em que apenas um único iniciador aleatório é empregado e é desnecessário o conhecimento prévio do genoma submetido à análise. O protocolo de análise por RAPD é realizado de acordo com métodos originais utilizando iniciadores curtos de sequência aleatória que são comercialmente disponíveis. Só moléculas de alto peso molecular, ou seja, DNA não degradado, devem ser submetidos a análises de RAPD. Os produtos de amplificação podem ser detectados por eletroforese em gel de agarose. A técnica possui várias aplicações potenciais em ecologia molecular, incluindo a determinação de identidades taxonômicas, detecção de fluxo gênico interespecíficos, análise de amostras misturadas, e produção de sondas específicas. Algumas limitações devem ser consideradas, por exemplo, o tamanho do iniciador irá determinar o grau de especificidade na digitalização do genoma; sua sensibilidade às condições de reação, em que pequenas mudanças nas condições podem afetar a reprodutibilidade dos produtos de amplificação. A técnica é sensível a temperatura, ao tipo de polimerase utilizado, ou a concentração de DNA. Apenas as condições de reação estritamente padronizadas irão garantir produtos de amplificação reprodutíveis. Além disso, a concentração ideal de DNA por reação pode variar substancialmente em condições específicas, dependendo do iniciador e do programa utilizado no termociclador.<sup>36</sup>

É importante ressaltar que todas as técnicas dependentes da PCR possuem uma limitação no que se refere à comparação de resultados, uma vez que os pesquisadores da área de biologia molecular utilizam diferentes conjuntos de iniciadores, explorando assim diferentes regiões do genoma. Além disso, o uso de iniciadores diferentes pode influenciar na eficiência de amplificação, dependendo da sensibilidade do iniciador para detectar DNA de populações menos representativas na mistura, bem como da especificidade do iniciador.<sup>31,32</sup>

A análise de ácidos graxos fosfolipídicos, componentes essenciais da membrana presentes em organismos vivos, pode ser utilizada para fornecer informações sobre a estrutura trófica (ao nível fenotípico) de comunidades microbianas. O uso de padrões de ácidos graxos fosfolipídicos, em geral, consiste em um método rápido e confiável para a detecção de mudanças na estrutura das comunidades microbianas dos solos e sedimentos e as variações detectadas podem estar relacionadas a mudanças no uso do solo, manejo e poluição, assim como nos sedimentos dos ecossistemas aquáticos continentais e marinhos.<sup>12</sup>

#### 4. Considerações Finais

---

Nas últimas décadas a contaminação ambiental por petróleo e derivados tem causado mobilização de empresas privadas e do poder público em todo o mundo e, com isso, tem aumentado a demanda de estudos de caracterização de microrganismos para a sua aplicação na biorremediação de compostos do petróleo. Para tal, faz-se necessário conhecer detalhadamente a diversidade e a dinâmica das comunidades microbianas presentes em diferentes ecossistemas; a ação de cada microrganismo no metabolismo de compostos específicos, gerados em diferentes fases da degradação do petróleo; bem como das vias metabólicas e consórcios microbianos utilizados para degradar os poluentes em cada ambiente ou em laboratório.

As técnicas de biologia molecular têm contribuído de maneira significativa para os estudos de comunidades microbianas, pois oferecem métodos rápidos, sensíveis, e precisos para analisar as bactérias e seus genes catabólicos no ambiente. Seu uso tem contribuído para o rápido crescimento dos bancos de dados, cada vez que os pesquisadores obtêm alta confiabilidade ao afirmar que uma espécie está presente na comunidade estudada. Elas têm permitido uma melhor caracterização das comunidades de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos e das adaptações celulares e fisiológicas das bactérias à presença dos poluentes, além dos mecanismos de acesso e captação das substâncias pelas células microbianas. Além disso, permitem comparações entre diferentes comunidades, o monitoramento das mudanças temporais resultantes de alterações nos parâmetros ambientais, a avaliação dos impactos de biorremediação e a modelagem ecológica. As informações obtidas a partir de estudos nesta área

proporcionam uma visão em longo prazo dos efeitos ecológicos causados pela contaminação com petróleo ou outros poluentes, como metais pesados e pesticidas.<sup>5,23,24</sup>

A associação entre os métodos dependentes de cultura e os métodos independentes permitiu o isolamento e a identificação de diversos microrganismos degradadores de compostos do petróleo; elaboração *in vitro* de consórcios microbianos com reconhecida capacidade degradativa e a produção em larga escala de tensoativos, como os biossurfactantes, que são utilizados na solubilização do petróleo, facilitando sua degradação. Além disso, estes estudos forneceram dados importantes sobre a diversidade de comunidades microbianas em ambientes naturais e o conhecimento da participação de cada organismo em processos biogeoquímicos em diversos ecossistemas. As técnicas descritas no presente artigo fornecem informações úteis para melhorar as estratégias de biorremediação, proporcionando maior segurança na escolha da técnica mais adequada para cada tipo de ecossistema.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório de Ciências Ambientais do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense pela infraestrutura. Este trabalho faz parte do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia sobre a Transferência de Material na Interface Continente – Oceano (CNPq Proc. 573.601/2008-9) e CER recebe apoio financeiro da FAPERJ (E- 26/102.697/2008; E- 26/112.037-2008); CNPq (Proc. 573.601/2008-9). ADG recebe apoio da CAPES (AUX-PE-PNPD-2303/2008) e RMCWT recebe apoio FAPERJ (E- 26/101.829/2008).

## Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Ferguson, A. S.; Huang, W. E.; Lawson, K. A.; Doherty, R.; Gibert, O.; Dickson, K. W.; Whiteley, A. S.; Kulakov, L. A.; Thompson, I. P.; Kalin, R. M.; Larkin, M. J. *J. App. Microbiol.* **2007**, *102*, 1227. [[CrossRef](#)]
- <sup>2</sup> Jacques, R. J. S.; Bento, F. M.; Antonioli, Z. I.; Camargo, F. A. O. *Ciênc. Rural* **2007**, *37*, 1192. [[CrossRef](#)]
- <sup>3</sup> Mandri, T.; Lin, J. *Afr. J. Biotechnol.* **2007**, *6*, 23. [[Link](#)]
- <sup>4</sup> Díaz, E. *Intern. Microbiol.* **2004**, *7*, 173. [[Link](#)]
- <sup>5</sup> Van Hamme, J. D.; Singh, A.; Ward, O. P. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 503. [[CrossRef](#)]
- <sup>6</sup> Widdel, F.; Rabus, R. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 259. [[CrossRef](#)]
- <sup>7</sup> Boopathy R. *Biores. Technol.* **2000**, *74*, 63. [[CrossRef](#)]
- <sup>8</sup> Braddock, J. F.; Lindstrom, J. E.; Yeager, T. R.; Rasley, B. T.; Brown, E. G.; *American Fisheries Society Symposium*, Bethesda, Estados Unidos, 1996. [[Link](#)]
- <sup>9</sup> Atlas, R. M. *Intern. Biodeter. Biodegr.* **1995**, *35*, 317. [[CrossRef](#)]
- <sup>10</sup> Crapez, M. A. C.; Borges, A. L. N.; Bispo, M. G. S.; Pereira, D. C. *Ciênc. Hoje* **2002**, *30*, 179.
- <sup>11</sup> Maciel, B. M.; Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Santa Cruz, Brasil, 2004. [[Link](#)]
- <sup>12</sup> Arias, M. E.; González-Pérez, J. A.; González-Vila, F. J.; Ball, A. S. *Intern. Microbiol.* **2005**, *8*, 13. [[PubMed](#)]
- <sup>13</sup> Seo, J.; Keyn, Y; Li, Q. X. *Intern. J. Environ. Res. Publ. Health* **2009**, *6*, 278. [[CrossRef](#)]
- <sup>14</sup> Foght J. J. *Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *15*, 93. [[CrossRef](#)]
- <sup>15</sup> Ramsay, M. A.; Swannell, R. P. J.; Shipton, W. A.; Duke, N. C.; Hill, R. T. *Mar. Pollut. Bull.* **2000**, *41*, 413. [[CrossRef](#)]
- <sup>16</sup> Wrenn, B. A.; Venosa, A. D. *Can. J. Microbiol.* **1996**, *42*, 252. [[CrossRef](#)]
- <sup>17</sup> Zilli, J. E.; Rumjanek, N. G.; Xavier, G. R.; Coutinho, H. L. C.; Neves, M. C. P. *Cad. Ciênc. Tecnol.* **2003**, *20*, 391. [[Link](#)]
- <sup>18</sup> Klingler, J. M.; Stowe, L R. P; Obenhuber, D. C.; Groves, T. O.; Mishra, S. K.; Pierson, D. L. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 2089. [[PubMed](#)]
- <sup>19</sup> Hopper, D. J. Em *Biodegradation: Natural and Synthetic Materials*; Betts, W. B., eds.; Springer-Verlag Limited: London, 1991, pp. 69-89.
- <sup>20</sup> Smith, M. R. *Biodegradation* **1990**, *1*, 191. [[CrossRef](#)]
- <sup>21</sup> Leahy, J. G.; Colwell, R. R. *Microbiol. Rev.* **1990**, *54*, 305. [[PubMed](#)]
- <sup>22</sup> Felske, A.; Wolterink, A.; van Lis, R.; de Vos, W. M.; Akkermans. A. D. L. *FEMS Microbiol. Ecol.* **1999**, *30*, 137. [[CrossRef](#)]
- <sup>23</sup> Nocker, A.; Burr, M.; Camper, A. K. *Microbiol. Ecol.*, **2007**, *54*, 276. [[CrossRef](#)]
- <sup>24</sup> Widada, J.; Nojiri, H.; Omori; T. *Appl. Microbiol.*

*Biotechnol.* **2002**, *60*, 45. [\[CrossRef\]](#)

<sup>25</sup> Committee on Metagenomics: Challenges and Functional Applications, National Research Council. (2007). *The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet*, Washington–DC, 170p. [\[Link\]](#)

<sup>26</sup> Amann, R.; Ludwig, W. *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**, *24*, 555. [\[CrossRef\]](#)

<sup>27</sup> Hugenholtz, P.; Pace, N. R. *Trends Biotechnol.* **1996**, *14*, 190. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

<sup>28</sup> Ramette. A. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 2495. [\[CrossRef\]](#)

<sup>29</sup> Sklarz, M. Y.; Angel, R.; Gillor, O.; Soares, M. I. M. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **2009**, *96*, 659. [\[CrossRef\]](#)

<sup>30</sup> Fisher, M. M.; Triplett, E. W. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 4630. [\[Link\]](#)

<sup>31</sup> Danovaro, R.; Luna, G. M.; Dell'Anno, A.; Pietrangeli, B. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 5982. [\[CrossRef\]](#)

<sup>32</sup> Cardinale, M.; Brusetti, L.; Quatrini, P.; Borin, S.; Puglia, A. M.; Rizzi, A.; Zanardini, E.; Sorlini, C.; Corselli, C.; Daffonchio, D. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 6147. [\[CrossRef\]](#)

<sup>33</sup> Marsh, T. L. *Curr. Opin. Microbiol.* **1999**, *2*, 323. [\[CrossRef\]](#)

<sup>34</sup> Sunnucks, P.; Wilson, A. C. C.; Beheregaray, L. B.; Zenger, K.; French, J.; Taylor, A. C. *Mol. Ecol.* **2000**, *9*, 1699. [\[CrossRef\]](#)

<sup>35</sup> Hayashi, K. *Genome Res.* **1991**, *1*, 34. [\[CrossRef\]](#)

<sup>36</sup> Hadrys, H.; Balick, M.; Schierwatert, B. *Mol. Ecol.* **1992**, *1*, 55. [\[CrossRef\]](#)