



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA NÍVEL
MESTRADO

**INVESTIGAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE O POTENCIAL DE
BIORREMEDIAÇÃO E A PRODUÇÃO DE OXIDORREDUTASES
POR *Pseudomonas aeruginosa***

RAFAEL LIMONGI DE SOUZA

João Pessoa – PB

2018

RAFAEL LIMONGI DE SOUZA

**INVESTIGAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE O POTENCIAL DE
BIORREMEDIAÇÃO E A PRODUÇÃO DE OXIDORREDUTASES
POR *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em
Biotecnologia Nível Mestrado
para obtenção do grau de Mestre
em Biotecnologia.

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral
Orientador

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
Coorientador

João Pessoa – PB

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catálogo e Classificação

S729i Souza, Rafael Limongi de.

INVESTIGAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE O POTENCIAL DE
BIORREMEDIAÇÃO E A PRODUÇÃO DE OXIDORREDUTASES POR
Pseudomonas aeruginosa / Rafael Limongi de Souza. -
João Pessoa, 2018.

72 f. : il.

Orientação: Ian Porto Gurgel do Amaral.

Coorientação: Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBiotec.

1. Biorremediação. 2. Hidrocarbonetos Aromáticos
Policíclicos. 3. Aspergillus Niger. 4. Ensaio
Enzimático. I. Amaral, Ian Porto Gurgel do. II. Título.

UFPB/BC

Rafael Limongi de Souza

**INVESTIGAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE O POTENCIAL DE
BIORREMEDIAÇÃO E A PRODUÇÃO DE OXIDORREDUTASES
POR *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Nível Mestrado como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em: 30 de Novembro de 2018.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral
(Orientador)



Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
(Coorientador)



Profª Sharline Florentino de Melo Santos
(Examinadora)



Profª Drª Adna Cristina Barbosa de Sousa
(Examinadora)

Dedico este trabalho a minha família por todo apoio, carinho e presença em toda minha jornada dentro da universidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter permitido que eu tivesse a oportunidade em ingressar em uma Universidade Federal, cursar um mestrado e ter tido o luxo em ter apenas os estudos como atividade principal.

Agradeço imensamente aos meus dois orientadores, Ian Amaral e Ulrich Vasconcelos, por me aceitarem como orientando. Ao longo destes dois anos de mestrado sempre se mostraram presentes, nunca hesitaram em esclarecer quaisquer dúvidas, muito menos de conversar e discutir sobre as ideias. Ainda, agradeço pela liberdade de pensamento e por aceitarem diversas das minhas propostas experimentais ao longo desses dois anos. Não há como mensurar o aprendizado, desde simples conversas até as correções propostas ao longo do trabalho.

Agradeço o companheirismo e colaboração dos integrantes do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA), em especial, Bianca, Patrick, Vinícius e Kaíque, sem eles nenhuma etapa deste trabalho teria acontecido. Também agradeço a Thiago, que nunca hesitou em me ensinar e ajudar durante os experimentos, e a Adrielly por me auxiliar nas atividades espectrofotométricas.

Agradeço a todos os professores que permitiram que o experimento fossem realizado, sem a colaboração das professoras Andrea Almeida, Fabíola Nunes e Sandra Mascarenhas, e ao professor Kristerson Freire, muito dos meus resultados não seriam obtidos.

Também agradeço aos meus pais, Lourdes e Marcos, que sempre apoiaram e incentivaram minhas decisões. Agradeço imensamente pela educação que recebi, e que hoje reflete em quem sou.

Agradeço aos meus irmãos, Rodrigo, Leonnardo, Brunno e Giulia Limongi.

Agradeço a Lays, pelo apoio imensurável e companheirismo desde a minha graduação até agora.

À minha banca examinadora, agradeço por aceitarem o convite, e pelos comentários que vão enriquecer este trabalho.

RESUMO

Ambientes contaminados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são desafios que podem ser minimizados com o uso de microrganismos com potencial de degradação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de degradação do antraceno e pireno por um isolado de *Pseudomonas aeruginosa* e correlacionar com a atividade da lacase e manganês peroxidase. Foram avaliados três isolados de *Pseudomonas aeruginosa* (TGC-02, 03 e 07) e um controle positivo com *Aspergillus niger*. Os experimentos foram divididos em duas etapas: inicialmente realizou-se uma triagem com os isolados de *P. aeruginosa*, submetidas a testes de emulsificação e de colapso de gota. A maior atividade hidrocarbonoclástica foi observada para o isolado TGC-02, que degradou mais de 30% dos contaminantes testados. Posteriormente, foram conduzidos os ensaios de biodegradação dos contaminantes antraceno e pireno pelo isolado selecionado TGC-02 e comparado com um isolado de *A. niger*. Os ensaios duraram 25 dias, à temperatura ambiente, em microcosmos contendo 30 mL de água destilada, contaminada com 50 mg/L do pireno ou antraceno, sob incubação estática. Para cada ponto de análise, foi mensurado pH, biomassa, viabilidade celular, proteínas totais e atividade enzimática. O teor dos contaminantes foi determinado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de chama após 25 dias do bioprocessamento. Não foi observada atividade específica para lacase ou manganês peroxidase nos isolados testados, não sendo possível correlacionar a capacidade de degradação com a atividade específica destas enzimas. Entretanto, ao analisar os resultados de proteínas totais, observou-se que ao longo dos 25 dias houve aumento nas concentrações de proteínas totais em presença dos contaminantes, especialmente para *P. aeruginosa* TGC-02. O isolado TGC-02 e *A. niger* cultivadas em presença dos contaminantes apresentaram viabilidade ao longo de 20 dias do bioprocessamento. Descontadas as perdas abióticas, O controle positivo *A. niger* degradou 28,11% e 30,70% do pireno e antraceno, respectivamente. Já *P. aeruginosa* TGC-02 apresentou melhores resultados, reduzindo pireno e antraceno em 37,83% e 33,01%, respectivamente. O *A. niger* é um fungo conhecido como agente de degradação de compostos aromáticos, entretanto, neste trabalho a *P.*

aeruginosa se mostrou mais eficiente na degradação de pireno e antraceno do meio líquido em 25 dias. Os resultados demonstram potencial de biorremediação da *P. aeruginosa* para remoção de pireno e antraceno, aparentemente independente da produção de manganês peroxidase e lacase.

Palavras-chaves: Biorremediação, Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, *Aspergillus niger*, atividade enzimática.

ABSTRACT

Environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons are challenges that can be minimized with the use of microorganisms with degradation potential. The objective of this work was to evaluate the degradation capacity of anthracene and pyrene by a *Pseudomonas aeruginosa* isolate and to correlate with laccase and manganese peroxidase activity. Three isolates of *Pseudomonas aeruginosa* (TGC-02, 03 and 07) and one positive control with *Aspergillus niger* were evaluated. The experiments were divided into two steps: screening with *P. aeruginosa* isolates was initially screened for emulsification and drop collapse tests. The higher hydrocarboclastic activity was observed for the TGC-02 isolate, which degraded more than 30% of the contaminants tested. Subsequently, the biodegradation assays of the anthracene and pyrene contaminants by the selected TGC-02 isolate and compared to an *A. niger* isolate were conducted. The assays lasted 25 days at room temperature in microcosms containing 30 mL of distilled water, contaminated with 50 mg / L of pyrene or anthracene, under static incubation. For each point of analysis, pH, biomass, cell viability, total proteins and enzymatic activity were measured. The content of the contaminants was determined by gas chromatography coupled to flame spectrometry after 25 days of the bioprocess. No specific activity was observed for laccase or manganese peroxidase in the tested isolates, and it was not possible to correlate the degradation capacity with the specific activity of these enzymes. However, when analyzing the total protein results, it was observed that during the 25 days there was an increase in the concentrations of total proteins in presence of the contaminants, especially for *P. aeruginosa* TGC-02. The TGC-02 and *A. niger* isolates cultured in the presence of the contaminants presented viability during the 20 days of the bioprocess. Discounting the abiotic losses, the positive control *A. niger* degraded 28.11% and 30.70% of the pyrene and anthracene, respectively. *P. aeruginosa* TGC-02 presented better results, reducing pyrene and anthracene in 37.83% and 33.01%, respectively. *A. niger* is a fungus known as a degradation agent of aromatic compounds, however, in this work *P. aeruginosa* proved to be more efficient in the degradation of pyrene and anthracene in the liquid medium in 25 days. The results demonstrate the potential

of bioremediation of *P. aeruginosa* for the removal of pyrene and anthracene, apparently independent of the production of manganese peroxidase and laccase.

Keywords: Bioremediation, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Aspergillus niger*, enzymatic activity.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs).....	16
2.2 Microrganismo e Degradação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	21
2.2.1 Bactérias.....	21
2.2.2 Mecanismo de degradação microbiana de HPA.....	22
2.3 Biorremediação	27
3.1 Objetivos Específicos.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Local dos experimentos e estratégia experimental	31
4.2 Experimentos de Triagem	32
4.2.1 Índice de Emulsificação	32
4.2.2 Colapso de Gota.....	33
4.3 Experimento de Biorremediação	34
4.3.1 Contaminantes.....	34
4.3.2 Isolados	34
4.3.3 Desenho experimental	34
4.3.4 Viabilidade Celular.....	37
4.3.5 Ensaio Enzimáticos.....	38
4.3.6 Biomassa	39
4.3.7 Monitoramento de Temperatura	39
4.4 pH	39
4.5 Determinação da concentração dos HPAs	39
5. RESULTADOS	41
5.1 Experimento de Triagem.....	41
5.1.1 Índice de Emulsificação	41
5.1.2 Colapso de gota.....	42
5.2 Experimento de Biorremediação	42
5.2.1 Isolados	42
5.2.2 Crescimento celular da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC-02.....	43
5.2.3 Crescimento celular de <i>Aspergillus niger</i>	45

5.2.4 Variação de temperatura	48
5.5 Ensaio enzimático	48
5.6 Proteína total.....	48
5.6.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC-02.....	48
5.6.2 <i>Aspergillus niger</i>	50
5.7 Degradação de Hidrocarboneto Policíclico Aromático (HPA)	51
6. DISCUSSÃO	53
6.1 Experimento de triagem	53
6.2 Biorremediação	55
7. CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS.....	60
APÊNDICES.....	68
APÊNDICE I: DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS PARA PROTEÍNAS TOTAIS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC-02.....	69
APÊNDICE II: DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS PARA PROTEÍNAS TOTAIS DE <i>Aspergillus niger</i>	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas dos 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos prioritários da USEPA.	18
Figura 2. Utilização microbiana de compostos aromáticos por via aeróbia e anaeróbia, demonstrando os diferentes aceptores de elétrons na respiração.	20
Figura 3. Possíveis rotas de degradação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos por bactérias.	23
Figura 4. Representação de duas reações enzimáticas envolvidas com a degradação de compostos aromáticos por monooxigenases e dioxigenases.	25
Figura 5. Reação enzimática reversível mediada pela Lacase.	26
Figura 6. Reação enzimática reversível mediada pela Manganês Peroxidase.	26
Figura 7. Estratégia Experimental	31
Figura 8. Composição dos microcosmos.	35
Figura 9. Distribuição dos grupos experimentais de acordo com os isolados e tipo de contaminante.	36
Figura 10. Microcosmos utilizados ao longo do bioprocessamento	37
Figura 11. Índice de Emulsificação (IE _{48h}) ao longo de 48h de incubação em petroderivados.	41
Figura 12. Variação de biomassa e pH do grupo controle (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC-02), isenta de contaminantes.	43
Figura 13. Variação de biomassa e pH do grupo experimental (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC-02) acrescida de Pireno (50mg/L).	44
Figura 14. Variação de biomassa e pH do grupo experimental (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC-02) acrescida de Antraceno (50mg/L).	45
Figura 15. Variação de biomassa e pH do grupo controle (<i>Aspergillus niger</i>) isenta de contaminantes.	46
Figura 16. Variação de biomassa e pH do grupo experimental (<i>Aspergillus niger</i>) acrescida de Pireno (50mg/L).	47

Figura 17. Variação de biomassa e pH do grupo experimental (<i>Aspergillus niger</i>) acrescida de Antraceno (50mg/L).....	47
Figura 18. Resultados referente a variação de temperatura. Apresentados em média e desvio padrão.....	48
Figura 19. Curva de calibração padrão para proteína total.	49
Figura 20. Variação da concentração de proteína total para <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> TGC-02 ao longo de 25 dias em diferentes condições de cultivo.	50
Figura 21. Variação da concentração de proteína total para <i>Aspergillus niger</i> ao longo de 25 dias em diferentes condições de cultivo.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Característica de 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.....	17
Tabela 2. Local de isolamento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
Tabela 3. Tempo (h) de observação da descoloração do indicador redox DCPIP	42
Tabela 4. Percentual de degradação do pireno e antraceno pelos isolados após 25 dias	52

1 INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) compreendem uma das mais importantes classes de contaminantes lançados no ambiente, especialmente água e solo. Estes hidrocarbonetos podem ser produzidos de forma natural, em ambientes de pressão e temperatura elevadas, como é o caso de erupções vulcânicas ou incêndios florestais, entretanto a atividade humana é a maior fonte de lançamento destes compostos no ambiente (AZEVEDO et al., 2013). Com o desenvolvimento da sociedade e o aumento do consumo de derivados do petróleo, as formas de produção e emissão se diversificaram. Diversos são os produtos que contém HPAs que são descartados de forma incorreta. Ainda, em ambientes onde há armazenamento de combustíveis, como postos de combustíveis, acidentes por falta de manutenção das instalações podem resultar em contaminação do solo, atingindo lençóis freáticos e aquíferos. Dada suas propriedades físico-químicas, as formas de contaminação por HPAs podem ser variadas e sua persistência no ambiente também (RAVINDRA et al., 2008).

Ambientes contaminados por HPAs são desafios que devem ser resolvidos devidos aos efeitos negativos na biota. No entanto, a degradação espontânea destes compostos é um processo lento. Desta forma, os isolados podem ser utilizados para diminuir o tempo de remoção de contaminantes do ambiente. Como bem relatado na literatura, fungos lignocelulolíticos possuem metabolismo propício à degradação de compostos aromáticos, como é o caso de HPAs, sendo eles relatados como agentes biorremediadores (BALAJI, ARULAZHAGAN e EBENEZER, 2014). Bactérias também são potenciais agentes de descontaminação, como é o caso da *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria Gram-negativa aeróbia. O gênero *Pseudomonas* se caracteriza por compreender organismos metabolicamente versáteis, hábeis em utilizar mais de 90 moléculas diferentes como fonte de carbono e energia, incluindo HPAs. A capacidade de degradação de HPA por *Pseudomonas* pode ser explicada pela presença de diversos outros compostos aromáticos e policíclicos presentes na natureza (MERCANTE et al., 2008).

Para ocorrer a degradação de HPAs, é necessária a quebra de suas ligações moleculares em compostos mais simples e assimiláveis ao metabolismo microbiano. Sabe-se que enzimas da família das oxirredutases e peroxidases atuam em compostos aromáticos formando catecóis e ácido cis-cis-mucônico, que podem participar do ciclo do ácido cítrico (XU E BOLLAG, 1999).

Mediante o exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de degradação do antraceno e pireno de um isolado de *P. aeruginosa* e correlacionar com a atividade da lacase e manganês peroxidase.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Os HPAs formam um grupo de compostos orgânicos, caracterizados pela presença de dois ou até mais de vinte anéis aromáticos ou cicloalcanos, condensados e rearranjados em diferentes configurações (KIM et al., 2013). Dentro dos contaminantes orgânicos presentes no ambiente, os HPAs são os mais comuns, bem como os mais investigados quanto aos seus efeitos biológicos (AZEVEDO et al., 2013). Além disso, os HPAs são mutagênicos e carcinogênicos e muitos deles recebem a classificação B-2 pela IARC (Agência Nacional de Pesquisa em Câncer), isto significa que possuem provável atividade carcinogênica em humanos (US EPA).

Os HPAs podem se originar de diferentes atividades geoquímicas ou antropogênicas. Os processos geoquímicos de exposição às altas temperaturas e pressões permitem a formação desses compostos (VASCONCELOS, 2011). No entanto, os HPAs são lançados no ambiente em mais de 90% dos casos pela atividade humana. Sua ocorrência generalizada é oriunda da combustão incompleta de materiais orgânicos, como lixo, tabaco e matéria vegetal, assim como por incêndios, queima de combustíveis fósseis e atividades vulcânicas (ZHANG e TAO, 2009; KIM et al., 2013). Ressalta-se que nos países em desenvolvimento, o carvão, a madeira e resíduos de lavoura são as principais fontes de energias domésticas, contribuindo de forma significativa para a emissão de HPAs nestes ambientes (JENKINS et al., 1996). Também existem as fontes móveis, que nas quais podemos incluir a combustão de combustíveis por aeronaves, navios, ferrovias e automóveis urbanos (AZEVEDO et al., 2013).

Quimicamente, os HPAs podem ser divididos em duas categorias: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de baixa massa molecular, com dois e três anéis e os HPAs de alta massa molecular, com quatro ou mais anéis (MASIH et al., 2012; KIM et al., 2013). Os HPAs de baixo peso molecular são comumente emitidos em sua fase gasosa, enquanto os de alta massa molecular são mais frequentemente emitidos associados a partículas em suspensão (RAVINDRA et al., 2008). As propriedades físico-químicas dos HPAs os tornam altamente móveis no ambiente, permitindo que sejam transportados pelo ar, solo e água

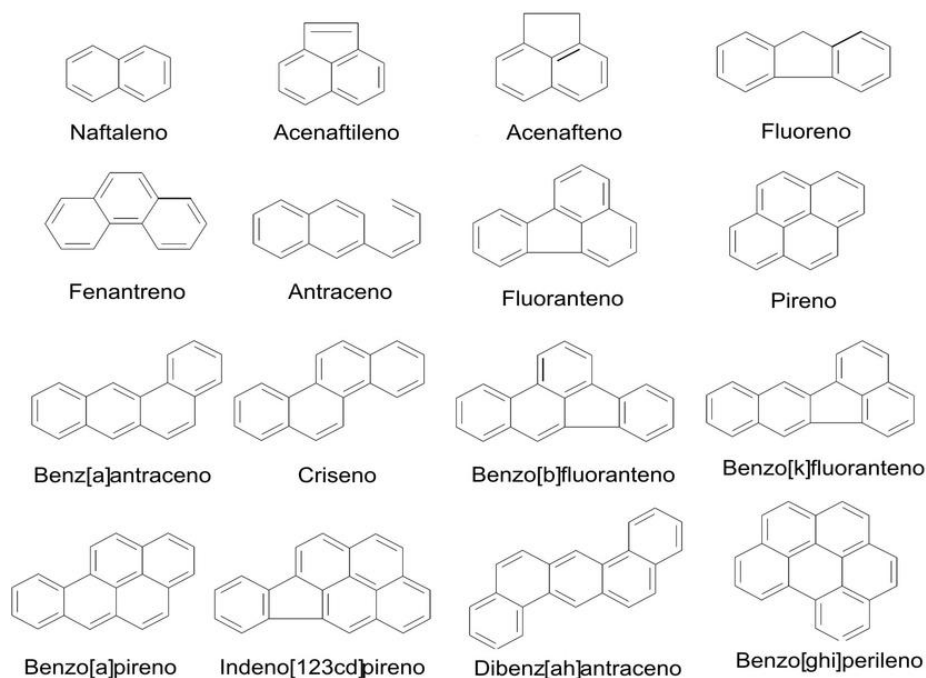
(BAKLANOV et al., 2007). Na Tabela 1 pode-se observar o número de anéis e fórmulas químicas dos 16 principais HPAs, cujas estruturas são mostradas na Figura 1.

Tabela 1. Característica de 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.

Nome do composto	nº anéis	Fórmula
Naftaleno	2	C ₁₀ H ₈
Acenaftileno	3	C ₁₂ H ₁₀
Acenafteno	3	C ₁₂ H ₈
Fluoreno	3	C ₁₃ H ₁₀
Fenantreno	3	C ₁₂ H ₁₀
Antraceno	3	C ₁₄ H ₁₀
Fluoranteno	4	C ₁₆ H ₁₀
Pireno	4	C ₁₆ H ₁₀
Benzo[a]antraceno	4	C ₁₈ H ₁₂
Criseno	4	C ₁₈ H ₁₂
Benzo[b]fluoranteno	5	C ₂₀ H ₁₂
Benzo[k]fluoranteno	5	C ₂₀ H ₁₂
Benzo[a]pireno	5	C ₂₀ H ₁₂
Dibenzo[a,h]antraceno	5	C ₂₂ H ₁₂
Benzo[g,h,i]perileno	6	C ₂₂ H ₁₂
Indenol[1,2,3]pireno	6	C ₂₂ H ₁₂

Fontes: Vasconcelos (2011); Kim et al. (2013);

Figura 1. Estruturas químicas dos 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos prioritários da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos.



Fonte: Vasconcelos, 2011.

Os HPAs possuem baixa solubilidade em água, e esta propriedade diminui de acordo com o aumento do número de anéis. Ainda, pode-se utilizar o coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) e o coeficiente de partição carbono orgânico/água (K_{oc}) como indicativo de capacidade de mobilidade desses compostos na água. Quanto maior o valor destes coeficientes, maior a afinidade deste ao solo, e menor sua mobilidade em água (MONTEIRO, TAVARES e SILVA, 2016). Os HPAs apresentam coeficiente de partição octanol/água superiores a 1000, evidenciando grande afinidade lipofílica de acordo com o aumento no número de anéis aromáticos da molécula (OCHS, FURTADO e PEREIRA-NETTO, 2015). A volatilidade deste grupo de compostos é inversamente proporcional ao número de anéis presente na estrutura.

Dado o potencial hidrofóbico, os HPAs são absorvidos pelos mamíferos, através de rotas de exposição dérmica, ingestão ou inalação. O mecanismo de toxicidade é considerado pela sua interferência na função da membrana celular

assim como desestabilização de enzimas associada a membranas (ARMSTRONG et al., 2004). Dentre eles, o benzeno, antraceno e pireno são destacados como os mais tóxicos (KIM et al., 2013; HUSSEIN e MANSOUR, 2016).

As causas de contaminação do solo e água por HPAs são variadas, mas seus efeitos convergem para o desbalanceamento do ecossistema local, levando a danos tanto econômicos quanto para saúde dos organismos (JIANG e YU, 2014).. Quando absorvidas, não há interação direta com o material genético, os HPAs sofrem ação enzimática por ativação do citocromo P450, formando metabólitos de natureza eletrofílica. Existem quatro possíveis mecanismos envolvidos, que são: (a) oxidação enzimática de hidrólise com formação de diolepóxidos; (b) Formação de ésteres benzílicos e eletrofílicos por reações de substituição; (c) Produção de radicais catiônicos; (d) De-hidrogenação enzimática, produzindo quinonas capazes de reagirem com o DNA (BERNARDO et al., 2016; MONTEIRO, TAVARES e SILVA, 2016).

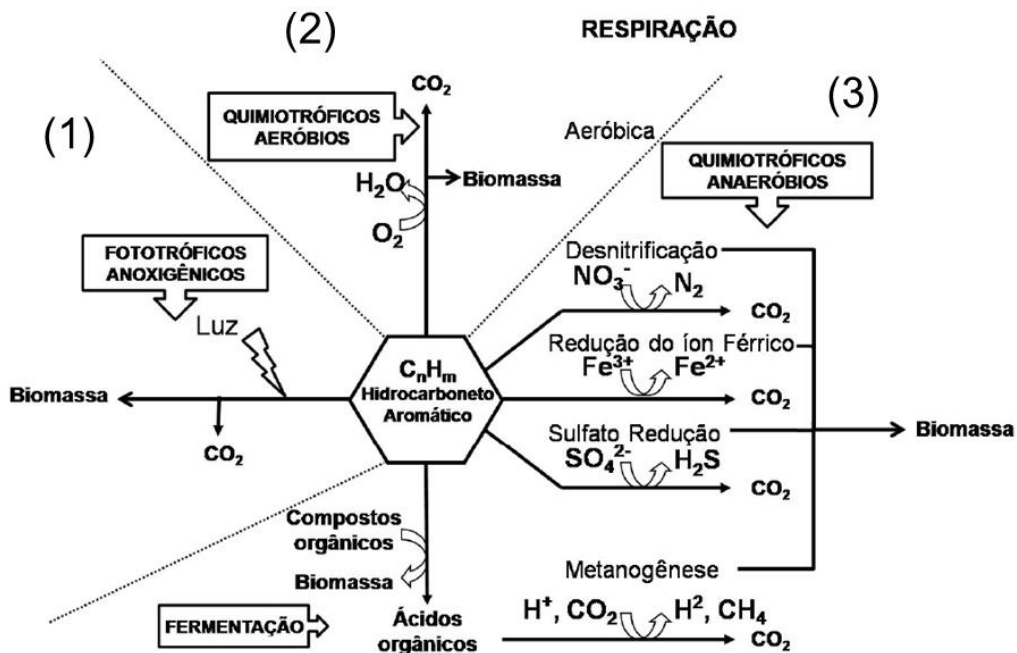
A contaminação do solo por hidrocarbonetos derivados do petróleo surge como um grande desafio, devido a complexidade da composição química e a variação das propriedades físico-químicas, geoquímicas e bioquímicas de sua adição ao solo (HEIDERSCHEIDT et al., 2016).

Quando ocorre o derramamento de gasolina em solos, por exemplo, uma das principais preocupações é a contaminação de lençóis de água subterrânea, que podem carrear esse xenobiótico até os aquíferos (ANDRADE, AUGUSTO e JARDIM, 2010). Quando um contaminante desta classe entra em contato com o solo, ele passa por processos de sorção, advecção, dissolução ou volatilização. Todos estes, translocando-o através da matéria sólida sem alterar sua conformação química. Posteriormente, podem passar por processos degradativos que alteram sua estrutura química (SWOBODA-COLBERG, 1995).

Os mecanismos de degradação que podem atuar nos HPAs na subsuperfície são: retenção por adsorção às partículas do solo; retenção da fase dissolvida por capilaridade; perda por volatilização; transporte na fase aquosa; transporte na fase líquida pura; atividade biológica; reações de oxidação e redução (OLIVEIRA, 2017).

Bactérias anoxigênicas podem converter HPAs em CO_2 por atividade fototrófica (Figura 2). Ainda, bactérias aeróbias podem degradar estes hidrocarbonetos liberando água e CO_2 no meio. Em ambiente anaeróbio, diferentes processos bioquímicos podem ocorrer, incluindo a fermentação do HPA como fonte de carbono liberando ácidos orgânicos (WETLER-TONINI, REZENDE E GRATIVOL, 2010). A necessidade de entendimento da diversidade metabólica surge como fonte de estudo de possíveis agentes bacterianos para remediação destes contaminantes.

Figura 2. Utilização microbiana de compostos aromáticos por via aeróbia e anaeróbia, demonstrando os diferentes aceptores de elétrons na respiração.



(1) Rota metabólica em presença de luz, por bactérias fototróficas anoxigênicas; (2) Rota metabólica em presença de O_2 , por bactérias aeróbias; (3) Rotas metabólicas anaeróbias, com liberação de CO_2 ou fermentação. Fonte: Modificado de WETLER-TONINI, REZENDE E GRATIVOL, (2010).

2.2 Microrganismo e Degradação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

2.2.1 Bactérias

A biomassa microbiana pode ser considerada como a parte viva da matéria orgânica, que, para o ciclo do carbono, representa o compartimento central desta atividade (MERCANTE et al., 2008). Entretanto, o equilíbrio dos nutrientes presentes no meio pode ser alterado em presença de compostos que não são comuns aquele bioma, por exemplo os xenobióticos como os metais pesados, herbicidas e derivados do petróleo. Nessas situações, os isolados sofrem pressões seletivas, que irão promover alterações moleculares, resultando em tolerância, resistência e multirresistência a antibióticos, degermantes, metais pesados, altas concentrações de sais e uma miríade de diferentes moléculas tóxicas e a outros isolados que não foram capazes de se adaptar (DE VOS et al., 1997; TOP e SPRINGAEL, 2003). As bactérias resistentes podem adquirir essas informações genéticas por transferência horizontal de genes, assim as células individuais mais adequadas para resistir ou degradar os xenobióticos serão selecionadas e persistirão no ambiente hostil constituindo a maior fração da comunidade microbiana total do que antes da presença do xenobiótico (HACKER e CARNIEL, 2001; TOP e SPRINGAEL, 2003). Segundo Alonso et al. (2009).

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo ubíquo, Gram-negativo, aeróbio e monotríquio, com faixa de temperatura de crescimento estabelecida entre 25-42 °C, com preferência a habitats de água doce (SCHROETER, 1872; MIGULA, 1894; 1900 *apud* SHORTER BERGY'S MANUAL, 1994). A literatura relata o isolamento desta espécie de diferentes ambientes, como solo, plantas, alimentos, fezes, rizosfera, piscinas, saunas, aquíferos sob cemitérios e até mesmo água engarrafada (TSORAEVA e MARTINEZ, 2000; ZAGO et al., 2001; DUBOIS et al., 2001; CAVALCANTI, 2017). Em meio de cultura, esta espécie produz 2-aminoacetofenona, composto presente em frutas, atribuindo à cultura odor adocicado. Ainda, é descrito na literatura a versatilidade metabólica desta espécie quanto à ambientes hostis, capacidade de produção de pigmentos fenazínicos, bem como a organização em biofilme (CAVALCANTI,

2017). *Pseudomonas aeruginosa* é relatada como um dos organismos com melhor capacidade de adaptação a mudanças ambientais. Segundo Scott-Thomaz (2010), com um genoma de apenas 6,3 Mpb,.

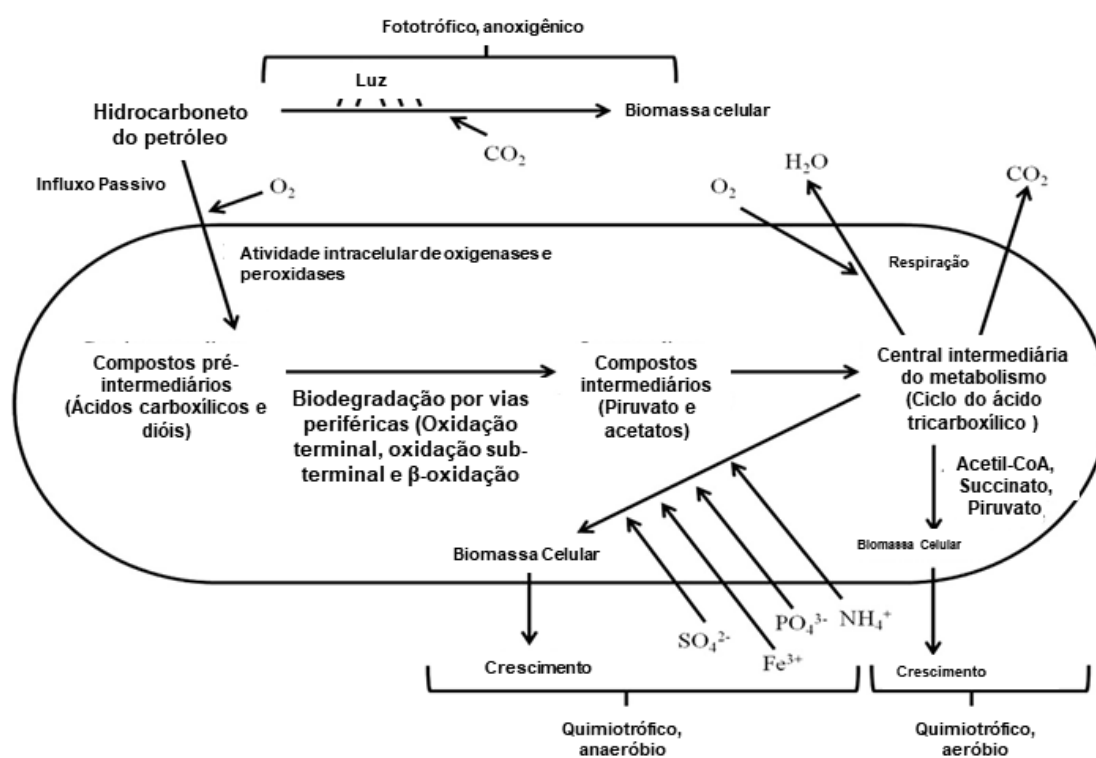
P. aeruginosa apresenta versatilidade tão eficiente que pode ser cultivada em meios desprovidos de fatores de crescimento e utilizar mais de 90 moléculas como fonte de carbono e energia. Devido a estas características, a *Pseudomonas aeruginosa* se mostra como um potencial agente de remoção de diversos xenobióticos empregando técnicas de biorremediação. A presença de HPAs em toda a biosfera, por exemplo, pode explicar a capacidade da espécie em utilizar esta classe de compostos como substrato de crescimento (WETLER-TONINI, REZENDE e GRATIVOL, 2010).

2.2.2 Mecanismo de degradação microbiana de HPA

As maiores frações do petróleo, de 60% a 90%, são biodegradáveis. Entretanto, o restante em estado bruto ou refinado é considerado recalcitrante e seu destino irá depender de uma gama de fatores, dentre eles, a degradação microbiana (WETLER-TONINI, REZENDE e GRATIVOL, 2010).

Para ocorrer a biodegradação dos HPAs é necessária a quebra de ligações moleculares em compostos mais simples, com baixa ou nenhuma toxicidade, e que possam participar de rotas metabólicas de isolados. A remoção de compostos orgânicos tóxicos por várias espécies de bactérias, fungos e plantas superiores pode ser mediada por oxirredutases (BOLLAG E DEC, 1998; GIANFREDA, XU E BOLLAG, 1999). Os isolados extraem energia por via de reações bioquímicas mediadas por enzimas que clivam ligações químicas e permitem a transferência de elétrons do substrato orgânico reduzido (doador) para outro composto orgânico (aceptor)(KARIGAR e RAO, 2011). Em *P. aeruginosa*, assim como para outras bactérias, a quebra de compostos aromáticos pode ser feita aerobicamente ou anaerobicamente (Figura 3).

Figura 3. Possíveis rotas de degradação de HPA por bactérias.



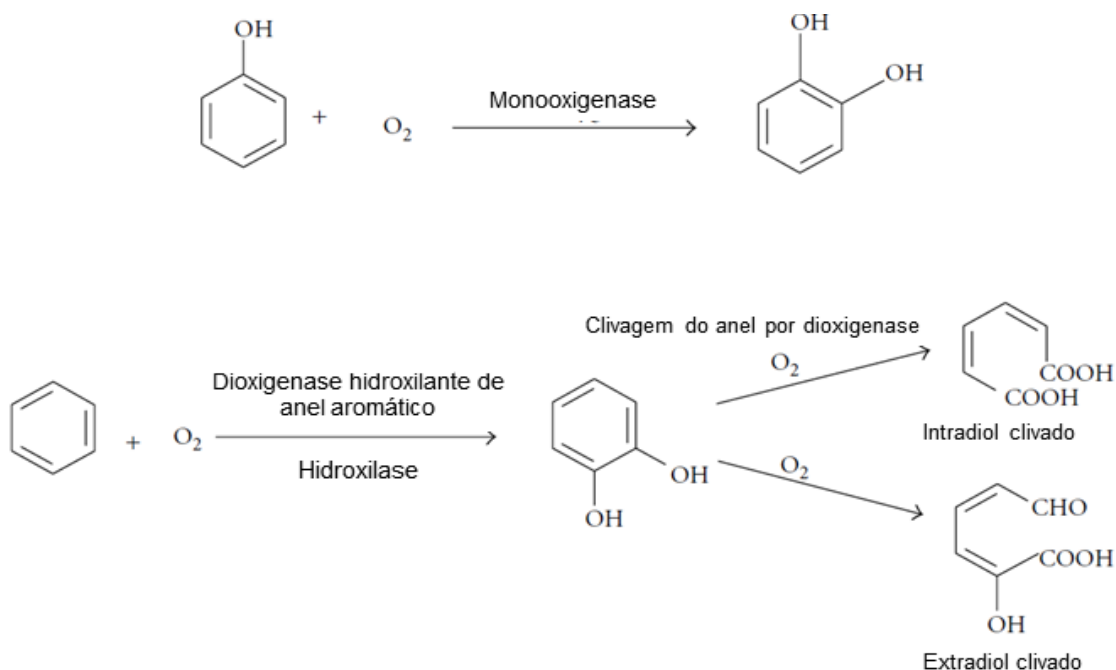
Fonte: Adaptado de Sunita e Varjani (2017).

As rotas de biodegradação em *Pseudomonas* ainda não estão totalmente elucidadas. Entretanto, Sunita e Varjani (2017) propõe três rotas metabólicas que convergem as propostas por Haritash e Kaushik (2009), ambos evidenciam o metabolismo aeróbio dos HPAs. Na primeira etapa do metabolismo aeróbio, o composto aromático é transformado em um metabólito intermediário e central na via de degradação de HPA, geralmente, o catecol e acetatos. O catecol sofre ações de enzimas de fissão, sendo convertido em dois intermediários utilizados na geração de carbono e energia. O anel do catecol é clivado por dioxigenases, adicionando uma molécula de oxigênio ao anel. Conseqüentemente é formado o ácido cis-cis-mucônico por oxigenases intradiol, enquanto as di-oxigenases extradiol produzem o semialdeído 2-hidroximucônico (HARITASH e KAUSHIK, 2009; FUENTES et al., 2014). Os produtos resultantes são convertidos em intermediários no ciclo do ácido cítrico. O ácido cis-cis-mucônico é convertido em succinato e acetil-CoA, e o semialdeído em ácido pirúvico e acetaldeído (WETLTER-TONINI, REZENDE e GRATIVOL, 2010).

Fungos lignocelulolíticos vêm sendo estudados devido a sua capacidade de produzir enzimas extracelulares com extrema especificidade por determinados tipos de substrato, dentre eles, lignina. Os fungos lignocelulolíticos possuem esta atividade por produzirem peroxidases que oxidam diretamente o substrato orgânico. O sistema lignolítico fúngico apresenta três grupos principais de enzimas: lignina peroxidases, manganês peroxidases e fenóis oxidases, como a lacase (BALAJI, ARULAZHAGAN e EBENEZER, 2014; LEE et al., 2014; KADRI et al., 2016). Na maioria das espécies fúngicas, as peroxidases são geralmente reconhecidas como sendo famílias de isoenzimas que ocorrem como proteínas glicosiladas extracelulares, sendo o padrão de glicosilação responsável pela sua estabilidade (CHANDRA e CHOWDHARY, 2015; KADRI et al., 2016). Entretanto, estudos mostram que bactérias também possuem peroxidases com funções semelhantes (GAUR, NARASIMHULU e PYDISSETY, 2018; KUMAR e CHANDRA, 2018).

As oxigenases pertencem à família das oxirredutases. Elas participam da oxidação e redução de substratos a partir da transferência de oxigênio utilizando como co-substrato FAD/NADH/NADPH (KARIGAR e RAO, 2011). As oxigenases podem ser divididas em duas subcategorias: Monooxigenases e Dioxigenases, baseada no número de oxigênio que é inserido na molécula (Figura 4). As oxigenases possuem um largo espectro de atividade em compostos, incluindo compostos organoclorados, halogenados e derivados do petróleo (FOX et al., 1990; ARORA, KUMAR e CHAUHAN, 2009). A classe das monooxigenases participam da dessulfuração, desalogenação, desnitrificação, amonificação, hidroxilação, biotransformação e biodegradação de vários compostos aromáticos e alifáticos (GROSSE et al., 1990). A classe das dioxigenases possuem enzimas que introduzem duas moléculas de oxigênio em seu substrato.

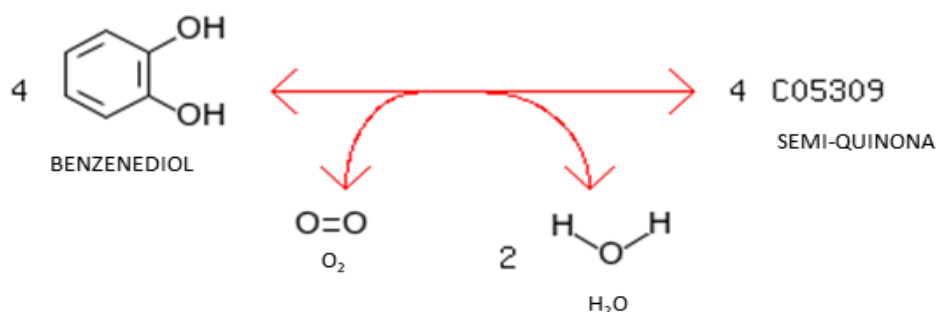
Figura 4. Representação de duas reações enzimáticas envolvidas com a degradação de compostos aromáticos por monooxigenases e dioxigenases.



Fonte: KARIGAR e RAO, 2011.

A lacase (Lac) (EC 1.10.3.2; benzodiól: oxigênio oxirredutase) pertence à família das oxidases de cobre que tem a capacidade de oxidar fenóis, polifenóis e anilinas em presença de peróxido de hidrogênio ou dioxigênio (Figura 5) (TAVARES et al., 2016; GAUR, NARASIMHULU e PYDISETTY, 2018). Esta enzima já vem sendo estudada por sua capacidade em oxidar pireno e antraceno (STEFFEN et al., 2003; BAUTISTA, MORALES e SANS, 2015; KADRI et al., 2016).

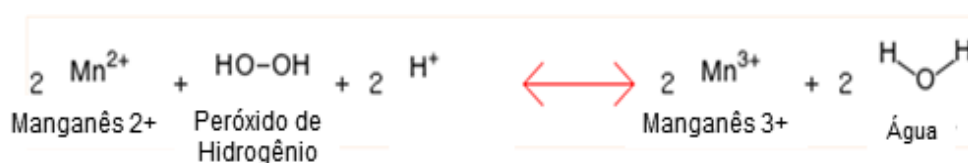
Figura 5. Reação enzimática reversível mediada pela Lacase.



Fonte: Reação KEGG R00083.

Peroxidasas são enzimas que catalisam a oxidação de compostos fenólicos em presença de peróxido de hidrogênio. As peroxidases podem ser do subgrupo hemeperoxidase e não-hemeperoxidase. A manganês peroxidase (MnP) (EC 1.11.1.113; Mn (II): H₂O₂ oxirredutase) se difere das demais devido a sua estrutura no local de ligação do substrato. A MnP oxida Mn²⁺ em Mn³⁺, que não pode ser substituída por outros metais (Figura 6). Ainda, ácidos orgânicos alifáticos como lactato e oxalato induzem a taxa de oxidação de manganês. Já foi relatada a capacidade da MnP de degradar HPAs como antraceno e pireno (BARBOROVÁ et al., 2006; AGUIAR e FERRAZ, 2012; KADRI et al., 2016; NARASIMHULU e PYDISETTY, 2018).

Figura 6. Reação enzimática reversível mediada pela Manganês Peroxidase.



Fonte: Reação KEGG R00011.

2.3 Biorremediação

A contaminação por derivados do petróleo reduz a capacidade do solo de suportar o crescimento de plantas, além de contaminar águas subterrâneas e aumentar a presença de metais pesados que podem bioacumular e biomagnificar causando efeitos adversos à saúde (ADAMS et al., 2014). A contaminação de solos e águas também pode ter um impacto econômico nas indústrias de turismo e na indústria de extração de recursos marinhos.

O grande desafio é enfrentar estes problemas de degradação ambiental de forma segura e ambientalmente racional com custos baixos (ADAMS et al., 2015). Uma tecnologia que vem ganhando espaço e já é intensamente estudada, é a biorremediação, que é um processo que objetiva o uso de isolados e seus produtos para a redução ou remoção de contaminantes em água ou solo (PEREIRA e FREITAS, 2012; EL-SHEEKH et al., 2016). O uso de isolados na biorremediação moderna pode ser creditada em partes a George Robinson, que utilizou isolados para consumir óleo de um vazamento da costa de Santa Bárbara, Califórnia em meados dos anos 1960. Após esse acontecimento, nas décadas seguintes, a biorremediação de óleos e outros xenobióticos perigosos receberam mais visibilidade (ADAMS et al., 2015). O objetivo da biorremediação é mineralizar poluentes, isto é, transformar as moléculas orgânicas em CO₂ e H₂O (PEREIRA e LEMOS, 2013).

Alguns isolados autóctones à região contaminada costumam desenvolver papel fundamental no processo de biorremediação atuando como agentes de transformação de compostos orgânicos complexos em compostos mais simples e assimiláveis. Este processo é denominado de mineralização (KILLHM, 1994; ADAMS et al., 2015; EL-SHEEKH et al., 2016).

Na biorremediação, são utilizados isolados para reduzir, eliminar, conter ou transformar contaminantes no solo, sedimentos, água ou ar. Este processo pode ser definido como detoxificação de compostos químicos complexos por mineralização, transformação ou alterações estruturais das moléculas. A biorremediação envolve a obtenção de energia metabólica a partir de reações de redução e oxidação por células microbianas. Estas reações incluem

respiração e outras funções biológicas necessárias para manutenção e reprodução celular. Diferentes tipos e classes de receptores de elétrons microbianos podem estar envolvidos na biorremediação como cátions polivalentes: nitrato, oxigênio, manganês, ferro (III), sulfato e dióxido de carbono (ADAMS et al., 2015).

A biorremediação pode ser executada de diferentes formas, e uma delas é a bioestimulação, que envolve a modificação do ambiente contaminado. O objetivo é estimular as bactérias autóctones que possuem mecanismos bioquímicos para degradação do xenobiótico. Este estímulo pode ser realizado com a adição de nutrientes limitantes e aceptores de elétrons, tais como fósforo, nitrogênio, oxigênio ou fontes de carbono de fácil assimilação, que em um ambiente contaminado se encontram restritos (SILVEIRA e MANDAI, 2016).

Bioestímulo é um tipo de remediação natural que pode melhorar a degradação do poluente otimizando condições de cultivo, como aeração, adição de nutrientes, pH e controle de temperatura, além da avaliação da cinética do processo *in situ*. A grande vantagem da bioestimulação é o aumento da população microbiana dos indivíduos autóctones já adaptados à condição de contaminação. Por outro lado, o maior desafio ocorre em razão da disponibilidade dos nutrientes adicionados ao meio, os quais proporcionarão o aumento da população de heterotróficos sem atividade biodegradadora (MARGESIN et al., 2000; AL SULAIMANI et al., 2011; KANISSERY e SIMS, 2011; MORAIS FILHO e COROLIOLANO, 2016).

O segundo método de biorremediação mais empregado, aplicado desde a década de 1970 é o bioaumento. Neste processo ocorre a adição de isolados degradadores ao sítio contaminado. Este método consiste em um processo de biorremediação *ex situ* em que são adicionadas linhagens adaptadas que utilizam o contaminante como substrato. Geralmente, utilizada com o objetivo de descontaminar regiões com concentrações elevadas de petroderivados onde a microbiota está inibida. Para que essa abordagem seja bem sucedida, os isolados inseridos devem ser capazes de degradar maior parte da composição do contaminante, além de manter a estabilidade e viabilidade genética durante o armazenamento, sobreviver ao ambiente hostil e competir com a microbiota

nativa (OLLIVER e MAGOT, 2005; ADAMS et al., 2015; MORAIS FILHO e COROLIOLANO, 2016).

As bactérias pertencem a uma classe de isolados ativamente envolvidos na degradação de hidrocarbonetos em diferentes sítios de contaminação (HARITASH e KAYSHIK, 2009). Ye et al. (1996) observaram a diminuição nas concentrações de benzopireno após 168h de incubação, empregando *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505, resultando em 95% de transformação do contaminante. Também observaram que o crescimento desta isolados, quando suplementada com glicose, aumentou a concentração de CO₂ indicando hidroxilação e clivagem das ligações dos anéis do benzeno. Aitken et al. (1998), ao analisarem linhagens de solo contaminado por petroderivados (óleo lubrificante e óleo diesel), identificaram prevalência de espécies de *Pseudomonas*. Walter et al. (1991), analisaram atividade de *Pseudomonas aeruginosa* oriundas de região contaminada por resíduos de refinaria de petróleo e observaram que espécies submetidas ao crescimento com concentrações elevadas de fenantreno como substrato conseguiram remover o contaminante em um período de 30 dias. Yuan et al. (2002) isolaram seis linhagens de bactérias Gram-negativas em região contaminada por petroderivados e verificaram que todas as linhagens degradaram fluoreno, fenantreno, antraceno e pireno em uma taxa de 70-100% em um período de 40 dias. Duas das seis linhagens eram de *Pseudomonas fluorescens*.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de degradação do antraceno e pireno de um isolado de *P. aeruginosa* e correlacionar com a atividade da lacase e manganês peroxidase.

3.1 Objetivos Específicos

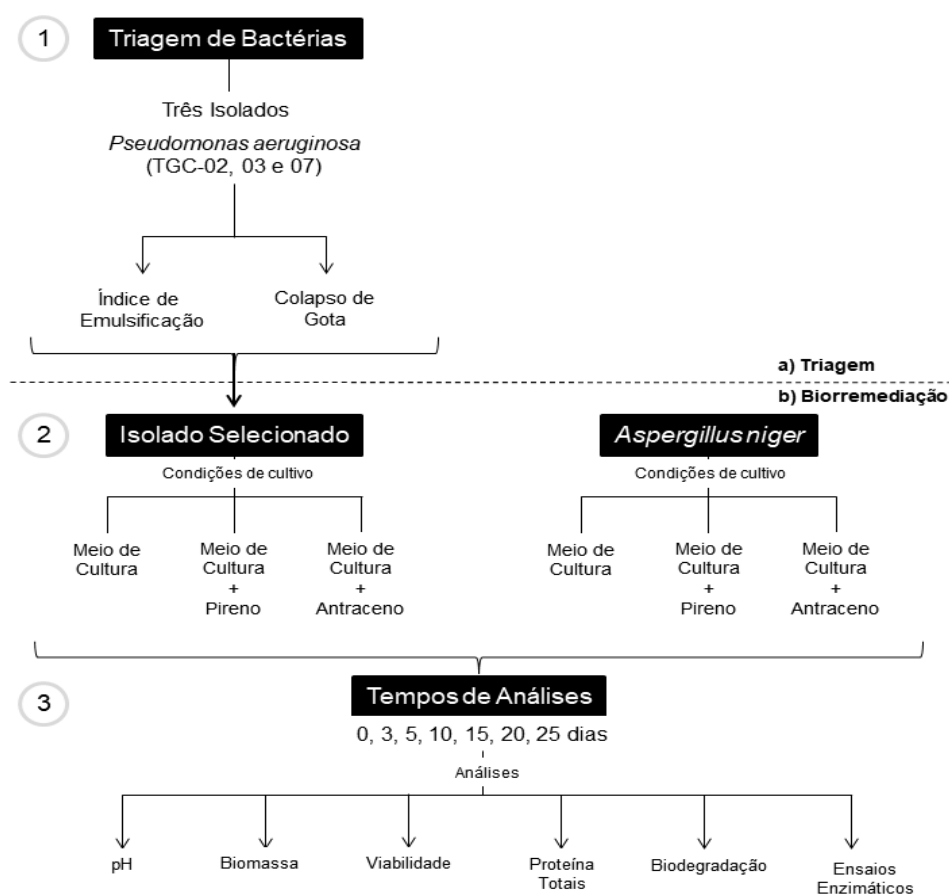
- Identificar linhagens de *P. aeruginosa* com capacidade de biorremediação;
- Avaliar capacidade de degradação do antraceno e pireno por uma isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e comparar ao controle positivo *Aspergillus niger*;
- Avaliar atividade das enzimas lacase e manganês peroxidase;
- Avaliar a correlação entre a capacidade de degradação de contaminantes com a produção das enzimas estudadas;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local dos experimentos e estratégia experimental

Os experimentos foram realizados no Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), nos laboratórios de Microbiologia Ambiental (LAMA) e no Laboratório de Biotecnologia de Organismos Aquáticos (LABOrA), onde foram realizados dois experimentos: Experimentos de Triagem e Biorremediação (Figura 7).

Figura 7. Estratégia Experimental



(1) Triagem de Bactérias: três isolados foram submetidos a dois testes de atividade hidrocarbonoclasticas, o índice de emulsificação (IE_{48h}) e o teste de Colapso de Gota; (2) Biorremediação: a *Pseudomonas aeruginosa* selecionada a partir da triagem foi submetida ao experimento de biorremediação junto ao controle positivo *Aspergillus niger*, em microcosmos independentes. Cada microrganismo foi submetido a três condições diferentes, na presença ou não de antraceno ou pireno; (3) Tempos de Análises: cada grupo experimental foi avaliado nos dias 0, 3, 5, 10, 15, 20 e 25 do bioprocessamento. Em cada um destes momentos, cada amostra foi submetida as análises de pH, biomassa, viabilidade, proteínas totais, biodegradação e ensaios enzimáticos.

O projeto foi dividido em duas etapas, a triagem das *Pseudomonas aeruginosa*, onde foi avaliado o potencial hidrocarbonoclástico dos isolados. A isolados que apresentou o melhor desempenho de degradação foi utilizada na biorremediação do pireno e antraceno. Nesta segunda etapa, foi utilizado o isolado de *P. aeruginosa* e *A. niger*. Cada isolados foi submetido às mesmas condições de cultivo. O pH, biomassa, viabilidade, proteínas totais, biodegradação do contaminante e atividade enzimática foram avaliados.

4.2 Experimentos de Triagem

Para a triagem dos isolados com melhor desempenho de degradação de petroderivados, foi feito o teste do índice de emulsificação (COOPER E GOLDBERG, 1987) e o teste do colapso de gota descrito por Hanson, Desai e Desai (1993).

Três isolados de *P. aeruginosa* foram utilizados neste trabalho, todas prospectadas próximas a postos de combustíveis e com histórico de contaminação (Tabela 2).

Tabela 2. Local de isolamento de *Pseudomonas aeruginosa*

Isolados	Região de João Pessoa-PB	Coordenadas
TGC-02	Posto de Gasolina	7° 14'S 34° 84'W
TGC-03	Posto de Gasolina	7°15'S 34°,83'W
TGC-07	Posto de Gasolina	7° 08' 32"S 34° 55' 14"W

Os isolados estão cadastrados no SISGen, nº A6B80BD.

4.2.1 Índice de Emulsificação

O índice de emulsificação foi determinado segundo Cooper e Goldberg (1987). Para este teste, foram adicionados 4 mL de um dos petroderivados (gasolina comum, óleo diesel, óleo lubrificante e querosene) e 4 mL da suspensão bacteriana a tubos de centrífuga de 15 mL. Os tubos foram homogeneizados em vortex por 2 minutos e incubados a 30 °C por 72h. As análises foram feitas às 24h, 48h e 72h. O índice de Emulsificação foi medido

através da divisão da altura da emulsão pela altura total da coluna e multiplicado por 100. Lauril sulfato de sódio (SDS) foi utilizado com o fim de comparação de emulsificação.

4.2.2 Colapso de Gota

O teste de colapso de gota foi realizado como descrito por Hanson, Desai e Desai (1993). O ensaio foi realizado em triplicata, utilizando placas de 24 poços, que foram preenchidos com 1,5 mL de meio mineral mínimo (0,5 g/L de K_2HPO_4 , 0,5 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 g/L de $MgSO_4$, 0,01 g/L de $FeCl_2$, 0,01 g/L de $CaCl_2$, 0,001 g/L de $MnCl_2$ e 0,001 mg/L de $ZnSO_4$), 10 μ L da fonte de carbono, 2,5 μ L da suspensão bacteriana e 1,5 μ L da solução indicadora 2,6-diclorofenol indofenol 1% (DCPIP). A suspensão bacteriana foi preparada a partir de um cultivo onde, tomando como base o tubo número 1 da escala MacFarland ($\approx 10^8$ UFC/mL), o pré-inóculo foi preparado em solução de NaCl 0,85% e adicionado em caldo nutriente (1,0 g/L de extrato de carne, 2,0 g/L de extrato de levedura, 5,0 g/L de peptona de carne e 5,0 g/L de NaCl). Após 24h de incubação a 30 °C, a suspensão foi adicionada à placa multipoços. Os petroderivados empregados no ensaio foram: gasolina comum, óleo diesel, óleo lubrificante, benzeno, tolueno e xileno. Para o controle do teste, poços foram preenchidos com o meio mineral mínimo, contendo a fonte de carbono e o indicador redox, na ausência do inóculo. Todas as placas foram incubadas a temperatura ambiente e observadas em intervalos de 24h por até 120h. A viabilidade celular foi verificada ao final do teste, por meio da transferência de uma alíquota de cada poço, para novas placas contendo caldo nutriente. Após incubação a 30 °C por 24-48h, a turbidez formada indicou que o hidrocarboneto e seus metabólitos não foram tóxicos para as linhagens testadas. A isolados selecionada foi repicada e armazenada a 5 °C em ágar nutriente (5 g/L de peptona de carne, 3 g/L de extrato de carne e 15 g/L de ágar).

4.3 Experimento de Biorremediação

4.3.1 Contaminantes

Foram avaliados dois HPAs, o antraceno (Merck, 96% de pureza) de baixa massa molecular e pireno (Merck, 98% de pureza) de alta massa molecular. Cada contaminante foi dissolvido em acetona pura (Sigma) e posteriormente adicionados em cada microcosmo separadamente. A concentração final dos contaminantes em cada microcosmo foi de 50 mg/L.

4.3.2 Isolados

Foi empregado o isolado de *P. aeruginosa* com melhor atividade degradadora a partir dos experimentos de triagem. O *A. niger* por ser relatado como agente degradador de compostos aromáticos, como HPAs, foi selecionado como controle positivo a este bioprocessos. O fungo foi cedido gentilmente pela Prof. Edeltrudes de Oliveira Lima (DCF/CCS/UFPB). Os dois isolados foram submetidos à aclimação em pireno e antraceno.

Inicialmente, os isolados foram incubados a 30 °C em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio mineral mínimo com extrato de levedura (0,1 g/L), acrescido de 5 mg/L do contaminante. Após 24h, uma alíquota foi retirada e adicionada em um segundo erlenmeyer, na proporção 10% v/v, contendo meio mineral mínimo com extrato de levedura (0,1 g/L), acrescido de 25 mg/L do contaminante. Após 24h, uma alíquota foi retirada e adicionada em um terceiro erlenmeyer, com as mesmas composição de meio, mas, acrescida de 50 mg/L do contaminante. Para esta última etapa de aclimação, foi necessário 48h para observar turbidez, totalizando um tempo de aclimação de 96h.

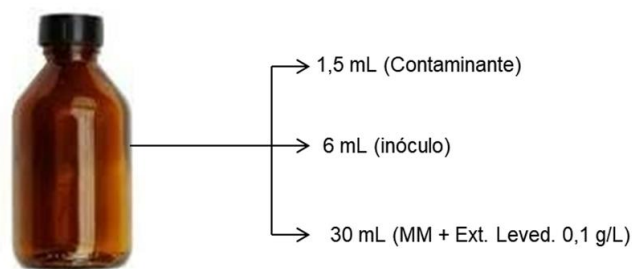
Após aclimação *P. aeruginosa* e *A. niger* foram repicados e armazenados em tubos inclinados contendo meio de manutenção ágar, para serem utilizados no experimento de biorremediação.

4.3.3 Desenho experimental

O experimento de biorremediação foi realizado ao longo de 25 dias, com pontos de análises nos dias 0, 3, 5, 10, 15, 20 e 25. Os isolados *P.aeruginosa*

TGC-02 e *A. niger* foram repicados em tubo inclinado, como descrito no tópico 4.3.2. A partir destas amostras, o pré-inóculo foi suspenso em solução de NaCl (0,85%), tomando como base o tubo número 1 da escala da MacFarland ($\approx 10^8$ UFC/mL). O pré-inóculo foi adicionado ao caldo nutriente e incubado por 24h a 30 °C. Após incubação, o inóculo foi adicionado aos microcosmos. Cada microcosmo era composto por 30 mL de Meio de Cultura (Meio Mineral Mínimo acrescido de 0,1 g/L de Extrato de Levedura), 6 mL de inóculo e 1,5 mL do HPA dissolvido em acetona pura (Figura 8). A decisão para o uso de microcosmos independentes para cada tempo de amostragem surgiu como estratégia para evitar contaminação por manipulação.

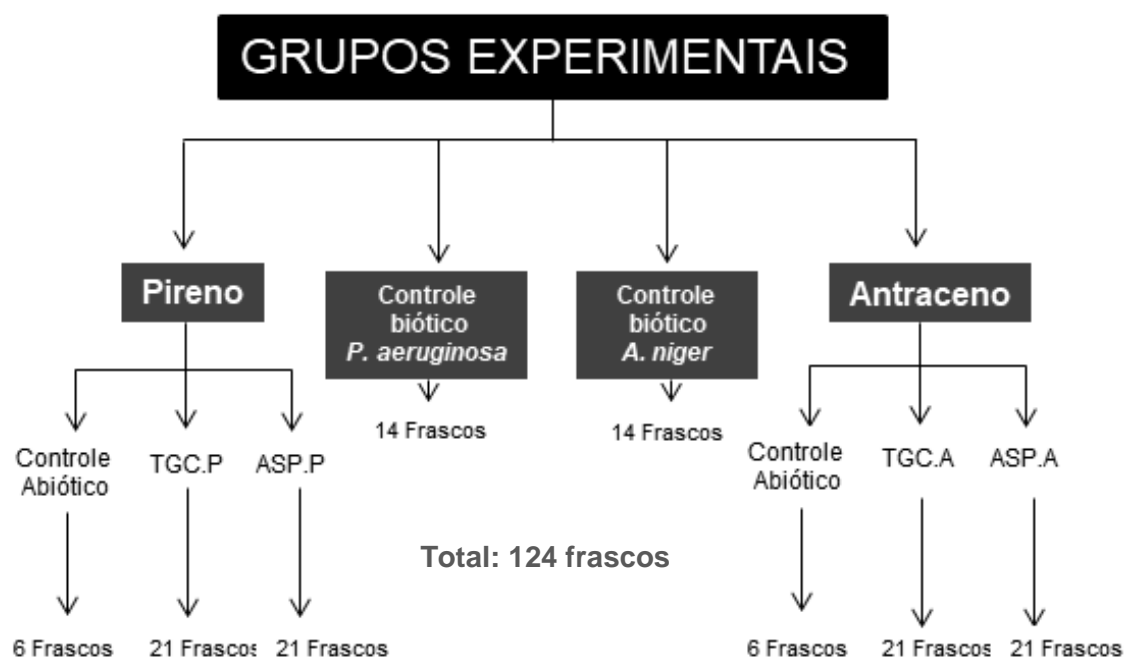
Figura 8. Composição dos microcosmos.



Composição: 30 mL de Meio Mineral Mínimo acrescido com 0,1 g/L de Extrato de Levedura, 6 mL do Inóculo (24h de incubação) e 1,5 mL do contaminante, formando uma concentração final de 50 mg/L.

Foram formados três grupos principais (Figura 9): acrescido de pireno, acrescido de antraceno ou ausente de contaminantes. Para o pireno foram formados três grupos experimentais: *P. aeruginosa* + Meio de Cultura + Pireno; *A. niger* + Meio de Cultura + Pireno; e o grupo abiótico composto apenas por Meio de Cultura + Pireno. Para o antraceno foram formados três grupos experimentais: *P. aeruginosa* + Meio de Cultura + Antraceno; *A. niger* + Meio de Cultura + Antraceno; e o grupo abiótico composto apenas por Meio de Cultura + Antraceno. Dois grupos controle foram formados: *P. aeruginosa* TGC + Meio de Cultura; e *A. niger* + Meio de Cultura. Os grupos contendo contaminantes foram formulados em triplicatas. Os grupos controles foram formulados em duplicata.

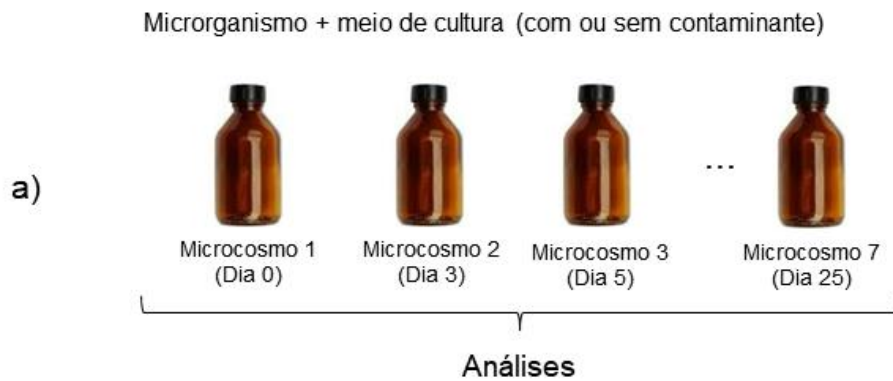
Figura 9. Distribuição dos grupos experimentais de acordo com isolados e tipo de contaminante.



TGC.P = *P. aeruginosa* + Pireno (50 mg/L); TGC.A = *P. aeruginosa* + Antraceno (50 mg/L); ASP.P = *A. niger* + Pireno (50 mg/L); ASP.A = *A. niger* + Antraceno (50 mg/L); Controle Biótico = grupo sem a presença do contaminante; Controle Abiótico = grupo sem a presença de microrganismo. Todas as amostras continham meio mineral + extrato de levedura (0,5 g/L).

Durante todo o experimento, a temperatura do ambiente foi monitorada por termômetros posicionados em três localizações representativas das condições experimentais. Nos tempos 0, 3, 5, 15, 20 e 25 de biorremediação, cada microcosmo foi analisado para determinação de pH, viabilidade celular, biomassa, proteína, e atividade de manganês peroxidase e lacase, como descritos nos tópicos abaixo e apresentados na Figura 10. A determinação da taxa de remoção dos contaminantes foi realizada apenas nos tempos 0 e 25 dias de biorremediação para os diferentes grupos experimentais.

Figura 10. Microcosmos utilizados ao longo do bioprocesso



a) Cada grupo experimental teve três microcosmos independentes submetidos às análises descritas na Figura 7.3, para cada momento, exceto o grupo controle, onde apenas dois microcosmos foram submetidos às análises. Os grupos abióticos, sem a presença de isolados foram submetidos apenas ao ensaio de degradação do hidrocarboneto. b) Os microcosmos foram elaborados em frascos âmbar de 125 mL devidamente esterilizados.

4.3.4 Viabilidade Celular

Para cada momento de análise, foi realizado o teste de viabilidade celular para cada amostra coletada. O ensaio foi realizado em placa de 24 poços, adicionado 1 mL do meio teste acrescido de 1 mL de solução de resazurina (1% v/v). O resultado foi baseado de acordo com a redução do composto, onde a cor altera de azul para rosa, indicando a presença de atividade metabólica do microrganismo em 24h (O'BRIEN et al., 2000).

4.3.5 Ensaios Enzimáticos

Os ensaios da atividade enzimática para manganês peroxidase e lacase foram realizados no sobrenadante centrifugado (Centrifuga Mini-Spin Eppendorf Rotor F-45-12-11 a 10.000 rpm/ 10 minutos) e no pellet. O pellet foi ressuspensão em NaCl (0,85%) e conseqüentemente submetido a ultrassom (UNIQUE USC 1800) por 10 minutos conforme metodologia descrita por Nozella et al. (2014). O sobrenadante da lise foi submetido aos ensaios enzimáticos.

4.3.5.1 Manganês Peroxidase

O método de atividade enzimática da MnP foi adaptado dos métodos propostos por Wariish, Valli e Gold (1992) e Kuan, Johnson e Tien (1993) em que foram adicionados 450 µL de água Milli-Q, 250 µL de tampão acetato de sódio (200mM, pH 4,5), 100 µL de MnSO₄ (20 mM), 100 µL de lactato de sódio (250 mM) e 50 µL do sobrenadante centrifugado da cultura. A reação foi iniciada com a adição 50 µL de H₂O₂ (50 µM) e a produção do complexo lactato-Mn foi seguida a 270 nm por 10 min em espectrofotômetro (EVEN IL0082-Y-BI). Para cada momento de análise, foi feito um controle positivo da MnP, obtida do fungo lignocelulolítico *Bjerkandera adjusta* (Sigma-Aldrich 68528).

4.3.5.2 Lacase

O método de mensuração da atividade enzimática da lacase foi adaptado de Arora, Chander e Gill (2002). Foi formulado um mix de reagentes contendo tampão acetato de sódio (200 mM, pH 4,5) e 68 µL de guaiacol (5 mM) a serem adicionados na amostra. O ensaio foi realizado em placa multipoços (96 poços) onde cada poço continha 224 µL do mix e 13 µL do sobrenadante da cultura centrifugado. A placa foi submetida a leitura a 450 nm em leitor de microplacas (MindRay MR-96A). As amostras foram lidas em 0, 5, 10, 15 e 30 minutos após adição do mix contendo o substrato. Para cada momento de análise, foi feito o ensaio com o controle positivo da lacase, obtida do fungo lignocelulolítico *Trametes versicolor* (Sigma-Aldrich 38429).

4.3.5.3 Proteína Total

O método de quantificação de proteínas totais utilizado foi o método descrito por Sedmark e Grossberg (1977) utilizando Coomassie Brilliant Blue G250. O corante Coomassie G250 foi preparado em HCl a 2,2% (p / v: 0,6 N) e foi filtrado através de papel de filtro Whatman N1. para remover qualquer material não dissolvido. As amostras foram distribuídas em leitor de placa multipoços, onde havia 150 µL do sobrenadante da cultura e 150 µL do corante. A quantificação foi realizada em comprimento de onda de 630 nm e 450 nm, onde, onde a razão das médias de cada comprimento de onda foi substituída na equação da reta da curva de calibração obtida com albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich) como proteína padrão.

4.3.6 Biomassa

A biomassa foi quantificada pelo método espectrofotométrico (GIRO et al., 2007). Uma alíquota de cada grupo foi submetida a análise de absorvância a 600 nm, em espectrofotômetro (EVEN IL0082-Y-BI). Como branco, foi utilizado o meio mineral ou meio mineral com contaminante.

4.3.7 Monitoramento de Temperatura

A temperatura foi mensurada a partir da média da temperatura de três frascos com água, submetidos ao mesmo ambiente de incubação das amostras ao longo dos pontos de análise do experimento.

4.4 pH

O pH foi mensurado com uso de potenciômetro (MS TECNOPON LUC-210).

4.5 Determinação da concentração dos HPAs

Os ensaios foram realizados pelo Laboratório Eurofins Brasil. Os HPAs foram determinados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, conforme o método USEPA 8270C. Antes da injeção, os extratos foram

obtidos seguindo o método USEPA 3540C (*Soxhlet extraction*) empregando o diclorometano seco com solvente. A pré-concentração das amostras foi realizada em atmosfera inerte, N₂. A preparação dos extratos (*clean-up*) anterior à cromatografia seguiu o método USEPA 3630C com uso de cartuchos descartáveis de sílica gel.

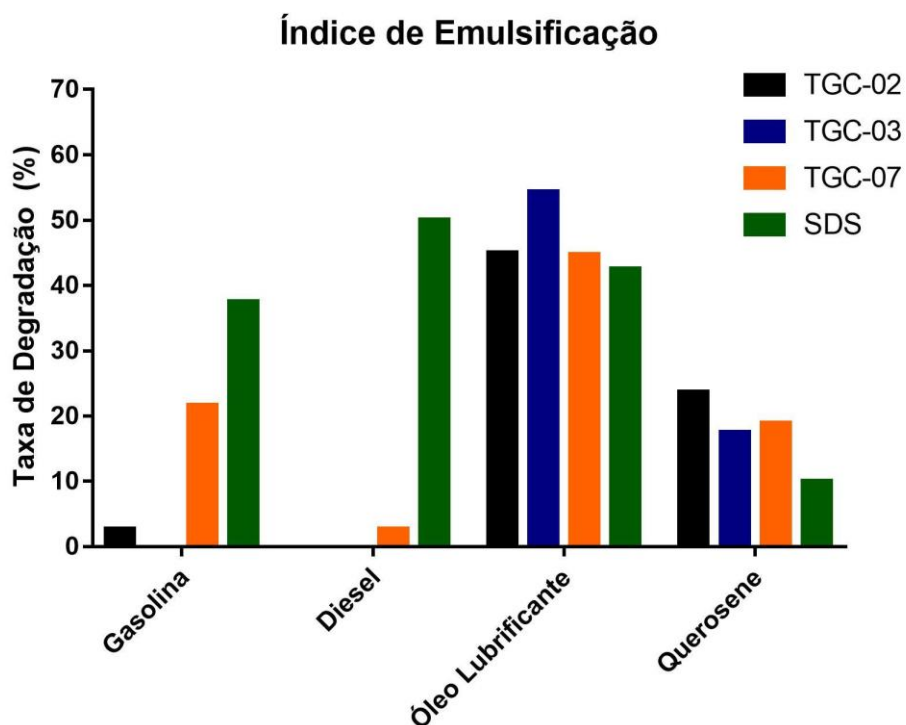
5. RESULTADOS

5.1 Experimento de Triagem

5.1.1 Índice de Emulsificação

Gasolina, óleo lubrificante, óleo diesel e querosene foram os petroderivados adicionados a fim de avaliar o poder de emulsão dos isolados. Os resultados estão apresentados na Figura 11. Apenas o isolado TGC-07 emulsionou o óleo diesel. O isoladoisoladosTGC-03 foi a única que não apresentou atividade emulsificante quando incubada em gasolina. A isolados TGC-02 se igualou na emulsão do óleo lubrificante, quando comparada a isolados TGC-07, entretanto, foi superior às demais linhagens na presença do querosene.

Figura 11. Índice de Emulsificação (IE_{48h}) ao longo de 48h de incubação em petroderivados.



5.1.2 Colapso de gota

O indicador DCPIP detecta a oxidação de NADH para NAD⁺, diretamente relacionada à capacidade do microrganismo em degradar hidrocarbonetos (ISOLA et al., 2013). Os isolados TGC-02 e TGC-03 apresentaram as alterações após o mínimo de 48h de contato, enquanto TGC-07, as modificações foram observadas em 96h, isolados considerado o isolado mais sensível no teste. Os resultados estão apresentados na tabela 3. Nenhum dos isolados avaliados apresentou atividade de oxidação em tolueno ou xileno. Entretanto, os isolados TGC-02 e TGC-03 apresentaram diferentes tempos de oxidação para o benzeno. O isolado TGC-03 apresentou os melhores resultados, visto que, em apenas 48h, apresentou oxidação dos substratos, exceto os citados acima. As três linhagens analisadas apresentaram viabilidade ao final do experimento e foram armazenadas em ágar nutriente.

Tabela 3. Tempo (h) de observação da descoloração do indicador redox DCPIP

Isolados	Fontes de Carbono (10% v/v)					
	Lubrificante	Diesel	Gasolina	Benzeno	Tolueno	Xileno
TGC-02	48	120	48	96	-	-
TGC-03	48	48	48	48	-	-
TGC-07	96	96	96	-	-	-

5.2 Experimento de Biorremediação

5.2.1 Isolados

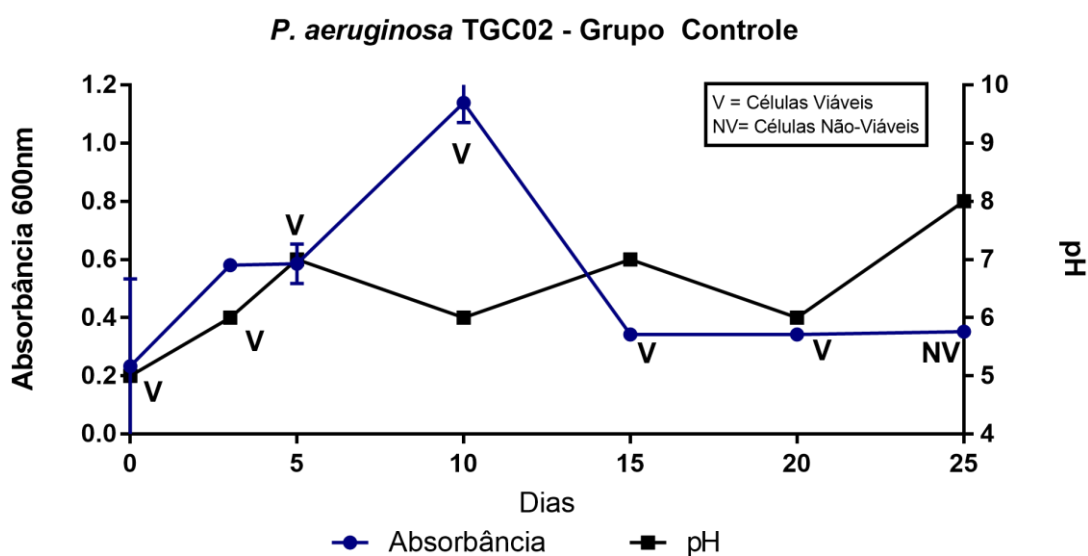
A partir dos resultados do experimento de triagem, foi selecionado o isolado TGC-02. Levando em conta o número de petroderivados que ela pôde degradar, e pelo baixo tempo de aclimatação em antraceno e pireno em concentrações de 50 mg/L. Entretanto, os demais também se mostram como potenciais agentes.

isolados O controle positivo *A.niger*, também apresentou viabilidade quanto às concentrações de aclimatação testadas.

5.2.2 Crescimento celular da *Pseudomonas aeruginosa* TGC-02

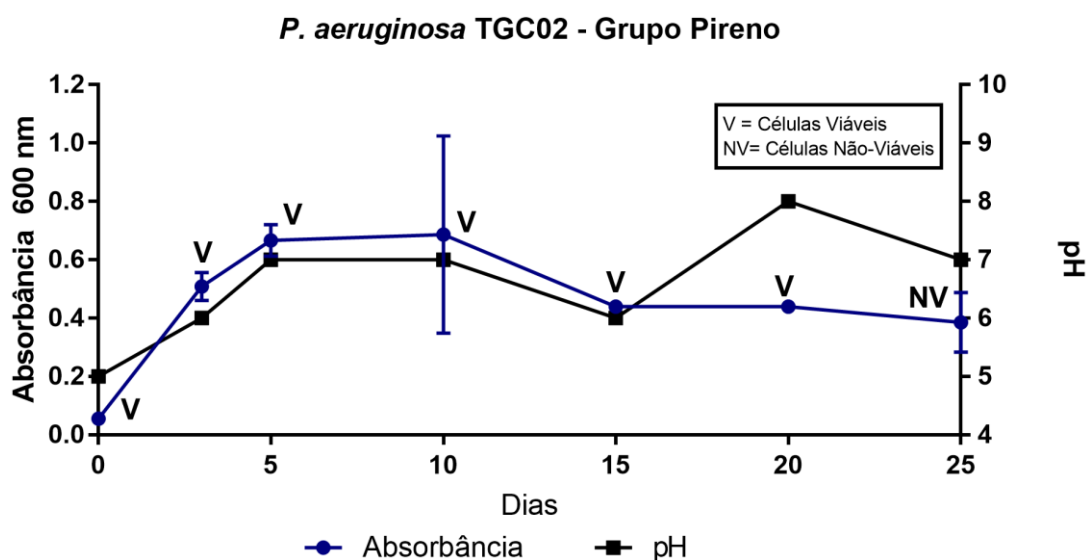
Os resultados para *P. aeruginosa* TGC-02 estão apresentados nas Figuras 12 (ausente de petroderivado), 13 (pireno) e 14 (antraceno). Para o grupo controle (Figura 12), TGC-02 apenas com meio mineral mínimo acrescido de extrato de levedura (0,1g/L), isento de contaminante, foi observado que até 10° dia de cultivo a biomassa apresentou aumento expressivo. Entretanto, é possível observar que a partir do 15° dia de cultivo, a quantidade de células diminuíram, permanecendo mantidas com valores semelhantes até o final do cultivo. As células se mantiveram viáveis até o 20° dia do bioprocessamento. Observou-se ainda uma variação do pH ao longo do tempo, de pH 5 a pH 8, no início e no final do experimento, respectivamente.

Figura 12. Variação de biomassa e pH do grupo controle (*Pseudomonas aeruginosa* TGC-02), isenta de contaminantes.



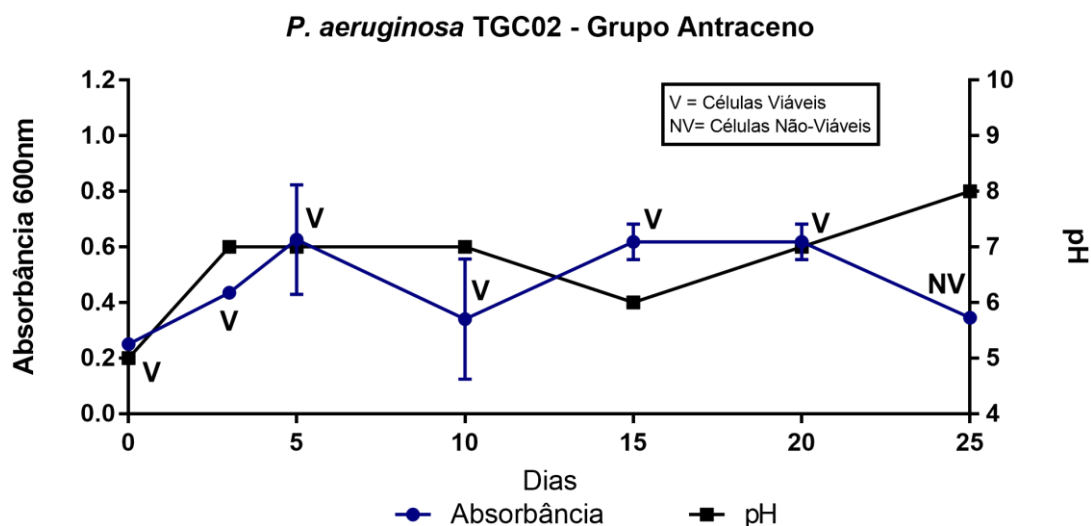
Para o grupo experimental contendo pireno, os resultados estão apresentados na Figura 13. O comportamento do crescimento celular se mostra semelhante. A partir do 15° dia, observou-se uma redução na biomassa e sua manutenção até o fim do cultivo. O pH se comportou de forma semelhante ao grupo controle.

Figura 13. Variação de biomassa e pH do grupo experimental (*Pseudomonas aeruginosa* TGC-02) acrescida de Pireno (50mg/L).



Para o grupo experimental contendo antraceno, os resultados estão apresentados na Figura 14. Após o 5° dia do bioprocesso, as células se mantiveram viáveis mantendo os mesmos valores de biomassa até o 20° dia. No 25° dia, observou-se a redução dos valores da biomassa, bem como inviabilidade celular. Dentre os três grupos de *P. aeruginosa*, o grupo cultivado na presença de antraceno apresentou a maior taxa de alcalinização do meio.

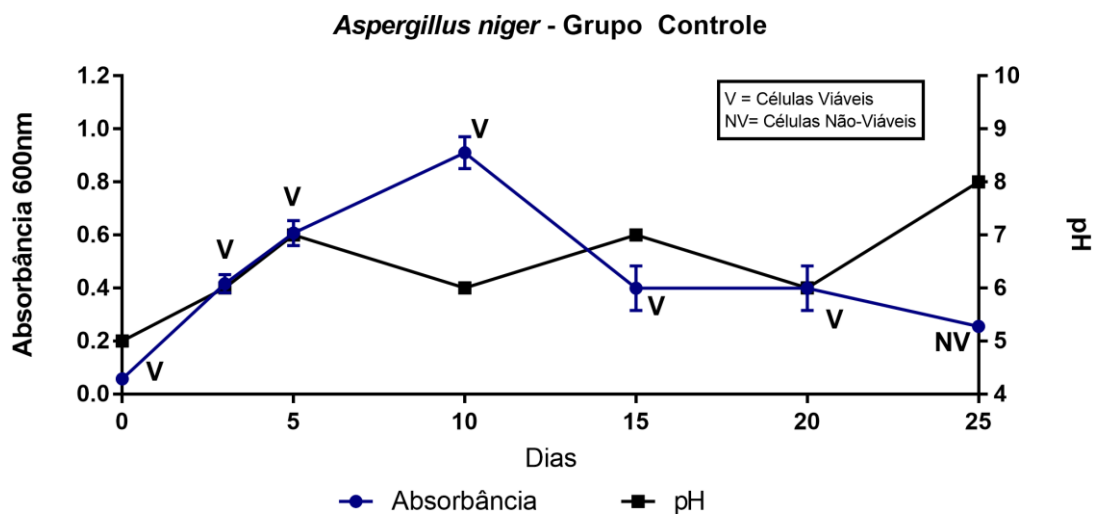
Figura 14. Variação de biomassa e pH do grupo experimental (*Pseudomonas aeruginosa* TGC-02) acrescida de Antraceno (50mg/L).



5.2.3 Crescimento celular de *Aspergillus niger*

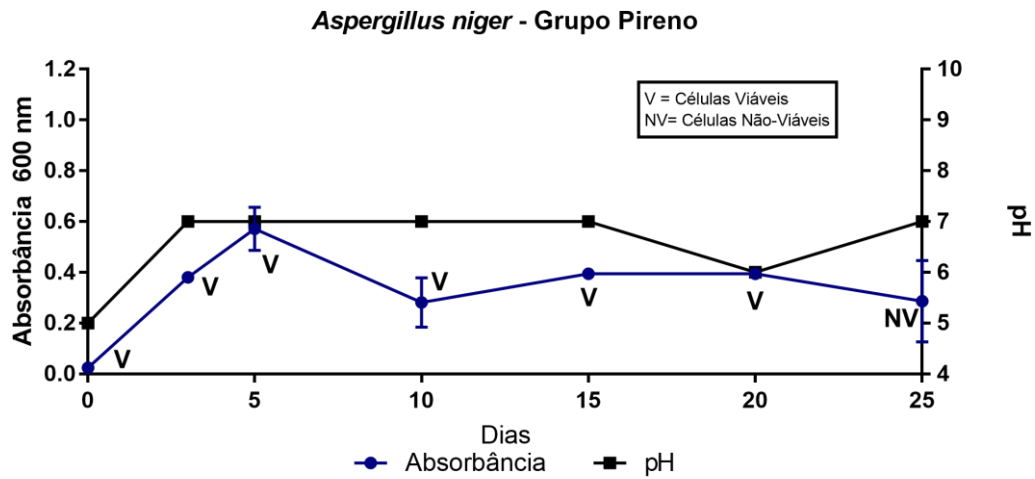
Para o grupo controle contendo *Aspergillus niger* (Figura 15), apenas com meio mineral mínimo e extrato de levedura (0,1 g/L), isento de contaminantes, foi observado que até o dia 10 de cultivo, a biomassa cresceu expressivamente. O pH, no início do cultivo, apresentou características ácidas, com o pH em torno de 5. A partir do 15º dia, é possível observar diminuição da biomassa, mantendo-se constante até o dia 20. Entretanto, no dia 25 de cultivo, além da decaimento de biomassa, as células não se mostraram viáveis.

Figura 15. Variação de biomassa e pH do grupo controle controle *A. niger* isento de contaminantes.



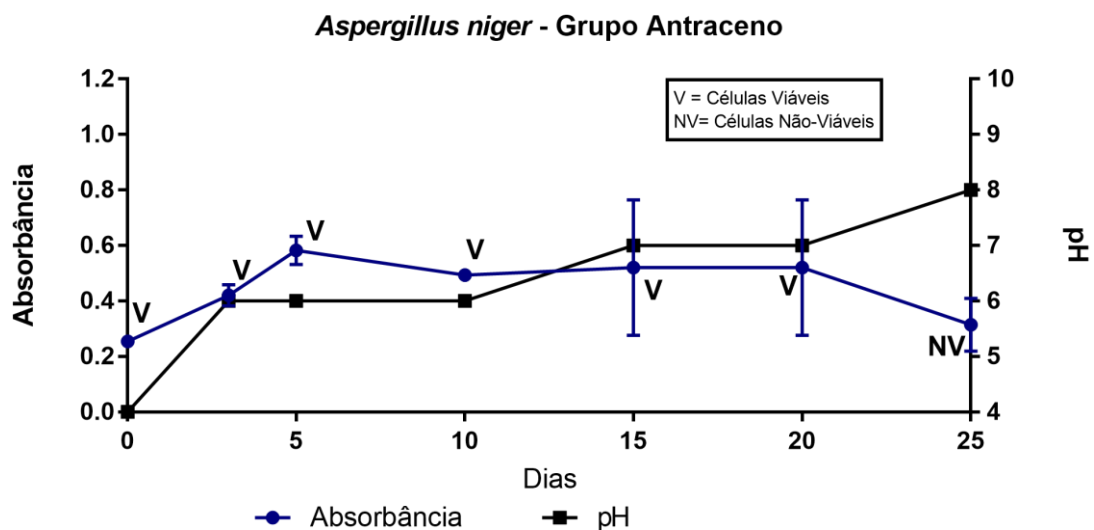
Para o grupo experimental contendo pireno (Figura 16), pode-se observar um comportamento semelhante ao grupo controle, até o dia 5 de cultivo. Entretanto, no dia 10, houve diminuição da biomassa, sendo esta recuperada e mantida até o final do experimento. O pH começou ácido, se neutralizou no meio, havendo apenas uma queda no dia 20, e mantendo o caráter neutro ao final do cultivo. Apenas dia 25, as células não se mostraram viáveis.

Figura 16. Variação de biomassa e pH do grupo controle positivo com *A. niger* acrescido de pireno (50mg/L).



Para o grupo experimental contendo antraceno (Figura 17), foi visto que a biomassa teve seu pico no dia 5, e a partir deste dia, também começou a decair. As células se apresentaram inviáveis apenas no dia 25 do experimento quando submetidas ao teste com resazurina. O pH aumentou ao longo do cultivo, onde no dia 25 apresentou pH 8.

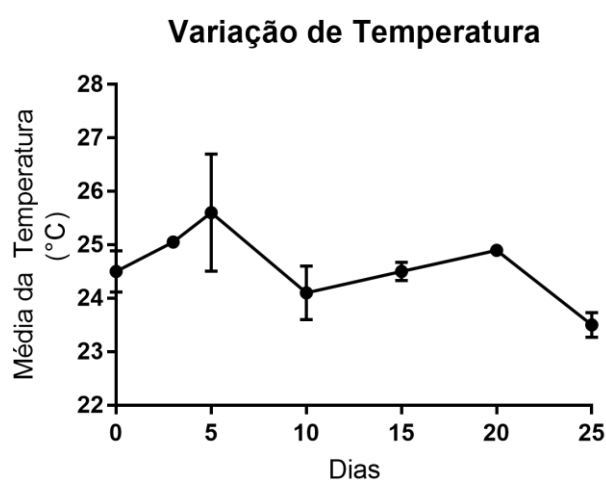
Figura 17. Variação de biomassa e pH do grupo controle positivo com *A. niger* acrescido de antraceno (50mg/L).



5.2.4 Variação de temperatura

As médias das temperaturas de três pontos de análise do local do experimento variaram de 23,5 °C a 24,5°C ao longo do experimento (Figura 18).

Figura 18. Resultados referente a variação de temperatura. Apresentados em média e desvio padrão.



5.5 Ensaio enzimáticos

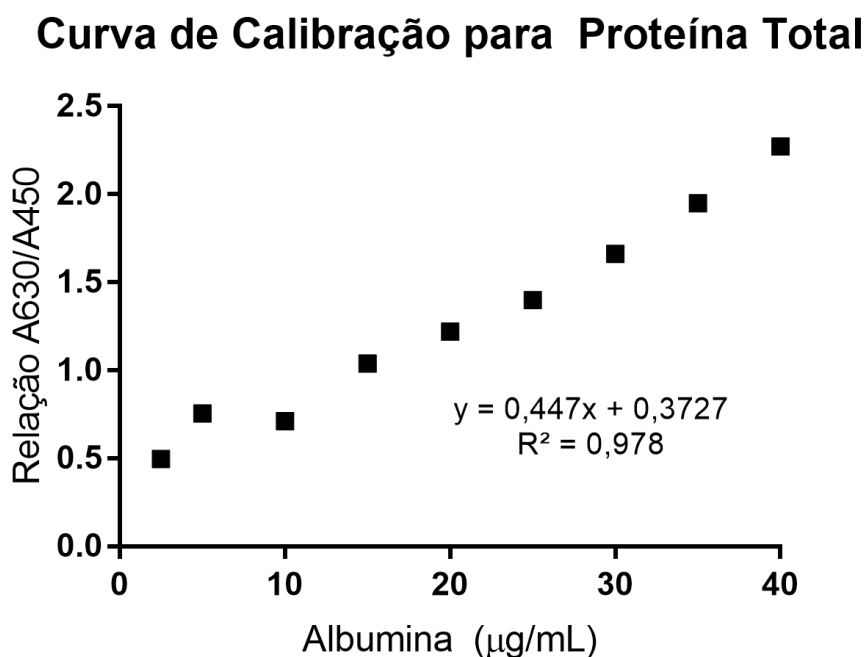
Não foi observada atividade enzimática no sobrenadante do cultivo nem no lisado celular (pellet lisado). Junto aos momentos de avaliação, foram realizados ensaios com os controles positivos da lacase e manganês peroxidase, ambos mostraram atividade esperada, comprovando a validade da técnica e dos reagentes empregados.

5.6 Proteína total

5.6.1 *Pseudomonas aeruginosa* TGC-02

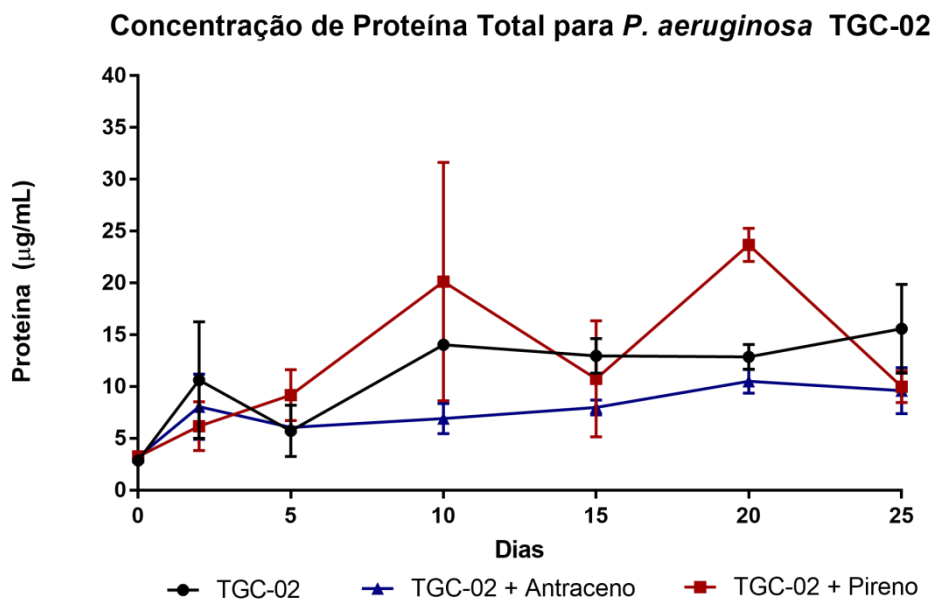
A equação da reta obtida a partir da curva de calibração (Figura 19) foi utilizada para transformar os valores de absorbância para concentração de proteína por mililitro.

Figura 19. Curva de calibração padrão para proteínas totais.



Foi observado que, para o grupo ausente de contaminante, contendo apenas *Pseudomonas* (Figura 20), houve crescimento na concentração de proteínas totais de 2,87 µg/mL no início do experimento, para 15,58 µg/mL no dia 25, final do cultivo ($P=0,027$). Para o grupo cultivado em presença de pireno, a concentração no início do processo foi de 3,26 µg/mL para 23,67 µg/mL ($P=0,002$) no dia 20, apresentando perda no dia 25, onde não havia viabilidade celular. Para o grupo cultivado em presença de antraceno, a concentração inicial do processo foi de 3,21 µg/mL e no dia 20 alcançou o valor de 10,51 µg/mL ($P=0,002$), apresentando comportamento de perda na concentração no dia 25 semelhante ao grupo crescido com pireno. Os resultados da significância entre diferentes momentos de um mesmo grupo estão no apêndice I.

Figura 20. Variação da concentração de proteínas totais para *P. aeruginosa* TGC-02 ao longo de 25 dias em diferentes condições de cultivo.

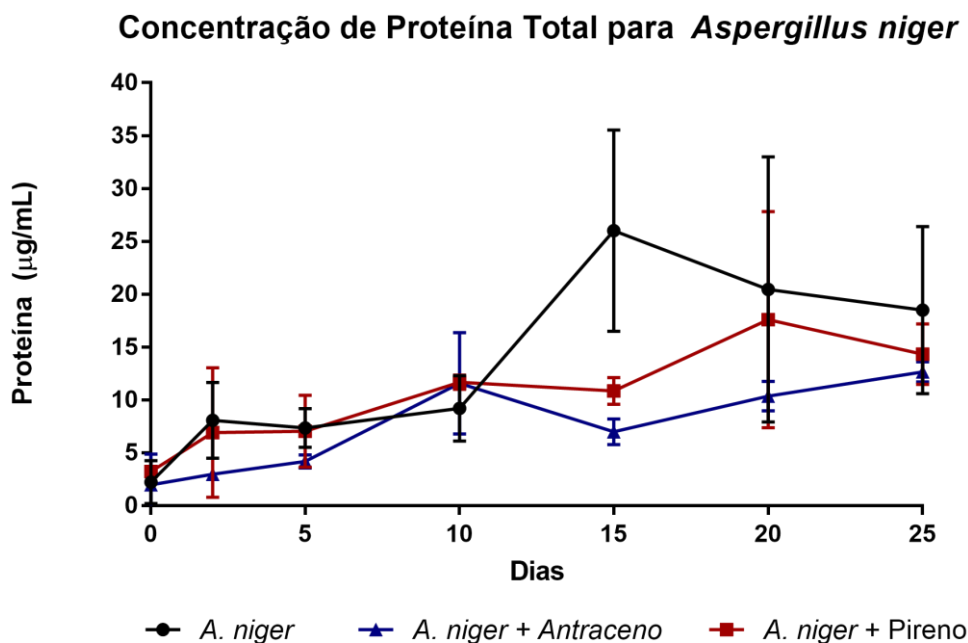


As variações de concentração dentro da mesma condição foram significativas para os grupos TGC-02 ($P=0,026$), TGC-02 + Pireno ($P=0,002$) e TGC-02 + Antraceno ($P=0,002$).

5.6.2 *Aspergillus niger*

Foi observado que para o grupo controle (Figura 21), no dia 0, as concentrações de proteína foram de 2,22 µg/mL e no dia 25, apresentou 18,49 µg/mL. Entretanto, este resultado não apresentou diferença significativa ($P=0,087$). O cultivo na presença de pireno apresentou crescimento de 3,24 µg/mL no dia 0, para 14,32 µg/mL no dia 25 ($P=0,040$). Para o cultivo na presença de antraceno, a variação do início para o final do cultivo foi de 1,97 µg/mL para 12,66 µg/mL ($P=0,000$). Os resultados da significância entre diferentes pontos de análise de um mesmo grupo estão no apêndice II. Assim como para *Pseudomonas*, o *A. niger* apresentou crescimento das concentrações até o dia 20 do bioprocessamento e queda das concentrações no dia 25 (Figura 21).

Figura 21. Variação da concentração de proteína total para *Aspergillus niger* ao longo de 25 dias em diferentes condições de cultivo.



As variações de concentração dentro da mesma condição foram significativas apenas para os grupos *A. niger* + Pireno ($P=0,040$) e *A. niger* + Antraceno ($P=0,000$).

5.7 Degradação de Hidrocarboneto Policíclico Aromático (HPA)

Os resultados de degradação dos HPAs ao longo dos 25 dias de cultivo estão apresentadas na Tabela 4. As taxas de degradação referentes aos grupos estão apresentadas com as perdas abióticas descontadas. O antraceno apresentou perda abiótica superior ao pireno. Para *P. aeruginosa* TGC-02, o pireno foi degradado em 37,83% e o antraceno em 33,01%. Para o *A. niger*, o pireno foi degradado em 28,11% e o antraceno 30,70%. Esse percentual de degradação foi obtido após 25 dias de bioprocesso.

Tabela 4. Percentual de degradação do pireno e antraceno por *P. aeruginosa* e *A. niger* após 25 dias

Grupos	Taxa de degradação de HPA
Pireno (perda abiótica)	31%
Antraceno (perda abiótica)	50,2%
<i>P. aeruginosa</i> + pireno*	37,83%
<i>P. aeruginosa</i> + antraceno*	33,01%
<i>A. niger</i> + pireno*	28,11%
<i>A. niger</i> + antraceno*	30,70%

**descontada as perdas abióticas*

6. DISCUSSÃO

6.1 Experimento de triagem

O objetivo da etapa de triagem foi identificar qual dos três isolados possuiria melhor atividade de emulsificação, para isto, o teste de emulsificação foi um importante parâmetro de avaliação do poder de emulsificação e biodegradação de compostos (COOPER e GOLDENBERG, 1987). O ensaio avaliou de forma quantitativa o potencial de degradação de três isolados de *Pseudomonas aeruginosa* oriundas de ambiente com histórico de contaminação com hidrocarbonetos.

Dentre os três isolados, a TGC-03, apresentou resultados inferiores às TGC-02 e TGC-07 em 48h de cultivo, quando comparado o número de petroderivados degradado, apresentando atividade em apenas dois dos quatro avaliados, que foram óleo lubrificante e querosene. A isolados TGC-02, apresentou índices de emulsificação em presença da gasolina, óleo lubrificante e querosene. Entretanto, apenas a isolados TGC-07 apresentou atividade de emulsificação de todos os quatro petroderivados. A emulsificação destes compostos pode ser explicada devido a síntese e secreção de agentes tensoativos, assim como de constituintes da membrana celular, uma vez que a fase aquosa continha células. Os tensoativos produzidos por isolados podem pertencer a diferentes classes moleculares, mas com propriedades emulsificantes e/ou surfactantes (COOPER e GOLDENBERG, 1987).

Nos experimentos de Araújo (2017), foi observado que as linhagens de *P. aeruginosa* isoladas, apresentaram atividade emulsificante em óleo diesel superiores a 46,6% em 24h, enquanto Lebonguy et al. (2017), observaram índices de até 54% do óleo diesel em 24h. Entretanto, apenas a isolados TGC-07 apresentou atividade sobre este hidrocarboneto, em percentuais inferiores,

refletindo uma possível contaminação por este combustível no seu local de isolamento.

Isaac et al. (2015), observaram que as linhagens *P. monteilli* apresentaram IE_{24h} de 45,67% e *Pseudomonas* sp. N3 apresentou IE_{24h} de 53,89% quando incubadas em querosene por 24h. Quando comparado aos resultados obtidos pelas linhagens TGC-02, TGC-03 e TGC-04, os resultados de Isaac et al. (2015) foram superiores em 24h. Este resultado divergente pode ser motivado devido às linhagens deste experimento já terem passado por processo de aclimatação em óleo lubrificante, e em presença de querosene, sofreram estresse celular, e refletindo a baixa emulsão.

Quanto ao teste de colapso de gota com indicador DCPIP, os isolados TGC-02 e TGC-03 apresentaram alterações após o tempo mínimo de 48h. Nenhum isolado avaliado apresentou atividade hidrocarbonoclástica para o tolueno e xileno. Entretanto, as linhagens TGC-02 e TGC-03 apresentaram atividade para o benzeno nos tempos de 96 e 48h, respectivamente. Quando comparado as demais linhagens testadas, a TGC-03 se sobressai em relação aos demais, apresentando oxidação em tempo mínimo de 48h. A isolados TGC-07 se mostrou a mais sensível ao teste, apresentando oxidação a partir de 96h de incubação. O caráter tóxico destes contaminantes justifica o retardo da isolados TGC-07 em consumi-los.

Dentre os hidrocarbonetos submetidos a consumo, os BTX (benzeno, tolueno e xileno) foram os mais tóxicos, especialmente à isolados TGC-07. O não consumo do tolueno e xileno pode ser atribuído pelo fato das linhagens terem sido aclimatadas em frações do óleo lubrificante. Entretanto, Thenmozhi et al. (2012), também observaram que três linhagens de *P. aeruginosa* não apresentaram consumo de tolueno quando submetidas a este mesmo teste. O motivo alegado pelos autores reforça a tese da característica tóxica do composto dada sua volatilidade à temperatura ambiente (SAHA, MIRANDO e LEVCHENKO, 2018).

Pseudomonas aeruginosa são bactérias reconhecidamente capazes de assimilar preferencialmente óleos com cadeias carbônicas acima de C14, como é o caso do óleo Diesel (C14-C20) e o óleo lubrificante (C20-C40) (CAVALCANTI

et al., 2017). Estes dados corroboram os resultados obtidos neste experimento, em que TGC-07 apresentou 44,73% para o IE_{48h}, e consumo no teste do colapso de gota. Mariano et al. (2010), observaram que para *P. aeruginosa* LBI, o consumo do hidrocarboneto só ocorreu após 196h de incubação, diferentemente do observado neste trabalho, que foi de até 48h.

Assim, os resultados obtidos nesta etapa indicam que as três linhagens apresentam potencial como agentes de remoção de hidrocarbonetos, em especial, a TGC-02, se for considerado o número de hidrocarbonetos consumido no teste de emulsificação juntamente com o tempo de colapso de gota observado com o indicador DCPIP, sendo esta isolados, escolhida para o ensaio de biorremediação em meio líquido.

6.2 Biorremediação

Pseudomonas aeruginosa TGC-02 apresentou um comportamento esperado para as condições do teste. Como a única fonte de carbono presente neste grupo foi o extrato de levedura (0,1 g/L), possivelmente, após crescimento da biomassa até o dia 10, o substrato se esgotou, justificando a queda da biomassa a partir do dia 15. Com isto, células inviáveis podem ter se desestruturado e seus restos celulares servidos de fonte de carbono para manutenção das células restantes que mantiveram-se viáveis até meados do dia 25 do cultivo.

Quando comparados os resultados observados para o grupo controle da *P. aeruginosa* TGC-02 com o grupo contendo pireno (50 mg/L), pôde-se observar que mesmo apresentando diminuição da biomassa após o dia 10, houve manutenção dessas células em concentrações superiores às apresentadas no grupo controle. O pireno é classificado como um hidrocarboneto de alta massa molecular e possui quatro anéis aromáticos, com isso, sua degradação se torna mais complexa. Baidya, Jain e Mandamwar (2017), propuseram em seus estudos que o metabolismo do pireno em *Pseudomonas aeruginosa* pode estar relacionado à via metabólica do ácido ftálico, em que o pireno é transformado em ácido ftálico, e posteriormente em ácido cítrico. Ainda, Gosh, Jasmine e Makerji (2014) encontraram no cultivo de diferentes isolados de *Pseudomonas aeruginosa* três metabólitos da degradação do pireno, o di-hidroxipireno, 4-oxa-

pireno-5-ona, 1,2-dimetoxypireno. Jin et al. (2016) também encontraram os mesmos metabólitos. Gosh, Jasmine e Makerji (2014) propuseram que a presença destes metabólitos no meio pode ser reflexo da atividade metabólica onde a presença do di-hidroxipireno indicou a oxidação dos carbonos C4 e C5. Os demais metabólitos representam a fissão e descarboxilação dos intermediários, que, ao formar o ácido 4-fenólico, seguiu a via do ácido ftálico, como proposto por Mandamwar (2017), sendo convertido a piruvato e ácido cítrico.

Possivelmente, o acúmulo desses compostos somados aos metabólitos comuns do metabolismo celular, inviabilizaram o aumento da biomassa a partir do dia 25. Ao comparar o desempenho de crescimento da isolados TGC-02 com o *A. niger* inoculados com pireno, observou-se que a *Pseudomonas* se mostrou mais adaptada e versátil em presença deste hidrocarboneto.

Entretanto, em presença do antraceno, ambos isolados testados apresentaram comportamento de estresse celular (Figuras 14 e 17). *Pseudomonas aeruginosa* TGC-02, apresentou diminuição significativa da biomassa no dia 10, mas, recuperou a partir do dia 15. O *Aspergillus*, a partir do dia 5, apresentou diminuição da biomassa até a data final do experimento. O antraceno é um HPA de baixa massa molecular, contendo três anéis aromáticos, quando degradados propicia o acúmulo de seus derivados como a antroquinona, antrona e anidrido ftálico (JOVÉ et al., 2016), que somados aos metabólitos comuns podem apresentar efeitos mais nocivos às células quanto os metabólitos do pireno.

Assim como no grupo controle, os grupos experimentais apresentaram alcalinização do pH, indicando que, de alguma forma, o HPA foi consumido, gerando metabólitos. O pH, como fator químico, afeta diretamente a atividade microbiana devido às concentrações de H⁺, podendo viabilizar ou inviabilizar atividades enzimáticas. A variação deste indicador, pode ser observada ao longo do processo, e que o seu aumento pode ter influenciado positivamente na disponibilidade de macro e micronutrientes no meio, permitindo que os isolados em cultivo possuíssem atividade catabólica para assimilação e crescimento da biomassa (JACQUES et al., 2007).

Ainda, quando comparada a viabilidade celular em todos os seis grupos, observou-se que apenas no dia 25 não foram observadas células viáveis. Este resultado pode ser explicado pelo acúmulo de metabólitos tóxicos e escassez de fonte de carbono. As condições de cultivo em meio líquido também podem ter influenciado, pois o acúmulo de metabólitos podem levar a intoxicação das células (ROSSI, 2006). Ainda, Doriya et al. (2016), ao comparar as características do cultivo submerso, puderam observar que a desestabilização de enzimas é mais comum quando comparado ao cultivo em estado sólido, assim como ocorre agregação excessiva de isolados que se diferenciam, podendo inviabilizar outras células.

A variação da temperatura ao longo do bioprocessamento estava dentro da faixa esperada para degradação de hidrocarbonetos em temperatura ambiente, mimetizando condições reais. Sabe-se que a temperatura é um fator físico que influencia diretamente no consumo do substrato pela microbiota, e quando se trata de HPAs como contaminantes, a baixa temperatura pode limitar a degradação, devido ao aumento da viscosidade destes, enquanto a atividade metabólica da microbiota diminui. Em contrapartida, temperaturas elevadas diminuem a viscosidade de HPAs, aumentando sua toxicidade, podendo inviabilizar a atividade metabólica de bactérias e fungos (WETLER-TONINI, REZENDE e GRATIVOL, 2010).

Como principal objetivo deste estudo, a identificação da atividade de duas enzimas relacionadas a clivagem de anéis aromáticos em contaminantes, lacase e manganês peroxidase, não foram detectadas. Há duas possibilidades para esses resultados: o primeiro refere-se à baixas concentrações da enzima no meio, inferiores aos níveis detectáveis pelas metodologias empregadas; o segundo motivo diz respeito às próprias enzimas não estarem diretamente relacionadas à degradação de HPAs. Yan e Wu (2017), avaliaram os genes envolvidos com a degradação de HPAs pela *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Os autores observaram que alguns genes são ativados, e que as ativações podem variar de acordo com a concentração de oxigênio, NADH desidrogenase I, 3-oxoadipato enol-lactonase, 4-hidroxibenzoato-3-monooxigenase, quercetina-2,3-dioxygenase e homogentisato 1,2-dioxygenase.

Entretanto, com os resultados da degradação (vide tabela 4), pode ser observado que todas as linhagens avaliadas apresentaram degradação do HPA, enfatizando o desempenho da *Pseudomonas aeruginosa* TGC-02, superior ao do *Aspergillus niger*. Quando observamos a produção de proteínas totais ao longo dos 25 dias de processo, as linhagens apresentaram aumento de suas concentrações, exceto o grupo controle do fungo, corroborando o aumento da biomassa e consumo do substrato. Xia et al. (2014), observaram que, ao longo de 20 dias de cultivo em estado sólido, a isolados de *P. aeruginosa* estudada degradou 21,93% da concentração inicial de pireno. Em complemento, Lin et al. (2014) observaram o consumo de 40% da concentração do pireno inicial ao utilizar *Pseudomonas* sp. Ao longo de 30 dias de processo. Gosh, Jasmine e Makheri (2014), ao avaliarem a cinética de degradação do pireno, observou que o aumento da concentração do pireno é inversamente proporcional a taxa de degradação. Jin et al. (2016), em seus experimentos em cultivo submerso, observaram que *Pseudomonas aeruginosa* em condições não estáticas de cultivo conseguem degradar taxas acima de 50% de pireno em 25 dias de ensaio. Diferentemente de Jin et al. (2016), nosso trabalho buscou condições mais próximas ao real, evitando controlar aeração e temperatura do meio. Em estudos com solo, as taxas de degradação do pireno são superiores a 50% em até 60 dias de incubação (AMODU, OJUMU e NTWAMPE, 2016).

7. CONCLUSÕES

Dentre três isolados selvagens testados de *Pseudomonas aeruginosa*, a maior atividade hidrocarbonoclástica foi observada para TGC-02, que degradou taxas superiores de antraceno e pireno quando comparado ao controle positivo *Aspergillus niger* em 25 dias de bioprocesso. Ao comparar o desempenho de crescimento entre TGC-02 e o fungo, o primeiro apresentou melhores características de adaptação, ressaltando seu potencial como agente de degradação de HPAs persistentes, em meio líquido. As atividades de lacase e manganês peroxidase não foram detectadas ao longo do processo não sendo possível correlacionar a capacidade de degradação com a atividade específica destas enzimas. Entretanto, ao analisar os resultados de proteínas totais, podemos observar que ao longo dos 25 dias do bioprocesso houve aumento nas concentrações protéicas quando em presença de antraceno ou pireno para bactéria *Pseudomonas aeruginosa* TGC-02. Possivelmente, a participação de outras classes de enzimas não identificadas neste trabalho influenciaram a degradação dos xenobióticos. Novos experimentos devem ser realizados a fim de comprovar se há atividade enzimática da lacase e manganês peroxidase em presença de HPAs ou se estas enzimas não estão relacionadas à assimilação destes compostos por isolados hidrocarbonoclásticos.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-SHAFY, H. I.; MANSOUR, M. S. M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environment impact, effect on human health and remediation. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 25, p. 107-123, 2016.
- ADAMS, G. O.; FUFYIN, P. T.; OKORO, S. E; EHINOMEN, I. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A review. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, 2015, v. 3, n. 1, p. 28-39, 2015.
- ADAMS, G. O.; FUFYIN, P. T.; OKORO, S. E; EHINOMEN, I. Bioremediation of spent oil contaminated soils using poultry litter. **Research Journal in Engineering and Applied Sciences**, v. 3, n. 2, p. 124-130, 2014.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Uso de aditivos na biodegradação de madeira pelo fungo *Ceriporiopsis subvermispora*: efeito na peroxidação de lipídios dependente de manganês-peroxidase. **Quimica Nova**, v. 35, n. 6, p. 1107-1111, 2012.
- AITKEN, M. D.; STRINGFELLOW, W. T.; NAGEL, R. D.; KAZUNGA, C.; CHEN, S. H. Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, **Can. J. Microbiol.**, v. 44, p. 743-752, 1998.
- ALONSO, A.; ROJO, F.; MARTÍNEZ, J.L. Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* shows pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin, **Environ Microbiol.** v. 1, n. 5, p. 421-430, 1999.
- AL-SULAIMANI, S.; JOSHI, Y.; AL-WAHAIBI, S. N.; AL-BAHRY, A.; AL-BEMANI, A. Microbial biotechnology for enhancing oil recovery: current developments and future prospects. **Biotechnology, bioinformatics and bioengineering Journal**, v. 1, n. 2, p. 147-158, 2011.
- AMODU, O. S.; OJUMU, T. V.; NTWAMPE, S. K. O. Bioremediation silty soil contaminated by phenanthrene, pyrene, benz(a)anthracene, benzo(a)pyrene using *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp.: Biosurfactant/*Beta vulgaris* agrowast effects. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 12, p. 1058-1068, 2016.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de Solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética Química**, v. 35, n. 3, p. 17-42, 2010.

ARAUÚJO, R. O. **Produção de biossurfactantes e potencial de degradação do óleo diesel por bactérias isoladas de ambientes contaminados por petróleo**. 2017. DISSERTAÇÃO. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba. 68p.

ARMSTRONG, B. G.; HUTCHINSON, E.; UNWIN, J.; FLETCHER, T. Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. **Environ Health Perspect**, v. 9, n. 112, p. 970-978, 2004.

AZEVEDO, J. A. H.; ARAÚJO, R. S.; SILVA, G. M. M. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos atmosféricos de fontes automotivas: uma breve revisão. **HOLOS**, ano 29, v. 1, p. 102-115, 2013.

BAKLANOV, A.; HÄNNINEN, O.; SLORDAL, L. H.; KUKKONEN, J.; BJERGENSE, N.; FAY, B. Integrated systems for forecasting urban meteorology, air pollution and population exposure. **Atmos Chem Phys**, v. 7, p. 855-874, 2007.

BALAJU, V.; ARULAZHAGAN, P.; EBENEZER, P. Enzymatic bioremediation of polyaromatic hydrocarbons by fungal consortia enriched from petroleum contaminated soil and oil seeds. **J. environ. Biol. Environ. Biol**, n. 35. p. 521-529, 2014.

BARBOROVÁ, P.; MODER, M.; BALDRIAN, P.; CAJTHAMLOVÁ, K.; CAJTHAML, T. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Iperx lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. **Res. Microbiol**, v. 157, p. 248-253, 2006.

BAUTISTA, L. F.; MORALES, G.; SANZ, R. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by laccase from *Trametes versicolor* covalently immobilized on aminofuncionalized SBA-15. **Chemosphere**, v. 136, p. 273-280, 2015.

BEZERRA, M. S.; HOLANDA, V. C. D.; AMORIM, J. A.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Produção de biotensoativo utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (P.A) e resíduo agroindustrial (Manipueira) como substrato. **HOLOS**, v. 1, ano 28, p. 14-27, 2012.

CAVALCANTI, T. G. **Isolamento e utilização de *Pseudomonas aeruginosa* na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**. 2017. 56 p. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

CAVALCANTI, T. G.; SOUZA, A. F.; FERREIRA, G.F.; DIAS, D. S. B.; SEVERINO, L. S.; MORAIS, J. S.; SOUSA, K.A.; VASCONCELOS, U. Use of

agro-industrial waste in the removal of phenanthrene and pyrene by microbial consortia in soil. **Waste Biomass Valorization**, v.9, n. 46, p. 1-10, 2017.

CHANDRA, R.; CHOWDHARY, P.; Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. **Enviro. Sci. Process. Impacts**, n. 17, p. 326-342, 2015.

DE VOS, D.; LIMA Jr, A.; PIRNAY, J.P.; DUINSLAEGER, L.; REVETS, H.; VANDERKELEN, A.; HAMERS, R.; CORNELIS, P. Analysis of epidemic *Pseudomonas aeruginosa* isolates by isoelectric focusing of pyoverdine and RAPD-PCR: modern tools for an integrated anti-nosocomial infection strategy in burn wound centers. **Burns**, v. 23, n. 2, p. 379-386, 1997.

DORIYA, K.; JOSE, N.; GOWDA, M.; KUMAR, D. S. Chapter Six-Solid_state Fermentation vs Submerged Fermentation for the Production of L-Asparaginase. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 78, p. 115-135, 2016.

DUBOIS, V.; ARPIN, C.; MELON, M.; MELON, B.; ANDRE, C.; FRIGO, C.; QUENTIN, C. Nosocomial outbreak due to a multiresistent strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy of Cefepime-Amikacin therapy and analysis of β -lactam resistance. **J Clin Microbiol**. v. 39, n.6, p. 2072-2078, 2001.

EL-SHEEKH, M. M.; FARGHL, A. A.; GALAL, H. R.; BAYOUMI, H. Bioremediation of different types of polluted water using microalgae. **Rend. Fis. Acc. Lincei.**, v. 27, p. 401-410, 2016.

Environmental Protection Agency (EPA). Peer review and peer involvement at the US *Wiley-Liss Inc., NY*.

Environmental Protection Agency, Science Policy Council, Office of the Science Advisor, Environmental Protection Agency, 1994.

FUENTES, S.; MÉNDEZ, V.; AGUILA, P.; SEEGER, M. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, n. 98, p. 4781-4794, 2014.

GAUR, N.; NARASIMHULU, K.; PYDISETTY, Y. Biochemical and kinetic characterization of laccase and manganese peroxidase from novel *Klebilisella pneumoniae* strains and their application in bioethanol production. **Royal Society of Chemistry**, v. 8, p. 15044-15055, 2018.

- GIRO, M. E. A.; MARTINS, J. J. L.; ROCHA, M. V. P.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Clarified cashew apple juice as alternative raw material for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in a batch bioreactor. **Biotechnology Journal**, v. 4, p. 738–747, 2009.
- GOSH, I.; JASMINE, J.; MAKHERJI, S. Biodegradation of pyrene by a *Pseudomonas aeruginosa* strains RS1 isolated from refinery sludge. **Bioresource Technology**, v. 166, p. 548-558, 2014.
- HACKER, J.; CARNIEL, E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. **EMBO Rep**, v. 2, p. 376-381, 2001.
- HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal of Hazardous Materials**, n. 169, p. 1-15, 2009.
- HEIDERSCHEIDT, D.; PEREIRA, J.; BURGHARDT, J. E.; SILVA, L. A.; OLIVEIRA, S. C. Conceitos aplicados à poluição do solo decorrente do derrame de petróleo e seus derivados. **Revista Maiêutica**, v. 4, n. 1, p. 7-14, 2016.
- IN, J.; YAO, J.; ZHANG, Q.; LIU, J. Biodegradation of pyrene by *Pseudomonas* sp. JPN2 and its initial degrading mechanism study by combining the catabolic *nahAC* gene and structure-based-analyses. **Chemosphere**, v. 164, p. 376-386, 2016.
- ISAAC, P.; MARTÍNEZ, F. L.; BOURGUIGNON, N.; SÁNCHEZ, L. A.; FERRERO, M. A. Improved PAHs removal performance by a defined bacterial consortium of indigenous *Pseudomonas* and actinobacteria from Patagonia, Argentina. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 101, p. 23-31, 2015.
- JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.
- JENKINS, B. M.; JONES, A. D.; TURN, S. Q.; WILLIAMS, R. B. Particle concentrations, gas-particle partitioning, and species intercorrelations for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) emitted during biomass burning. **Atmospheric Environment**, v.30, n.22, p.3825-3835, 1996.
- JIANG, X. M. R.; YU, W. J. Use of Surfactants for the Remediation of Contaminated soils: A Review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 12, 2014.
- JOVÉ, P.; OLIVELLA, M. A.; CAMARERO, S.; CAIXACH, J.; PLANAS, C.; CANO, L.; HERAS, F. X. I. Fungal biodegradation of anthracene-polluted cork: A comparative study. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 51, n. 1, p. 70-77, 2016.
- KADRI, T.; ROUISSI, T.; BRAR, S. K.; CLEDON, M.; SAURABHJYOTI, S.; VERMA, M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by

fungal enzymes: A review. **Journal of Environmental Sciences**, v. 51, p. 52-74, 2017.

KANISSERY, R. G.; SIMS, G. K. Biostimulation for the enhanced degradation of herbicides in soil. **Applied and Environmental Soil Science**, v.1, p. 10-20, 2011.

KARIGAR, C. S.; RAO, S. S. Role of Microbial Enzymes in Bioremediation of Pollutantes: A Review. **Enzyme Research**, v. 1, p. 1-12, 2011.

KIM, K. H.; SHAMIN A. J.; KABIR, E.; BROWN, R. J. C. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. **Environment International**, v. 60, p. 71-80, 2013.

KUAN, I. C.; JOHNSON, K. A.; TIEN, M. Kinetic Analysis of Manganese Peroxidase: the reaction with manganese complexes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 27, p. 20064-20070, 1993.

KUMAR, V.; CHANDRA, R. Characterisation of manganese peroxidase and laccase producing bacteria capable for degradation of sucrose glutamic acid-Maillard reaction products at different nutritional and environmental conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 1-18, 2018.

VANDERKELEN, A.; HAMERS, R.; CORNELIS, P. Analysis of epidemic *Pseudomonas aeruginosa* isolates by isoelectric focusing of pyoverdine and RAPD-PCR. *Lat Microbiol.* n. 42, p. 149-154, 2000.

LEBONGUY, A. A.; GOMA-TCHIMBAKALA, J.; MIAMI, E.; KELE, S. Isolation and characterization of petroleum product emulsifying *Pseudomonas* strains from a generating set fuel tank. **Academic Journals**, v. 11, n. 22, p. 920-926, 2017.

LEE, H.; JANG, Y.; CHOI, Y. S.; KIM, M. J.; LEE, K.; LEE, H. Biotechnological procedures to select white rot fungi for the degradation of PAHs. **J. Microbiol Methodes**, n. 97, p; 56-62, 2014.

LESINGER, T. Microorganism and xenobiotic compounds. **Experientia**, v. 39, p. 1183-1220, 1983.

LIN, M.; HU, X.; CHEN, W.; WANG, H.; WANG, C. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. BZ-3, isolated from crude oil contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 94, p. 176-181, 2014.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F.; Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 3127-3133, 2001.

MASIH, J.; SINGHVI, R.; KUMAR, K.; JAIN, V. K.; TANJEA, A. Seasonal variation and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in indoor and

outdoor air in a semin arid tract of Nothern India. **Aerosol Air Qual Res**, v. 12, p. 515-525, 2012.

MERCANTE, F. M.; SILVA, R. F.; FRANCELENO, C. S. F.; CAVALHEIRO, J. C. T.; OTSUBO, A. A. Biomassa microbiana, em um Argissolo Vermelho, em diferentes coberturas vegetais, em área cultivada com mandioca. **Acta Sci. Agron.**, v. 34, n. 4, p. 479-485, 2008.

MORAIS FILHO, M. C.; CORIOLANO, C. F. Biorremediação, uma alternativa na utilização em áreas degradadas pela indústria petrolífera. **HOLOS**, v. 7, p. 133-150, 2016.

O'BRIEN, J., WILSON, I., ORTON, T., POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421–5426, 2000.

OCHS, S. M.; FURTADO, L. A.; PEREIRA-NETTO, A. D. Evaluation of the concentrations and distribution of carbonyl compounds in selected areas of a Brazilian bus terminal. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n.12, 2015.

OLIVEIRA, L. **Avaliação da capacidade de biodegradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros de xileno por bactérias isoladas de área contaminada**. 2017. (TESE) Doutorado em Ciências, Universidade de São Paulo. 88 p.

OLLIVIER, B.; MAGOT, M. *Petroleum Microbiology*. Washington D.C., USA, ASM Press, 2005.

PEREIRA, A. R. B.; FREITAS, D. A. F. Uso de isolados para biorremediação de ambientes impactados. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 6, n. 6, p. 975-1006, 2012.

PISTIKOPOULOS, P.; MASLET, P.; MOUVIER, G. A receptor model adapted to reactive species: polycyclic aromatic hydrocarbons; evaluation of source contributions in an open urban site-I. Particle compounds. *Atmospheric Environment*, v. 24A, n. 5, p.1189-1197, 1990.

RAVINDRA, K.; SOKH, R.; GRIEKEN, R. van. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. **Atmospheric Environment**, v.42, p.2895-2921, 2008.

SHORTER BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, 9th ed., Maryland: Williams & Wilkins, 1994.

SILVEIRA, L. R.; TATTO, J.; MANDAI, P. Biorremediação: considerações gerais e características do processo. **Engenharia Ambiental**. v. 1, n. 2, p. 32-47, 2016.

SWOBODA-COLBERG, N. G. Chemical Contamination of the Environment: sources types, and fate of synthetic organic chemicals. **Microbial Transformations and Dregadations of Toxic Organic Chemicals**. p. 27-74, 1995.

THENMOZHI, R.; PRAVEENKUMAR, D.; PRIYA, E.; NAGASATHY, A.; THAJUDDIN, N. Evaluation of aromatic and polycyclic hydrocarbon degrading abilities of selected bacterial solates. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 2, n. 3, p. 445-449, 2012.

TOP, M. E.; SPRINGAEL, D. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 262-269, 2003.

TRZESICK-MLYNARZ, D.; WARD, O.P. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p. 470-476, 1995.

TSORAEVA, A.; MARTÍNEZ, C. R. Comparison of two culture media for selective isolation and membrane filter enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in water. **Rev Lat Microbiol**. n. 42, p. 149-154, 2000.

VAIDYA, S.; JAIN, K.; MANDAMWAR, D. Metabolismo of pyrene through phthalic acid pathway by enriched bacterial consortium composed of *pseudomonas*, *Burkholderia*, and *Rhaodococcus* (PBR). **Biotech**, v. 4, n. 26, p. 1-15, 2017.

VASCONCELOS, U. **Tratamento microbiológico sequencial de solo proveniente de unidade de dessorção térmica**. Tese (Dotourado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2011.

WALTER, U.; BEYER, M.; KLEIN, J.; REHM, H. J. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 34, p. 671-676, 1991.

WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M. H. Manganese (II) Oxidation by Manganese Peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: kinectic mechanism and role of chelators. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 33, p. 23688-23695, 1992.

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 plicyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Harzardous Materials**, v. 276, p. 489-498, 2014

YAN, S.; WU, G. Reorganization of gene network for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under several conditions. **J Appl Genetics**, v. 58, p. 545-563, 2017.

YE, B.; SIDDIQI, M. A.; MACCUBIN, A. E.; KUMAR, S.; SIKKA, H. C. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas paucimobilis*. **Environ.Sci. Technol.**, v. 30, p. 136-142, 1996.

YUAN, S. Y.; SHIUNG, L. C.; CHANG, B. V. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by inoculated microorganisms in soil. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 69, p. 66-73, 2002.

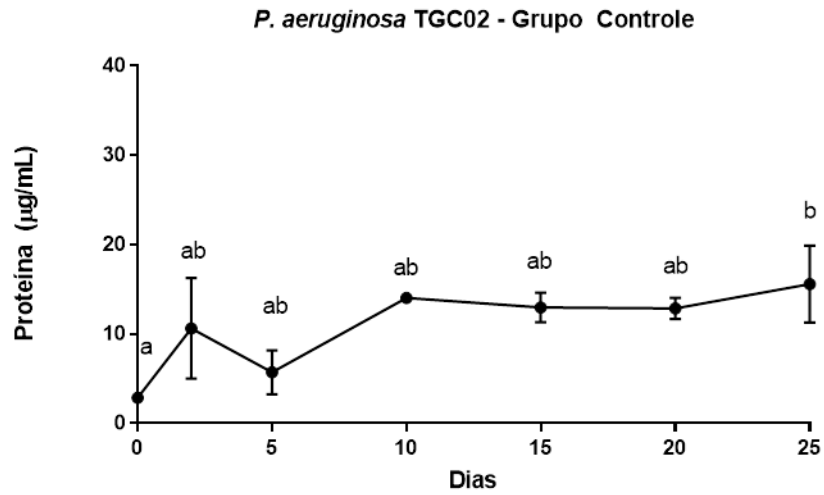
ZAGO, V.C.P.; FONSECA, M.M.C.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N.G. Levantamento e caracterização morfológica de isolados de *Pseudomonas* ssp. fluorescentes presentes em cultivos do SIPA- Sistema Integrado de Produção Agroecológica, seropédica, Rio de Janeiro: **Embrapa Agrobiológica**, n. 143, 2001, 35p.

ZHANG, Y.; TAO, S.; Global atmosphere emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004. **Atmos Environ**, v. 43, p. 812-819, 2009.

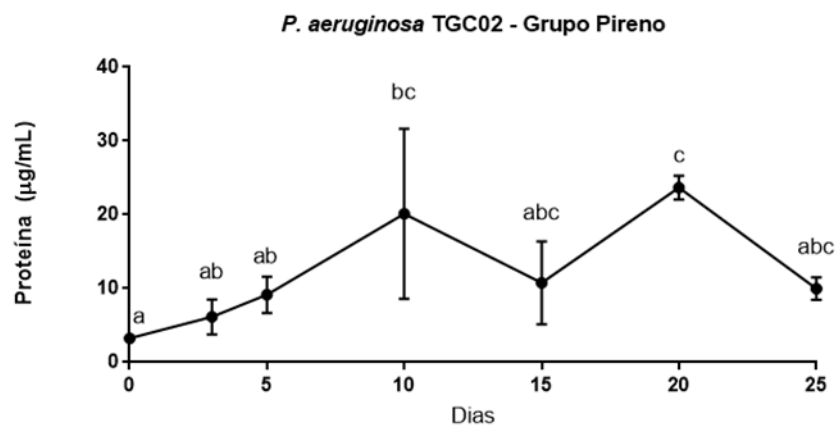
APÊNDICES

**APÊNDICE I: DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS PARA PROTEÍNAS TOTAIS DE
Pseudomonas aeruginosa TGC-02**

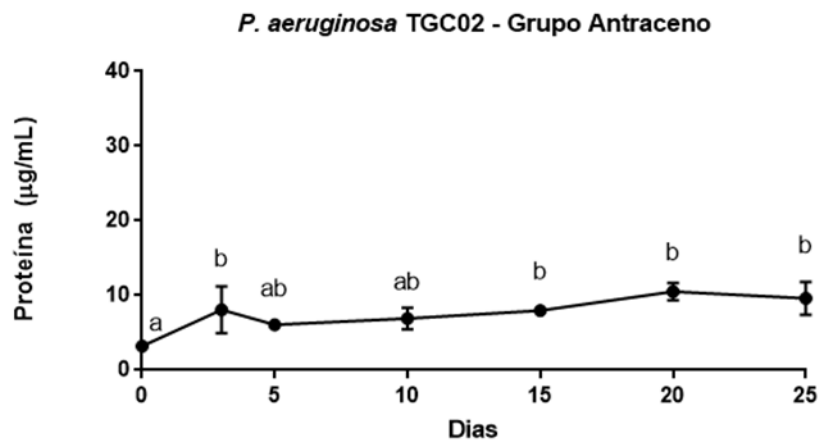
I)



II)

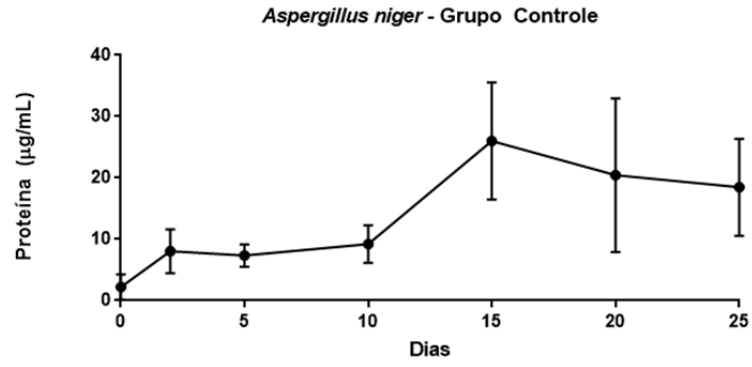


III)

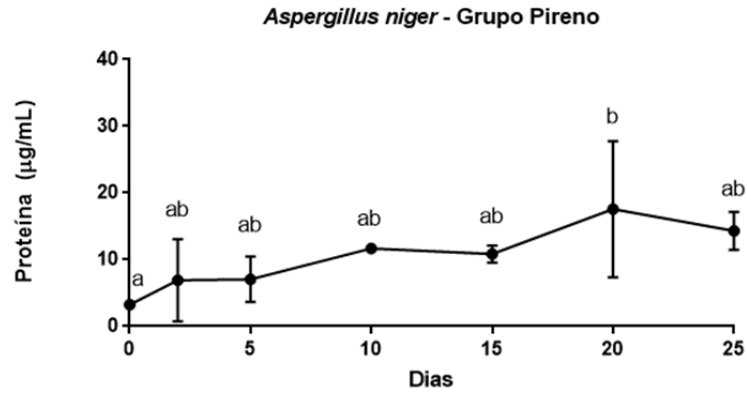


APÊNDICE II: DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS PARA PROTEÍNAS TOTAIS DE *Aspergillus niger*

I)



II)



III)

