



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**Angie Alejandra Calderon Fajardo**

**GENÔMICA FUNCIONAL DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE  
HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO**

**FUNCTIONAL GENOMICS OF PETROLEUM HYDROCARBON DEGRADING  
BACTERIA**

**CAMPINAS**

**2022**

**ANGIE ALEJANDRA CALDERÓN FAJARDO**

**GENÔMICA FUNCIONAL DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE  
HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO**

**FUNCTIONAL GENOMICS OF PETROLEUM HYDROCARBON DEGRADING  
BACTERIA**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Microrganismos.*

*Dissertation presented to the Institute of Biology of the State University of Campinas as part of the requirements for obtaining the title of Master in Genetics and Molecular Biology, in the area of Genetics of Microorganisms.*

*Orientadora: Dra. Valeria Maia Merzel*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ANGIE ALEJANDRA CALDERÓN FAJARDO E ORIENTADA POR DRA. VALERIA MAIA MERZEL.

**CAMPINAS**

**2022**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C127g Calderon Fajardo, Angie Alejandra, 1996-  
Genômica funcional de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos do petróleo / Angie Alejandra Calderon Fajardo. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Valéria Maia Merzel.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Biodegradação. 2. Genômica. 3. Petróleo. 4. Consórcios microbianos. I. Oliveira, Valeria Maia de, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

**Título em outro idioma:** Functional genomics of petroleum hydrocarbon degrading bacteria

**Palavras-chave em inglês:**

Biodegradation

Genomics

Petroleum

Microbial consortia

**Área de concentração:** Genética de Microorganismos

**Titulação:** Mestra em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Valéria Maia Merzel [Orientador]

Marcelo Mendes Brandão

Cristina Rossi Nakayama

**Data de defesa:** 23-09-2022

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-1127-1394>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7611525486993398>

**Campinas, setembro de 2022.**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof.(a) Dr.(a). Valéria Maia Merzel

Prof.(a) Dr.(a). Marcelo Mendes Brandão

Prof.(a) Dr.(a). Cristina Rossi Nakayama

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia.

*Dedico ....*

*Aos meus avós Yolanda e Luises,  
meus pais, meu campeão Santy, demais familiares e  
amigos, que fizeram parte do meu desenvolvimento  
acadêmico, físico e espiritual. Por cada uma das  
palavras, ensinamentos, guias, confiança, amor,  
força e acompanhamento que vocês me deram  
ao longo da minha vida.*

*Muito obrigada, “Por me deixar voar alto”*

## **Agradecimentos**

É bem sabido que cada processo na vida envolve um esforço e dedicação para começar, desenvolver e finalizar e sempre há pessoas fornecendo sua ajuda para alcançá-lo, deixando seu grão de areia em nossa vida.

Por isso gostaria de nomear cada uma das pessoas que fizeram parte deste processo de formação acadêmica e pessoal, embora saiba que é difícil incluí-los todos; desse modo eu fico muito grata por terem sido parte da minha formação e contribuído para tornar-me uma profissional melhor.

Agradeço a toda a minha família, que desde o primeiro instante me ajudou e me incentivou em cada um dos momentos de dificuldade, ao me dar a apoio, ânimo e força necessária para continuar cumprindo meu projeto.

Em seguida, agradeço sinceramente à minha orientadora, Dra. Valéria Maia Merzel, que me brindou toda a confiança, paciência, compreensão e orientação durante todo esse processo.

Aos meus colegas do laboratório da DRM, Kelly “*mãe rs*”, Gabriel “*parce-venenoso*” pela ajuda e ensino na área de bioinformática e pelo meu autorreconhecimento como pessoa; Jessica “*Listeria-homofobica*”, Milene, Tulio “*picarona*”, Milena pelas dicas sobre as diferentes metodologias durante o meu trabalho de bancada; Vivi “*por ser a mãe galinha*” e ensino na área molecular; Mavi, Melissa, Rene, William, Leandro com os que compartilhei momentos gratos.

Ao Dr. Adilson Sartoratto pela parceria em meu projeto para realização dos ensaios de degradação de hidrocarbonetos do petróleo.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) CNPJ 00.889.834/0001-08 número do processo 88887.479579/2020-00 e à Petrobras pelos recursos de manutenção e execução deste projeto.

## RESUMO

Os hidrocarbonetos do petróleo são compostos amplamente utilizados nas indústrias de energia, farmacêutica, têxtil, cosmética, entre outras. No entanto, o uso desse recurso resulta no acúmulo de produtos tóxicos e não recicláveis, na geração de doenças crônicas e na poluição que impactam negativamente os ambientes aquáticos e terrestres. Microrganismos com potencial metabólico para degradação e remoção desses compostos do ambiente representam uma ferramenta para contribuir com estratégias de biorremediação. A genômica funcional é uma abordagem que permite a elucidação do potencial genético de um microrganismo para uma função de interesse; esta informação pode ser usada para subsidiar o desenvolvimento de processos ou produtos de base biológica para atender a demandas de setores da sociedade, como saúde, indústria, agronegócio, energia e meio ambiente. Nesse sentido, foram estudadas quatro linhagens isoladas de ambientes da indústria de petróleo, as quais mostraram carregar genes associados à degradação de benzoato, fluorobenzoato, tereftalato, clorobenzeno, naftaleno, xileno, nitrotolueno, tolueno, etilbenzeno, estireno e outros compostos aromáticos. As relações filogenéticas destes genes com os genes homólogos mostraram coerência com a história evolutiva das linhagens em estudo. A genômica comparativa mostrou que o potencial genético das linhagens é distinto com relação a sua participação nas vias de degradação de hidrocarbonetos e os dados genômicos permitiram resolver a taxonomia das linhagens em nível de espécie. A partir das análises genômicas e de resultados de degradação *in vitro* obtidos em estudos prévios, foi estruturado um consórcio bacteriano que foi exposto a uma mistura de três hidrocarbonetos do petróleo (etilbenzeno, fenantreno e antraceno). O consórcio mostrou flutuações metabólicas, mas não foi possível concluir se houve degradação de hidrocarbonetos. Este resultado sugere que as linhagens podem sobreviver através de interações metabólicas sob as condições testadas.

## ABSTRACT

Petroleum hydrocarbons are compounds widely used in the energy, pharmaceutical, textile, and cosmetic industries, among others. However, the use of this resource results in the accumulation of toxic and non-recyclable products, the generation of chronic diseases, and pollution that negatively impact aquatic and terrestrial environments. Microorganisms with metabolic potential for degradation and removal of these compounds represent a bioremediation strategy. Functional genomics is an approach that allows the phenotypic elucidation of the genomic potential of a microorganism associated with a function of interest. This information can be used for the development of community-based biological alternatives. In this sense, studies have been carried out on four lines isolated from the environment of the oil industry, which will show carrying genes associated with the degradation of benzoate, fluorobenzoate, terephthalate, chlorobenzene, naphthalene, xylene, nitrotoluene, toluene, ethylbenzene, styrene, and other aromatic compounds. The phylogenetic relationships of these genes with the homologous genes showed consistency with the evolutionary history of the lineages under study. Comparative genomics showed that the genetic potential of the lineages is distinct with respect to their participation in the hydrocarbon degradation pathways and the genomic data allowed solving the taxonomy of the lineages at the species level. From the genomic analyzes and in vitro degradation results obtained in previous studies, a bacterial consortium was structured that was exposed to a mixture of three petroleum hydrocarbons (ethylbenzene, phenanthrene and anthracene). The consortium showed metabolic fluctuations, but it was not possible to conclude whether hydrocarbon degradation took place. This result suggests that the strains can survive through metabolic interactions under the conditions tested.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 3.1.</b> Fluxograma geral do trabalho.....	<b>30</b>
<b>Figura 4.1:</b> Pipeline da análise bioinformática dos dados genômicos.....	<b>39</b>
<b>Figura 4.2:</b> Análise filogenética da sequência do gene RNAr 16S obtida a partir do genoma de <i>Micrococcus luteus</i> CBMAI 636, utilizando o método de reconstrução filogenética de Neighbor joining.....	<b>40</b>
<b>Figura 4.3:</b> Análise filogenética da sequência do gene RNAr 16S obtida a partir do genoma de <i>Dietzia maris</i> CBMAI 705, utilizando o método de reconstrução filogenética de Neighbor joining.....	<b>41</b>
<b>Figura 4.4:</b> Análise filogenética da sequência do gene RNAr 16S obtida a partir do genoma de <i>Bacillus subtilis</i> CBMAI 707, utilizando o método de reconstrução filogenética de Neighbor joining.....	<b>42</b>
<b>Figura 4.5:</b> Análise filogenética da sequência do gene RNAr 16S obtida a partir do genoma de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> CBMAI 70, utilizando o método de reconstrução filogenética de Neighbor joining.....	<b>43</b>
<b>Figure 4.6:</b> Árvore filogenética construída a partir das sequencias de 400 genes marcadores universais do genoma da linhagem identificada como <i>Micrococcus</i> sp. CBMAI 636.....	<b>44</b>
<b>Figure 4.7:</b> Árvore filogenética construída a partir das sequencias de 400 genes marcadores universais do genoma da linhagem identificada como <i>Dietzia maris</i> CBMAI 705.....	<b>45</b>
<b>Figure 4.8:</b> Árvore filogenética construída a partir das sequencias de 400 genes marcadores universais do genoma da linhagem identificada como <i>Bacillus subtilis</i> CBMAI 707.....	<b>45</b>
<b>Figure 4.9:</b> Árvore filogenética construída a partir das sequencias de 400 genes marcadores universais do genoma da linhagem identificada como <i>Achromobacter xylosoxidans</i> CBMAI 709.....	<b>46</b>
<b>Figura 4.10:</b> Heatmap ilustrando a participação das quatro linhagens bacterianas nas vias metabólicas de degradação de alifáticos e aromáticos (valores em porcentagem).....	<b>51</b>
<b>Figura 4.11:</b> Via de degradação do estireno junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.....	<b>52</b>
<b>Figura 4.12:</b> Vias de degradação do benzoato junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.....	<b>53</b>
<b>Figura 4.13:</b> Vias de degradação do etilbenzeno junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.....	<b>54</b>
<b>Figura 4.14:</b> Análise filogenética do gene K18118 succinato Co-A transferase, obtido a partir do genoma de <i>Dietzia kunjamensis</i> CBMAI 705, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo WAG com distribuição Gama. Valores de <i>bootstrap</i> (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.....	<b>57</b>
<b>Figura 4.15:</b> Análise filogenética do gene K00529 oxidoredutase dependente de FAD, obtido a partir do genoma de <i>Dietzia kunjamensis</i> CBMAI 705, utilizando o método de reconstrução filogenética de máxima verossimilhança e o modelo evolutivo de <i>Jones-Taylor-Thornton</i> com distribuição Gama. Valores de <i>bootstrap</i> (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.....	<b>57</b>
<b>Figura 4.16:</b> Análise filogenética do gene K01941 Urea carboxylase, obtido a partir do genoma de <i>Dietzia kunjamensis</i> CBMAI 705, utilizando o método estatístico de máxima	

verossimilhança e o modelo <i>Jones-Taylor-Thornton</i> com distribuição Gama. Valores de <i>bootstrap</i> (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.....	58
<b>Figura 4.17:</b> Análise filogenética evolutiva do gene K18118 Proteína da família da hidrolase transferase da Acetil-CoA, obtido a partir do genoma de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> CBMAI 709, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo <i>General Reversible Chloroplast</i> com distribuição Gama. Valores de <i>bootstrap</i> (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.....	59
<b>Figura 5.1:</b> Triagem preliminar para tolerância e degradação de hidrocarbonetos através dos testes de MTT e DCPIP em microplacas de 96 poços.....	68
<b>Figura 5.2:</b> Esquema de inoculação para teste de compatibilidade <i>in vitro</i> .....	69
<b>Figura 5.3:</b> Esquema da montagem do ensaio de degradação de hidrocarbonetos com os tratamentos para cada uma das leituras.....	70
<b>Figura 5.4:</b> Pipeline utilizado para a análise das sequências do gene RNAr 16S do consórcio microbiano.....	72
<b>Figura 5.5:</b> Ilustração do processo de extração de hidrocarbonetos com solventes orgânicos. <b>A.</b> Fase aquosa. <b>B.</b> Fase orgânica. <b>C.</b> Camada de algodão com sulfato de sódio. <b>D.</b> Recuperação da fase aquosa. <b>E.</b> Secagem da amostra em rotaevaporador.....	73
<b>Figura 5.6:</b> Teste de inibição cruzada entre as linhagens do consórcio bacteriano. <b>A.</b> <i>Micrococcus luteus</i> CBMAI 636 frente às linhagens: 1. <i>Dietzia kunjamensis</i> CBMAI 705, 2. <i>Bacillus subtilis</i> CBMAI 707 e 3. <i>Achromobacter xylosoxidans</i> CBMAI 709; <b>B.</b> <i>Dietzia kunjamensis</i> CBMAI 705 frente às linhagens: 1. <i>Micrococcus luteus</i> CBMAI 636, 2. <i>Bacillus subtilis</i> CBMAI 707 e 3. <i>Achromobacter xylosoxidans</i> CBMAI 709; <b>C.</b> <i>Bacillus subtilis</i> CBMAI 707 frente às linhagens: 1. <i>Micrococcus luteus</i> CBMAI 636, 2. <i>Dietzia kunjamensis</i> CBMAI 705 e 3. <i>Achromobacter xylosoxidans</i> CBMAI 709; <b>D.</b> <i>Achromobacter xylosoxidans</i> CBMAI 709 frente às linhagens: 1. <i>Micrococcus luteus</i> CBMAI 636, 2. <i>Dietzia kunjamensis</i> CBMAI 705 e 3. <i>Bacillus subtilis</i> CBMAI 707.....	74
<b>Figura 5.7:</b> Avaliação da viabilidade celular das linhagens <i>Micrococcus luteus</i> CBMAI 636, <i>Dietzia kunjamensis</i> CBMAI 705, <i>Bacillus subtilis</i> CBMAI 707 e <i>Achromobacter xylosoxidans</i> CBMAI 709 frente aos hidrocarbonetos etilbenzeno e antraceno, através dos testes de MTT.....	75
<b>Figura 5.8:</b> Avaliação da tolerância celular das linhagens <i>Micrococcus luteus</i> CBMAI 636, <i>Dietzia kunjamensis</i> CBMAI 705, <i>Bacillus subtilis</i> CBMAI 707 e <i>Achromobacter xylosoxidans</i> CBMAI 709 frente aos hidrocarbonetos etilbenzeno e antraceno, através dos testes de DCPIP.....	76
<b>Figura 5.9:</b> Ensaio de degradação dos compostos etilbenzeno, fenantreno e antraceno pelo consórcio composto pelas linhagens <i>Micrococcus luteus</i> CBMAI 636, <i>Dietzia kunjamensis</i> CBMAI 705 e <i>Achromobacter xylosoxidans</i> CBMAI 709 ao longo de 45 dias de monitoramento e amostragens realizadas em 6 tempos diferentes. Amostra refere-se aos hidrocarbonetos de petróleo avaliados, <b>CI:</b> Controle negativo com células mortas, BH+EL e Mix de HC e <b>CII:</b> Controle negativo sem células, BH+EL e Mix de HC. As barras representam os desvios padrão.....	81
<b>Figura 5.10:</b> Número de sequencias e gêneros detectados após o sequenciamento da região V3-V4 do gene RNAr 16S das bactérias do consórcio. O experimento teve uma duração de 45 dias de monitoramento e as amostragens foram realizadas em 6 diferentes tempos. As barras representam os desvios padrão.....	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1:</b> Propriedades e características dos compostos aromáticos.....	<b>19</b>
<b>Tabela 2.2:</b> Casos de derramamento de óleo em diferentes locais ao longo do tempo.....	<b>21</b>
<b>Tabela 2.3:</b> Exemplos de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos de petróleo.....	<b>23</b>
<b>Tabela 4.1:</b> Origem das linhagens bacterianas.....	<b>34</b>
<b>Tabela 4.2:</b> Cálculo dos valores de ANI (ANiB e ANIm), TNA, dDDH (d0, d4, d6) e % GC entre as linhagens em estudo e linhagens proximamente relacionadas com base nos dados de sequenciamento do genoma completo.....	<b>48</b>
<b>Tabela 4.3:</b> Comparação das características bioquímicas de <i>Micrococcus</i> sp. CBMAI 636 com aquelas de outras espécies de <i>Micrococcus</i> relacionadas usando o API System 20.....	<b>49</b>
<b>Tabela 4.4:</b> Montagem dos genomas das quatro linhagens bacterianas geradas pelo programa SPAdes.....	<b>50</b>
<b>Tabela 4.5:</b> Genes selecionados levando em consideração vias de degradação distintas e sua presença em organismos proximamente relacionados.....	<b>55</b>
<b>Tabela 4.6:</b> Bactérias de referência recuperadas da base de dados GTDB usadas para a análise de grupos ortólogos (GO).....	<b>60</b>
<b>Tabela 4.7:</b> Grupos ortólogos encontrados na análise de comparação genômica com cinco genomas de referência da base de dados GTDB.....	<b>61</b>
<b>Tabela 5.1:</b> Dados das sequências de amplicons do RNAr 16S, após trimagem e verificação da qualidade.....	<b>83</b>

## LISTA DE ANEXOS

- Anexo 9.1:** Análise filogenética da sequência parcial do gene RNAr 16S obtida de *Micrococcus luteus* CBMAI 636 e de microrganismos relacionados recuperados do banco de dados EzTaxon, utilizando o método de reconstrução filogenética de Neighbor joining, utilizando 1000 repetições bootstrap. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies. *Citricoccus* spp foi usado como outgroup.....**109**
- Anexo 9.2:** Análise filogenética da sequência parcial do gene RNAr 16S obtida de *Dietzia maris* CBMAI 705 e de microrganismos relacionados recuperados do banco de dados EzTaxon, utilizando o método de reconstrução filogenética de Neighbor joining, utilizando 1000 repetições bootstrap. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies. *Nocardia abscessos* NBRC 100374<sup>T</sup> foi usado como outgroup.....**109**
- Anexo 9.3:** Análise filogenética da sequência parcial do gene RNAr 16S obtida de *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e de microrganismos relacionados recuperados do banco de dados EzTaxon, utilizando o método de reconstrução filogenética de Neighbor joining, utilizando 1000 repetições bootstrap. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies. *Aquibacillus albus* YIM 93624<sup>T</sup> foi usado como outgroup.....**110**
- Anexo 9.4:** Análise filogenética da sequência parcial do gene RNAr 16S obtida de *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 e de microrganismos relacionados recuperados do banco de dados EzTaxon, utilizando o método de reconstrução filogenética de Neighbor joining, utilizando 1000 repetições bootstrap. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies. *Alcaligenes aqualitis* LMG 22996<sup>T</sup> foi usado como outgroup.....**110**
- Anexo 9.5:** Via de degradação do aminobenzoato junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.....**111**
- Anexo 9.6:** Via de degradação do Fluobenzoate, tereftalato e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.....**112**
- Anexo 9.7:** Via de degradação do xileno junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.....**113**
- Anexo 9.8:** Via de degradação do tolueno junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.....**114**
- Anexo 9.9:** Via de degradação do nitrobenzeno, 4-hidroxifenilacetato e neo-dihidrocarveol junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.....**115**
- Anexo 9.10:** Via de degradação do naftaleno junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.....**116**
- Anexo 9.11:** Via de degradação de compostos aromáticos junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.....**117**
- Anexo 9.12:** Via do metabolismo de propanoato junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.....**118**
- Anexo 9.13:** Via do metabolismo de utanoato junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.....**119**
- Anexo 9.14:** Via de degradação do clorocilo hexano e clorobenzeno junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.....**120**
- Anexo 9.15:** Via de degradação de cloroalceno e cloroalceno junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.....**121**
- Anexo 9.16:** Via de degradação do clohexano junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.....**122**

<b>Anexo 9.17:</b> Análise filogenética evolutiva do gene K00128 Aldeído desidrogenasa, obtido a partir do genoma de <i>Dietzia kunjamensis</i> CBMAI 705, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo <i>Jones-Taylor-Thornton</i> . Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.....	<b>123</b>
<b>Anexo 9.18:</b> Análise filogenética evolutiva do gene K00128 Aldeído desidrogenasa, obtido a partir do genoma de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> CBMAI 709, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo WAG. Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.....	<b>123</b>
<b>Anexos 9.19:</b> Análise filogenética evolutiva do gene K00146 fenilacetaldéido desidrogenase, obtido a partir do genoma de <i>Dietzia kunjamensis</i> CBMAI 705, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo WAG com distribuição Gama. Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.....	<b>124</b>
<b>Anexo 9.20:</b> Análise filogenética evolutiva do gene K00146 fenilacetaldéido desidrogenase, obtido a partir do genoma de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> CBMAI 709, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo WAG. Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.....	<b>125</b>
<b>Anexo 9.21:</b> Análise filogenética evolutiva do gene K00529 oxidorreductase dependente de FAD, obtido a partir do genoma de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> CBMAI 709, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo WAG. Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.....	<b>126</b>
<b>Anexos 9.22:</b> Análise filogenética evolutiva do gene K01512 Acilfosfatase, obtido a partir do genoma de <i>Dietzia kunjamensis</i> CBMAI 705, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo <i>Jones-Taylor-Thornton</i> com distribuição Gama. Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.....	<b>127</b>
<b>Anexos 9.23:</b> Análise filogenética evolutiva do gene K01512 Acilfosfatase, obtido a partir do genoma de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> CBMAI 709, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo <i>Jones-Taylor-Thornton</i> . Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.....	<b>128</b>
<b>Anexo 9.24:</b> Análise filogenética evolutiva do gene K01908 Propionate--CoA ligase, obtido a partir do genoma de <i>Dietzia kunjamensis</i> CBMAI 705, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo WAG com distribuição Gama. Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.....	<b>129</b>
<b>Anexo 9.25:</b> Análise filogenética evolutiva do gene K01908 Propionate--CoA ligase, obtido a partir do genoma de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> CBMAI 709, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo WAG. Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.....	<b>130</b>
<b>Anexo 9.26:</b> Análise filogenética evolutiva do gene K01941 Urea carboxylase, obtido a partir do genoma de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> CBMAI 709, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo WAG. Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.....	<b>131</b>

<b>Anexo 9.27:</b> Análise filogenética evolutiva do gene K06446 Acil-CoA desidrogenase, obtido a partir do genoma de <i>Dietzia kunjensis</i> CBMAI 705, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo <i>Jones-Taylor-Thornton</i> . Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.....	<b>132</b>
<b>Anexo 9.28:</b> Análise filogenética do gene K06446 Acil-CoA desidrogenase, obtido a partir do genoma de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> CBMAI 709, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo <i>Jones-Taylor-Thornton</i> . Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.....	<b>133</b>
<b>Anexo 9.29:</b> Vias e genes de degradação de hidrocarbonetos únicos (sem participar em outras vias metabólicas) que foram encontrados na anotação funcional de <i>Dietzia kunjensis</i> CBMAI 705 e <i>Achromobacter xylosoxidans</i> CBMAI 709.....	<b>134</b>
<b>Anexo 9.30:</b> Vias, genes de degradação de Hidrocarbonetos de Carbono e porcentagem de similaridade que foram encontrados na anotação funcional de <i>Dietzia kunjensis</i> CBMAI 705 e <i>Achromobacter xylosoxidans</i> CBMAI 709 usando Blastx.....	<b>137</b>
<b>Anexo 9.31:</b> Declaração de Bioética e Biossegurança.....	<b>142</b>
<b>Anexo 9.32:</b> Declaração direitos autorais.....	<b>143</b>

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL .....	17
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1.	Hidrocarbonetos de petróleo .....	18
2.2.	Métodos de biorremediação .....	21
2.3.	Genômica funcional de bactérias com capacidade de degradação de hidrocarbonetos do petróleo.....	25
2.4.	Técnicas analíticas para detecção e quantificação da degradação de hidrocarbonetos.....	26
3.	ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	29
4.	CAPÍTULO 1: ANÁLISE GENÔMICA DE LINHAGENS BACTERIANAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO: ANOTAÇÃO TAXONÔMICA E FUNCIONAL .....	31
4.1.	INTRODUÇÃO .....	32
4.2.	OBJETIVOS .....	33
4.2.1.	Objetivo geral .....	33
4.2.2.	Objetivos Específicos .....	33
4.3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.3.1.	Seleção de cepas bacterianas .....	33
4.3.2.	Autenticação das linhagens de bactérias.....	34
4.3.3.	Sequenciamento do genoma, montagem e anotação .....	34
4.3.4.	Afiliação taxonômica baseada em dados de genoma .....	36
4.3.5.	Genômica comparativa .....	37
4.3.5.1.	Análise dos genes e vias de degradação de hidrocarbonetos do petróleo .....	37
4.3.5.2.	Análise dos grupos ortólogos .....	37
4.4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
4.4.1.	Identificação taxonômica .....	39
4.4.2.	Montagem dos genomas e análise das vias de degradação de hidrocarbonetos .....	49
4.4.3.	Genômica comparativa .....	55
4.4.3.1.	Comparação dos genes degradadores de hidrocarbonetos do petróleo.....	55
4.4.3.2.	Análise dos grupos ortólogos .....	60
4.5.	CONCLUSÕES.....	62
5.	CAPITULO II – AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO.....	63
5.1.	INTRODUÇÃO .....	63
5.2.	OBJETIVOS.....	65
5.2.1.	Objetivo Geral .....	65
5.2.2.	Objetivos Específicos .....	65

5.3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	66
5.3.1.	Seleção das linhagens e cultivo bacteriano .....	66
5.3.2.	Hidrocarbonetos utilizados.....	66
5.3.3.	Teste colorimétrico DCPIP e MTT .....	66
5.3.3.1.	Montagem de placas .....	67
5.3.4.	Teste de inibição cruzada .....	68
5.3.5.	Biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo .....	69
5.3.5.1.	Montagem do ensaio de biodegradação .....	69
5.3.5.2.	Dinâmica metabólica do consórcio.....	70
5.3.5.2.1.	Extração do RNA.....	70
5.3.5.2.2.	Síntese do cDNA e PCR do gene RNAr 16S.....	71
5.3.5.2.3.	Análise dos dados de sequenciamento .....	71
5.3.5.3.	Análise CG-EM dá biodegradação de hidrocarbonetos .....	72
5.3.6.	Análises estatísticas.....	73
5.4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	74
5.4.1.	Estruturação do consórcio microbiano.....	74
5.4.2.	Ensaio colorimétricos MTT e DCPIP .....	75
5.4.3.	Ensaio de biodegradação de hidrocarbonetos .....	77
5.5.	CONCLUSÕES.....	85
6.	CONCLUSÕES GERAIS .....	87
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS .....	87
8.	REFERÊNCIAS.....	88
9.	ANEXOS .....	109

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os hidrocarbonetos do petróleo são compostos de alto impacto social, político e econômico no mundo atual, sendo amplamente utilizados em diversas áreas da sociedade como a energética, farmacêutica, cosmética, têxtil e de transporte, entre muitas mais. Estes compostos são classificados em quatro grupos: alifáticos, aromáticos, resinas e asfaltenos, e apresentam propriedades prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente, como alta toxicidade e letalidade, recalcitrância e bioacumulação, o que pode provocar doenças em animais e humanos. Devido à alta demanda destes compostos pela sociedade moderna, sua produção e distribuição foram intensificadas nas últimas décadas, o que em algumas ocasiões gerou acidentes ambientais onde os ecossistemas foram afetados de tal forma que, mesmo após muito anos, ainda não conseguiram se recuperar. Estes eventos de contaminação ambiental ocorrem com frequência e em escala global, o que demanda a implementação de estratégias de remediação.

O desenvolvimento de técnicas para o tratamento e recuperação de ambientes é um campo de estudo amplo e contínuo. A biorremediação é uma técnica ambientalmente amigável que usa microrganismos e seus produtos para reduzir, degradar, desintoxicar, transformar ou mineralizar os poluentes. A biorremediação pode ser empregada de duas formas: *ex situ*, onde o tratamento da contaminação é feito fora do seu local de origem, e *in situ*, onde o tratamento é feito no mesmo local de contaminação. Para que o processo de biorremediação seja eficiente, é necessário entender as interações e o modo de ação dos microrganismos. A genômica funcional é um ramo da biologia molecular responsável por descrever as funções de genes e proteínas, através da determinação e sequenciamento completo do genoma de um organismo. Esta abordagem oferece ferramentas úteis para o entendimento do papel dos microrganismos nos ciclos biogeoquímicos que envolvem a degradação dos hidrocarbonetos do petróleo.

O campo da genômica funcional envolve o uso de plataformas de sequenciamento de nova geração, ferramentas bioinformáticas e bases de dados atualizadas, e podem contribuir para o entendimento de como os genes dos microrganismos respondem frente a fatores externos como os hidrocarbonetos do petróleo. Mas para isso, é preciso estudar também as respostas metabólicas e fisiológicas dos microrganismos, de maneira a relacionar o potencial genético com a expressão das funções, revelando informações que podem ser utilizadas em tratamentos de ambientes impactados através da biorremediação. Nesse sentido, este trabalho contemplou o sequenciamento dos genomas de linhagens bacterianas provenientes de reservatório de petróleo da Bacia de Campos, Brasil, com o intuito de caracterizar o potencial metabólico dos

genes e vias de degradação de hidrocarbonetos do petróleo de cada linhagem. Em adição, ensaios de degradação *in vitro* foram realizados utilizando as linhagens bacterianas sob a forma de consórcio a fim de confirmar o potencial genético demonstrado *in silico*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Hidrocarbonetos de petróleo

Os hidrocarbonetos do petróleo ocorrem naturalmente em depósitos no subsolo, em rochas sedimentares abaixo da superfície da terra, na forma de gases (gás natural), semi-sólidos (betume), sólidos (cera ou asfaltita) e líquidos (Ossai et al., 2020). Os hidrocarbonetos do petróleo consistem principalmente em proporções variáveis de carbono e hidrogênio; além de nitrogênio, enxofre e oxigênio (Varjani et al., 2015).

A palavra petróleo é derivada do latim *petra* (pedra/rocha) e *oleum* (óleo). O petróleo é considerado uma fonte de energia primária e necessária, sendo amplamente utilizada em diferentes setores, como indústria, transporte e atividades humanas cotidianas, portanto, é um recurso natural de alto valor mundial (Turner & Renegar, 2017).

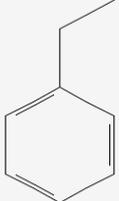
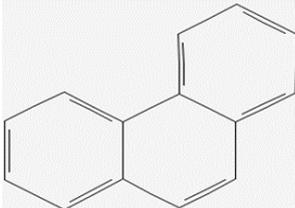
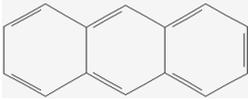
O petróleo tem em sua composição uma mistura complexa de compostos como hidrocarbonetos alifáticos, alicíclicos e aromáticos, e uma variedade de compostos aromáticos polares, polímeros de alto peso molecular, além de compostos como nitrogênio, oxigênio, enxofre e vestígios de metais (Wu et 2019). ‘A obtenção de subprodutos do petróleo se dá através de processos de refino (destilação), onde são gerados produtos como gasolina, querosene e óleo combustível’ (Fingas et al., 2017). Cada componente possui um comportamento químico único que afeta sua biodegradabilidade. Os hidrocarbonetos do petróleo são classificados em quatro grandes frações:

1) Saturados (alifáticos): “hidrocarbonetos cujos átomos de carbono se interligam apenas com ligações simples; são menos densos que a água. Estes compostos são representados pelos alcanos, como metano, etano, butano e propano, n-alcanos e cicloalcanos, como o ciclopropano, o ciclobutano, o ciclopentano e o ciclohexano” (Fatehbasharзад et al., 2022).

2) Aromáticos (hidrocarbonetos em anel): “caracterizam-se por possuírem um ou mais anéis benzênicos, os quais são formados por seis átomos de carbono ligados em uma cadeia fechada com ligações duplas e simples intercaladas” (Selley e Sonnenberg 2015). Certos aromáticos possuem a propriedade de ser muito voláteis e relativamente solúveis em água, além de

resistentes à degradação microbiana (Fatehbasharзад et al., 2022), mas cada um apresenta propriedades específicas (**Tabela 2.1**).

**Tabela 2.1:** Propriedades e características dos compostos aromáticos.

COMPOSTO	ETILBENZENO	FENANTRENO	ANTRACENO
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>
<b>Estrutura química</b>			
<b>Peso molecular</b>	106,16	178,23	178,28
<b>Ponto de fulgor</b>	15°C	171,11°C	121°C
<b>Pressão de vapor a 25°C</b>	9,6 mm Hg	1,21 x 10 <sup>-4</sup> mm Hg	6,56 x 10 <sup>-6</sup> mm Hg
<b>Solubilidade em água a 25°C</b>	170 mg/L	1,15 mg/L	4,34 x 10 <sup>-2</sup> mg/L
<b>Segurança química</b>	 Líquidos inflamáveis   Irritante   Perigo à saúde	 Irritante   Risco ambiental	 Irritante
<b>Referência</b>	(Ethylbenzene / C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> - PubChem, n.d.)	(Phenanthrene / C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> - PubChem, n.d.-a)	(Anthracene / (C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH) <sub>2</sub> - PubChem, n.d.-a)

3) Resinas: “contêm cerca de 18 a 65 átomos de carbono e numerosos grupos funcionais polares formados com N, S, O e traços de metais (Ni, V, Fe); as resinas são sólidos amorfos dissolvidos em óleo e compostas de moléculas aromáticas com uma longa cadeia alquil, solúveis em n-heptano e n-pentano e que contêm compostos polares não hidrocarbonetos” (Varjani, 2017).

4) Asfaltenos: “compostos viscosos, de alto peso molecular, que contém grupos policíclicos, substituídos de forma variável por grupos alquil, o que contribui para sua resistência à biodegradação” (Chandra et al. 2013).

Hoje, a indústria petrolífera atende grande parte das demandas globais de energia, bem como supre o mercado com uma ampla variedade de produtos essenciais à sociedade moderna, como polímeros, plásticos, produtos farmacêuticos, corantes, solventes, detergentes, entre outros (Varjani & Upasani, 2017). Inúmeras atividades fazem uso dos hidrocarbonetos do

petróleo, incluindo o uso de agentes refrigerantes e lubrificantes, condensados de compressores, processamento de metais, bem como as próprias atividades de exploração e transporte de petróleo (Bayat et al., 2016)

Os combustíveis fósseis contribuem, portanto, como a principal fonte de energia para as indústrias e a vida cotidiana em todo o mundo. Produtos de petróleo, como gasolina, diesel ou lubrificantes, são ainda usados em volumes maiores em comparação com outros produtos químicos de apelo ecológico (Logeshwaran et al., 2018). Os hidrocarbonetos do petróleo são um dos poluentes orgânicos persistentes no ambiente, geralmente são tóxicos e letais, dependendo da natureza química, composição e propriedades das frações do composto, assim como do modo, nível e tempo de exposição (Abdulazeez et al., 2017). Muitos hidrocarbonetos do petróleo são recalcitrantes e altamente tóxicos devido à presença de componentes hemototóxicos, carcinogênicos e teratogênicos, como BTEX (benzeno; tolueno; etilbenzeno; I-, m- e p-xilenos) e HAP (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) (Meckenstock et al., 2016; Souza et al., 2014). Estes compostos podem produzir nos seres vivos sintomas leves, como irritação ocular, irritação da pele, náusea, vômito e diarreia, ou também sintomas graves, como problemas de asfixia, anóxia, retardo de crescimento, alterações de reações metabólicas, câncer, anormalidades no desenvolvimento, desequilíbrio hormonal direta ou indiretamente, dano ao DNA e perda de pigmentação (Abdulazeez et al., 2017; Varjani, 2017).

Atividades antropogênicas, como vazamentos de tanques e derramamentos acidentais, descartes inadequados de efluentes, explosões em tubulações, sabotagem ou guerras, e naturais, como infiltrações de petróleo – *petroleum seeps*, resultam na liberação de poluentes na superfície do solo, nas águas subterrâneas e nos oceanos (Meckenstock et al., 2016; Ossai et al., 2020; Varjani, 2017) (**Tabela 2.2**).

**Tabela 2.2:** Casos de derramamento de óleo em diferentes locais ao longo do tempo.

Ambiente poluído	Ano	Local	Hidrocarboneto	Referência
Oceano	1978	Bretanha (França)	Petróleo	(Seip, 1984)
Ambiente aquático	1994	Ártico russo	Óleo bruto	( <i>Russians Struggle to Clean Up Spill</i> , 1994)
Oceano	2010	Golfo do México	Óleo bruto	(Richard Pallardy, 2010)
Oceano	2000	Brasil	Oleoduto da Petrobras	( <i>Oil Thieves Cause Spill in Rio de Janeiro's Guanabara Bay - BBC News</i> , 2018)
Oceano	1991	Coréia do Sul	Óleo bruto	( <i>Worst Oil Spills: The ABT Summer Oil Spill Incident</i> , n.d.)
Ambiente terrestre	2018	Canadá, EUA	Petróleo	(Agência France-Presse, 2018)
Ambiente aquático	2021	Venezuela	Óleo	(Mishra et al., 2022)
Oceano	2018	China	Óleo	( <i>Sunken Tanker Sanchi: Four Oil Slicks Seen, Says China</i> , 2018)
Oceano	2021	Venezuela	Óleo bruto	(Mishra et al., 2022)
Oceano	2000	Brasil	Óleo e HAPs	(Da Silva et al., 2007)
Oceano	2022	Peru	Óleo	(Yvette Sierra Praeli, 2022)

## 2.2. Métodos de biorremediação

“A biorremediação é definida como a redução, degradação, desintoxicação, transformação ou mineralização de poluentes através de mecanismos biológicos” (Olawoyin, 2016); consiste em acelerar o processo de limpeza natural, usando o potencial metabólico de organismos, como plantas, bactérias ou fungos, para degradar e transformar os poluentes em compostos minerais ou menos tóxicos (Agrawal et al., 2018; Martinko; & Clark, 2009). “Técnicas de biorremediação têm sido aplicadas para a descontaminação de solos superficiais e subterrâneos, além de sistemas de água doce e marinhos, e águas subterrâneas” (Panagiotakis & Dermatas, 2015).

As métodos de biorremediação podem ser classificadas em *in situ*, tratamento no local onde ocorreu a contaminação (Sharma et al., 2018), e *ex situ*, tratamento fora do local de ocorrência da contaminação (Lin et al., 2010). O tipo de técnica a ser empregada depende de vários fatores, como fonte e concentração de poluentes, características e tipo de local e economia de custos (Sanusi et al., 2016). A biorremediação pode ainda ser classificada de acordo com o tipo de

processo, ou seja, se natural ou estimulado, como a bioestimulação, que consiste em adicionar nutrientes na área contaminada a fim de estimular e melhorar a capacidade de degradação de hidrocarbonetos do petróleo por microrganismos autóctones (Imam et al., 2019), ou bioaugmentação, que se baseia na introdução de microrganismos específicos (autóctones ou alóctones) com capacidade metabólica de degradação de hidrocarbonetos do petróleo na área contaminada, a fim de melhorar ou acelerar o processo de remoção dos poluentes (Cycoń et al., 2017).

Os microrganismos desempenham um papel crucial na manutenção e desenvolvimento de ecossistemas; eles são usados para mitigar e restaurar os ambientes impactados por poluentes (biorremediação) através de seu metabolismo (Varjani, 2017), e apresentam múltiplas características de degradação e predileção para alguns contaminantes. “As bactérias são amplamente encontradas e distribuídas no ambiente; são consideradas degradadores primários e agentes mais ativos para a degradação de contaminantes do petróleo” (Abbasian et al., 2015; Meckenstock et al., 2016).

Em geral, as bactérias degradadoras nativas em condições normais (sem contaminação) estão presentes em níveis baixos ou indetectáveis. Por outro lado, “quando ocorre a contaminação com hidrocarbonetos no ambiente, a comunidade microbiana sofre uma pressão seletiva e aqueles indivíduos capazes de transformar estes compostos e utilizá-los como fonte de energia são favorecidos e selecionados em detrimento do restante da comunidade, o que resulta no aumento de sua abundância relativa” (Varjani, 2017). A **Tabela 2.3** compila diferentes estudos realizados sobre microrganismos com capacidade de degradação de hidrocarbonetos do petróleo.

**Tabela 2.3:** Exemplos de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos do petróleo.

<b>Microrganismo</b>	<b>Substrato</b>	<b>Referência</b>
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> ZX4	Fenantreno	(Xia et al., 2005)
<i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062	Pireno, Benzopireno	(Vieira et al., 2018)
<i>Bacillus subtilis</i>	Petróleo bruto, Fenantreno	(Oyetibo et al., 2017)
Consórcio: <i>Aspergillus flavus</i> H6; <i>A. nomius</i> H7; <i>Trichoderma asperellum</i> H15; <i>Klebsiella pneumoniae</i> B1; <i>Bacillus cereus</i> B4; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> B6; <i>Klebsiella</i> sp. B10; <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> B14	Pireno, Benzopireno	(Zafra et al., 2016)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCIM 5514	Petróleo bruto	(Sorkhoh et al., 1993)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Petróleo bruto, Pireno, Alcanos, aromáticos	(Varjani & Upasani, 2016)
<i>Ganoderma lucidum</i> CCG1	HAP, Fenantreno	(Meckenstock et al., 2016)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> VUN 10,003	Pireno, Fluoranteno, Benzantraceno, Benzopireno, Dibenzantraceno, Coroneno	(Agrawal et al., 2018)
<i>Mycobacterium</i> sp. PYR-1	Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Pireno, Benzopireno	(Agrawal et al., 2018)
<i>Bjerkandera</i> sp. linhagem BOS55	Benzopireno	(Juhasz et al., 2000)
<i>Micrococcus varians</i> AFS-2; <i>Pseudomonas putida</i> AFS-3; <i>A. faecalis</i> AFS-5; <i>Stenotrophomonas</i> ; <i>Klebsiella</i> ; <i>Bacillus</i>	Naftaleno, Fenantreno, Criseno, Antraceno,	(Agrawal et al., 2018; Stahl., 2016)
<i>Citrobacter</i> ; <i>Raoultella</i>	Fenantreno, Pireno	(Agrawal et al., 2018)
<i>B. fungorum</i> ; <i>M. gilvum</i>	Pireno, Fluoranteno	(Kotterman et al., 1998)
<i>Gordonia</i> sp. Q8	Naftaleno, Fenantreno, Antraceno, Pireno	(RC et al., 2012)
<i>Bacillus</i> , <i>Micrococcus</i> ; <i>Staphylococcus</i>	Antraceno	(Wu et al., 2019)
<i>Pseudomonas</i> ; <i>Alcaligenes</i> ; <i>Psychrobacter</i> sp.; <i>Achromobacter</i> sp. AYS3; <i>Marinobacter</i> sp. AYS4; <i>Rhodanobacter</i> sp. AYS5	Fenantreno, pireno, alcanos, benzopireno	(Arulazhagan et al., 2014)(Jacques et al., 2008)
<i>Mycobacterium fortuitum</i> ; <i>Bacillus cereus</i> ; <i>Microbacterium</i> sp.; <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> ; Microbacteriaceae	Fenantreno, Antraceno	(Cerqueira et al., 2011)
<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> ; <i>Bacillus cibi</i> ; <i>B. megaterium</i>	Fenantreno	(Jacques et al., 2008)

<i>Bacillus</i> sp. linhagem 4, <i>Microbacterium</i> sp. linhagem 1, <i>Methylobacterium</i> linhagem 1, <i>Pseudomonas stutzeri</i> linhagem 1	Diidrofenantreno	(Suzan Pantaroto de Vasconcellos et al., 2009a)
<i>P. plecoglossicida</i> strain PB1; <i>Pseudomonas</i> sp. PB2	Aromáticos	(Nwinyi, Ajayi, and Amund 2016)
<i>Paenibacillus</i> sp. PRNK-6	Fluoreno	(Reddy et al., 2017)
<i>Micrococcus</i> sp. CBMAI 636, <i>Dietzia maris</i> CBMAI 705, <i>Bacillus subtilis</i> CBMAI 707, <i>Achromobacter xylosoxidans</i> CBMAI 709	n-alcanos (C14-C33), isoprenoides (Pr e Ph), fenantreno e metilfenantreno	(Dellagnezze, Bruna Martins et al., 2014)
Consórcio: Actinobacteria; Deinococcus-Thermus; Bacteroidetes; Firmicutes. Gêneros abundantes: <i>Truepera</i> ; <i>Starkeya</i> ; <i>Phyllobacterium</i> ; <i>Cellulosimicrobium</i>	Fenantreno	(F. Wang et al., 2016)

A taxa de biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo depende da condição fisiológica dos microrganismos, os quais são influenciados por vários fatores ambientais (N. Das & Chandran, 2011). A degradação completa destes compostos na natureza é realizada por comunidades complexas, onde vários de seus componentes atuam sinergicamente, contribuindo com enzimas e metabólitos distintos para a transformação ou mineralização do hidrocarboneto (N. Das & Chandran, 2011). Neste sentido, o uso de consórcios microbianos, composto por cepas que ocupam uma parte do nicho ambiental, é uma estratégia eficiente para a mineralização ou degradação completa destes compostos (Srivastava et al., 2021) e tem se tornado um campo emergente da ecologia sintética, com potencial de reproduzir funções e aplicações de interesse biotecnológico, bioenergético e de biorremediação (Qian et al., 2020). A constituição dos consórcios pode ser realizada com distintas populações microbianas, com a finalidade de melhorar as taxas de degradação dos compostos (Johns et al., 2016).

As interações dos consórcios microbianos têm impactado de forma positiva as pesquisas na microbiologia aplicada, engenharia de bioprocessos e biotecnologia, melhorando o desempenho dos diversos processos de degradação, garantindo sua aplicação industrial e estabilidade a longo prazo (Ghosh et al., 2016).

Os consórcios podem ser estruturados usando cepas nativas do ambiente contaminado ou simplesmente com cepas que já mostraram uma ação eficaz sobre o composto. A escolha adequada das bactérias que formarão este consórcio é importante, principalmente para que ocorra sinergismo entre os metabolismos e para que não haja competição e morte entre elas mesmas (Jiménez et al., 2019).

Entender mais os mecanismos de ação, diversidade e resposta dos consórcios nos leva à exploração genotípica e fenotípica de cada indivíduo que conforma um consórcio. Segundo Kobras e colaboradores, “é um grande desafio a compreensão das mudanças nos genes e suas sequências de DNA, as quais podem alterar a função do gene e afetar um fenótipo ao longo do tempo” (Kobras et al., 2021). Dessa forma, a genômica funcional, pode ajudar na compressão da diversidade, composição e modo de ação da comunidade (Imhoff, 2016).

### **2.3. Genômica funcional de bactérias com capacidade de degradação de hidrocarbonetos do petróleo**

O sequenciamento de microrganismos fornece conhecimentos sobre a base genética para os principais metabolismos, como biossíntese de metabólitos secundários, resistência a antibióticos, respostas bacterianas a mudanças ambientais, transporte e secreção de moléculas, vias de degradação do hidrocarbonetos, dentre outros (Pal et al., 2017). A análise de genomas revelou que a adaptação de microrganismos em ambientes contaminados é garantida em nível genético por meio dos sistemas de dois componentes, quimiotaxia, termosensibilidade e absorção e desintoxicação de nutrientes (D. Das et al., 2015). Várias enzimas e vias para a degradação de componentes de petróleo bruto também foram identificadas, incluindo vias metabólicas do tipo alcano monooxigenase (AlkB) e citocromo P450 para a transformação de alcanos de cadeia curta a média (Van Beilen et al., 2006) e genes envolvidos na degradação de hidrocarbonetos aromáticos, como naftaleno desoxigenase (NDO) e catecol 2,3 desoxigenase (C2,3D; ex: *cbzE*, *catE*) (Singh et al., 2015).

Atualmente, projetos de sequenciamento do genoma de alguns microrganismos que utilizam hidrocarbonetos do petróleo têm sido desenvolvidos, avaliando o potencial genético e os mecanismos de sobrevivência (Rojo, 2009). Por exemplo, *Alcanivorax borkumensis*, estudado por (Schneiker et al., 2006a), contém um genoma simplificado com poucos genes relacionados à produção de energia e elementos genéticos móveis, mas com genes abundantes relacionados à degradação do óleo. “Por meio do sequenciamento, foi verificado que o gênero *Oleispira* sofreu grandes eventos de transferência horizontal de genes, sendo identificada uma variedade de alcano mono-oxigenases, osmoprotetores, sideróforos e vias de eliminação de micronutrientes” (Kube et al., 2013). “A análise do genoma da bactéria *Achromobacter* HZ01 indicou um bom potencial de biorremediação de ambientes marinhos contaminados com petróleo bruto, mostrando as vias de degradação dos hidrocarbonetos”; no estudo, também foi demonstrado que essa bactéria não possui alcano mono-oxigenase LadA de cadeia longa, a qual está relacionada à degradação dos alcanos C15 -C36 (Feng et al., 2007). Os genomas das

bactérias *Pseudomonas putida* GPo1, *Acinetobacter* spp. e *Rhodococcus* spp. foram estudados por (Margesin et al., 2003), mostrando a prevalência de sete genótipos envolvidos na degradação de n-alcenos e dois genótipos na degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, indicando o potencial que eles apresentam para a remoção de contaminantes específicos de hidrocarbonetos do petróleo.

Portanto, a genômica funcional pode auxiliar no entendimento das interações potenciais que podem ocorrer entre os genes de bactérias isoladas de ambientes associados a hidrocarbonetos do petróleo, assim como na forma como estas interagem metabolicamente no catabolismo dos compostos. Consequentemente, com este conhecimento adquirido é possível otimizar processos na indústria ou ambiente, contribuindo com a diminuição de custos, tempo e trabalho.

#### **2.4. Técnicas analíticas para detecção e quantificação da degradação de hidrocarbonetos**

Os hidrocarbonetos do petróleo possuem uma ampla diversidade de compostos; devido aos avanços científicos e no desenvolvimento de equipamentos para análises químicas, tem sido possível a identificação qualitativa e quantitativa dos hidrocarbonetos do petróleo em diversas amostras.

Os ensaios colorimétricos permitem analisar as atividades biológicas de forma preliminar (qualitativa). Devido às suas, como simplicidade, baixo custo, rapidez e praticidade, constituem uma ótima ferramenta de triagem das atividades de interesse (Rao et al., 2021). A detecção destas é baseada na densidade ótica e mudança de cor dos compostos ao reagir com fatores externos, permitindo a observação destas reações (J. Yang et al., 2019). Os reagentes usados para os ensaios colorimétricos diferem dependendo da enzima, reação e/ou aplicação de interesse.

Neste trabalho foram utilizados os corantes brometo de tetrazólio [3- (4,5- dimetil -2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio] - MTT e o corante redox 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP). O MTT é um indicador sensível e confiável da atividade metabólica celular (Mosmann, 1983a); é amplamente usado para a avaliação de células vivas em diversas áreas, principalmente em pesquisa celular, para determinar a atividade bactericida de macrófagos, e o crescimento e sobrevivência celular quando confrontados com diferentes compostos (Bounous et al., 1992; Mosmann, 1983; Van Tonder et al., 2015; H. Wang et al., 2010).

O teste se baseia na redução de MTT, que é formado por um corante tetrazólio amarelo solúvel em água, que é reduzido a cristais de formazan de cor púrpura; esta reação se deve

principalmente pela ação das desidrogenases mitocondriais das células ativas (H. Wang et al., 2010).

O corante redox 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) tem sido usado por décadas como um corante redox e acceptor de dois elétrons (Jahn et al., 2020). O acceptor de elétrons DCPIP tem um potencial redox (+0,217 V) semelhante ao do citocromo c1, que atua na cadeia transportadora de elétrons (Sanjay Kumar & Acharya, 1999). O corante oxidado (antes de doar o elétron) mostra uma cor azul, ao ser reduzido (quando recebe o elétron) por um único elétron torna-se rosa, e o DCPIP totalmente reduzido é incolor, o teste é considerado positivo quando o corante muda de azul (estado oxidado) para incolor (estado reduzido), na presença de hidrocarbonetos (Sharma et al., 2018)(Peixoto et al., 2018). Este último é usado como um acceptor de elétrons artificial para ensaios enzimáticos, por isso tem sido utilizado para diversos estudos de metabolismo em plantas (Yamashita & Butler, 1968). Os métodos colorimétricos são estratégias eficientes para a seleção rápida de microrganismos que degradam petróleo, o qual é utilizado como única fonte de carbono no meio de cultura.

Os métodos analíticos para os hidrocarbonetos do petróleo variam muito dependendo do objetivo, devido a que cada um fornece resultados dentro de uma faixa específica, enquanto alguns são inespecíficos (Adeniji et al., 2017). Cada uma das análises depende do tipo de amostra e subprodutos derivados da degradação dos hidrocarbonetos do petróleo (American Petroleum Institute et al., 1998).

As técnicas mais comumente utilizadas incluem:

- Espectroscopia de infravermelho (IR) (Método EPA 418.1), fornece uma sonda sensível para grupos funcionais específicos em polímeros. Especialmente quando se trata de polímeros de hidrocarbonetos, como poliestirenos e polidienos, grupos funcionais como hidróxi, amina e carbonila podem ser facilmente detectados (Quirk & Pickel, 2012).
- Gravimetria (Método EPA 1664A), para óleo - graxa e material extraível de n-hexano de sílica gel. Consiste na extração de solvente, evaporação e pesagem a um peso constante, no método de óleo e graxa não diferencia a matéria orgânica polar da porção de hidrocarbonetos do petróleo (Adeniji et al., 2017).
- Cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama (GC/FID) (Método EPA 8015), é amplamente utilizado para análise de lipídios. A análise é normalmente

realizada em altas temperaturas em colunas não polares ou médias polares de baixo sangramento (Mohan et al., 2019).

- Cromatografia gasosa com detecção espectrométrica de massa (GC/MSD) (Métodos EPA 8270 e 625), é uma técnica de separação capaz de separar misturas altamente complexas com base principalmente em diferenças de ponto de ebulição/ pressão de vapor e de polaridade. O cromatógrafo opera introduzindo uma amostra através de uma porta de injeção, o gás transportador (fase móvel) passa pela entrada e varre a amostra para a coluna, onde está a fase estacionária. A coluna é colocada em um forno com temperatura controlada. A separação cromatográfica ocorre à medida que a mistura percorre a coluna, entrando em um detector que fornece um sinal eletrônico (Stauffer et al., 2008)

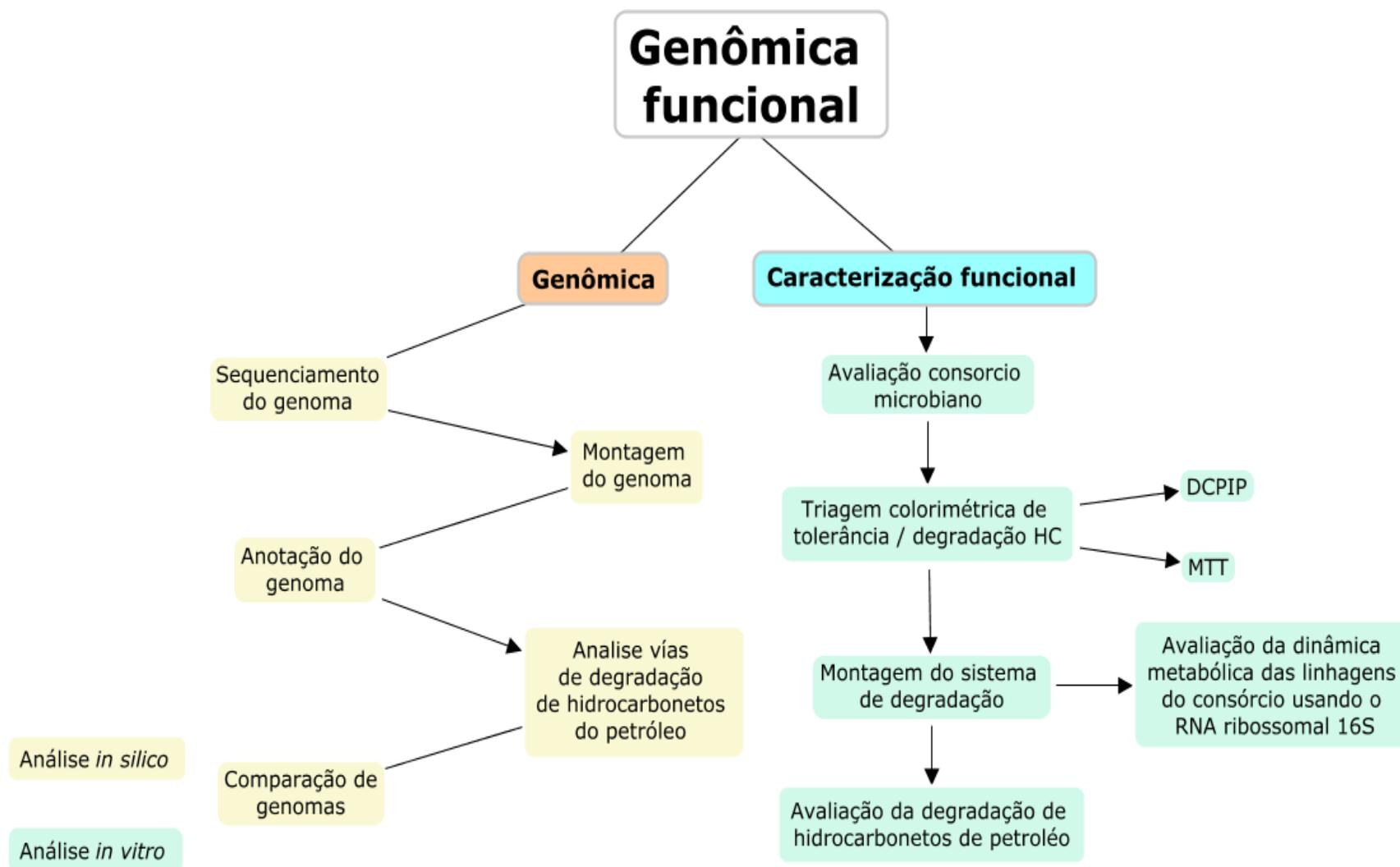
Face ao exposto anteriormente, este trabalho teve como objetivo a caracterização das vias de degradação de hidrocarbonetos de bactérias isoladas de reservatórios de petróleo através da genômica funcional, e a confirmação e quantificação do seu potencial de degradação em ensaios *in vitro* utilizando cromatografia gasosa.

### 3. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Este trabalho consistiu na caracterização genômica de linhagens de bactérias isoladas de reservatórios de petróleo através de análises *in silico*, buscando revelar o potencial de degradação de hidrocarbonetos do petróleo. Com estes dados também foi possível realizar a atribuição taxonômica em nível de espécies e análises filogenéticas dos genes de degradação. Em uma segunda etapa, ensaios funcionais permitiram testar *in vitro* a capacidade de degradação de um consorcio bacteriano. Por esse motivo, este trabalho foi dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo, foi explorada a abordagem genômica funcional e comparativa de quatro linhagens isoladas da indústria de petróleo; utilizando o sequenciamento em plataforma Illumina, montagem dos genomas e anotação funcional dos genes que fazem parte de vias metabólicas para a degradação de compostos derivados de hidrocarbonetos do petróleo (alifáticos e aromáticos). A genômica comparativa foi feita através da busca de genes únicos nas duas linhagens com maior potencial genético de degradação (maior quantidade de genes envolvidos nestas vias metabólicas) e comparação destes genes com aqueles de organismos relacionados.

No segundo capítulo, foi estruturado um consorcio bacteriano com as linhagens que possuíam genes de degradação de hidrocarbonetos do petróleo específicos, já estudadas em trabalhos prévios, e que mostraram melhores resultados de tolerância e degradação de hidrocarbonetos do petróleo em testes colorimétricos. A confirmação e quantificação da degradação foi avaliada em ensaios *in vitro* utilizando um consórcio das linhagens de bactérias e uma mistura de hidrocarbonetos do petróleo. A abundancia relativa dos componentes do consorcio foi investigada ao longo da degradação usando sequenciamento da região V3-V4 do gene RNA ribossomal 16S.

As duas abordagens empregadas são complementares e trazem novo conhecimento sobre a genômica funcional destas bactérias, fornecendo subsídios para a criação de um produto ou processo útil para a recuperação ambiental por meio da biorremediação. O fluxograma do trabalho é resumido na **Figura 3.1**.



**Figura 3.1.** Fluxograma geral do trabalho.

#### **4. CAPÍTULO 1: ANÁLISE GENÔMICA DE LINHAGENS BACTERIANAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO: ANOTAÇÃO TAXONÔMICA E FUNCIONAL**

Os hidrocarbonetos do petróleo e subprodutos obtidos destes são compostos utilizados em diversas indústrias e na produção da maioria dos produtos atualmente empregados em nível mundial. Por serem compostos amplamente utilizados, os problemas decorrentes de vazamentos e derramamentos, ao longo da cadeia produtiva, são frequentes e globais e resultam na poluição do meio ambiente e no comprometimento da saúde dos organismos vivos. Uma forma de mitigar o impacto causado por estes poluentes é o uso da técnica de biorremediação, que consiste no uso de microrganismos ou de seus produtos (metabólitos e enzimas) para a remoção e metabolização dos compostos. O estudo de microrganismos isolados de ambientes associados a hidrocarbonetos do petróleo são prioridade atualmente; e o emprego da genômica funcional pode contribuir na compreensão detalhada dos mecanismos de degradação dos compostos poluentes e fornecer informações que auxiliem no cultivo, preservação e emprego destes microrganismos para a recuperação de áreas impactadas. O grande potencial que possuem os microrganismos para a degradação de hidrocarbonetos do petróleo foi comprovado em diversas pesquisas, as quais revelaram remoção parcial ou total dos poluentes. Neste sentido, este projeto busca caracterizar os genes e as vias de degradação de hidrocarbonetos do bactérias do Acervo de Pesquisa em Petróleo e Energia – APPE, isoladas de ambientes da indústria do petróleo, sequenciando e anotando funcionalmente o genoma bacteriano. Os resultados mostraram-se promissores para o uso futuro destes organismos na biorremediação de compostos ambientalmente poluentes.

## 4.1. INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos do petróleo são compostos usados diariamente pela sociedade, o que resulta em uma demanda global maior em relação a outros produtos e compostos (Varjani & Upasani, 2017). Como consequência, os acidentes de contaminação ambiental aumentaram significativamente nas últimas décadas, danificando os diferentes ecossistemas, modificando as interações entre os organismos autóctones e provocando perda de flora e fauna (Abdulazeez et al., 2017). Com o fim de recuperar estes ambientes, se torna necessário o desenvolvimento de técnicas ambientalmente amigáveis, econômicas e efetivas. Atualmente existem diferentes técnicas de recuperação ambiental, baseadas em métodos físicos, químicos ou biológicos, as quais apresentam princípios distintos e que podem ser aplicadas individualmente ou de maneira combinada (Bradl & Xenidis, 2005). A biorremediação é um processo de recuperação ambiental que utiliza microrganismos ou seus produtos com o objetivo de transformar compostos orgânicos em inorgânicos, levando à formação de compostos inertes ou não tóxicos (Stahl., 2016).

Muitos estudos revelaram que existe um grande número de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos isoladas de ambientes poluídos e bactérias isoladas de outras fontes que possuem esta capacidade (Xu et al., 2018). Alguns gêneros encontrados na literatura que tem capacidade de degradação de hidrocarbonetos do petróleo são *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alkanindiges*, *Alteromonas*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Dietzia*, *Enterobacter*, *Kocuria*, *Marinobacter*, *Mycobacterium*, *Pandora*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptobacillus* (Xu et al., 2018). O desenvolvimento da biotecnologia microbiana e tecnologia de sequenciamento de alto rendimento trazem o entendimento dos genes degradadores de hidrocarbonetos com o fim de ser utilizados na degradação de vários contaminantes do petróleo e sus derivados (Hazen et al., 2010); sendo os biomarcadores úteis para estimar o potencial de biorremediação das bactérias nos locais contaminados (Y. Yang et al., 2015)

Neste sentido, este estudo teve como objetivo caracterizar o potencial genético de bactérias isoladas de reservatórios de petróleo para a degradação de hidrocarbonetos do petróleo, detalhando os genes e as vias metabólicas envolvidas, através da genômica funcional e comparativa, utilizando para isso a biologia molecular e as técnicas recentes de sequenciamento de DNA.

## 4.2. OBJETIVOS

### 4.2.1. Objetivo geral

Caracterizar os genes e vias de degradação de hidrocarbonetos de bactérias isoladas de ambientes da indústria do petróleo (*Micrococcus* sp. CBMAI 636, *Dietzia maris* CBMAI 705, *Bacillus subtilis* CBMAI 707, *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709) através de genômica funcional e comparativa.

### 4.2.2. Objetivos Específicos

- Sequenciamento do genoma das bactérias isoladas de reservatórios de petróleo e já determinadas em estudos prévios como degradadoras de hidrocarbonetos do petróleo (alcanos e/ou aromáticos);
- Montagem dos genomas e anotação gênica;
- Análise das vias de degradação de hidrocarbonetos do petróleo (alcanos e/ou aromáticos) das bactérias alvo;
- Comparação genômica das vias de degradação de hidrocarbonetos com aqueles genomas de organismos próximos filogeneticamente depositados nas bases de dados.

## 4.3. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.3.1. Seleção de cepas bacterianas

As bactérias usadas neste projeto estão depositadas no Acervo de Pesquisa em Petróleo e Energia (APPE), que é uma sub-coleção fechada de pesquisa da Coleção Brasileira de Microrganismos do Ambiente e Indústria – CBMAI da UNICAMP (**Tabela 4.1**). Foram selecionadas quatro bactérias que apresentaram excelente atividade de degradação de hidrocarbonetos alcanos e/ou aromáticos (di-hidrofenantreno, fitano, fenantreno, fenantreno + <sub>n</sub>octano, n-alcanos, benzo-pireno, benzo-antraceno e benzo-fluoranteno) em estudos prévios (Dellagnezze, Bruna Martins et al., 2014; Dellagnezze et al., 2016; Suzan Pantaroto de Vasconcellos et al., 2010; S. P. Vasconcellos et al., 2011), a saber: *Micrococcus* sp. CBMAI 636, *Dietzia maris* CBMAI 705, *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709.

**Tabela 4.1:** Origem das linhagens bacterianas.

ID CBMAI	NOME	ORIGEM	REFERÊNCIA
636	<i>Micrococcus</i> sp.	Água de formação de petróleo	(de Vasconcellos et al., 2009)
705	<i>Dietzia maris</i>	Óleo (reservatório de petróleo da Bacia de Campos)	(de Vasconcellos et al., 2009)
707	<i>Bacillus subtilis</i>	Óleo (reservatório de petróleo da Bacia de Campos)	(de Vasconcellos et al., 2009)
709	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Óleo (reservatório de petróleo da Bacia de Campos)	(de Vasconcellos et al., 2009)

#### 4.3.2. Autenticação das linhagens de bactérias

Com o objetivo de confirmar a identificação das linhagens de bactérias em estudo, estas foram reativadas em meio ágar nutriente (NA). Posteriormente, foi feita a extração de DNA genômico com o uso do kit Power Soil DNA Isolation (Mobio, EUA). A integridade, quantidade e qualidade do DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% (v/v) e com o uso dos equipamentos Qubit e Nanodrop, respectivamente. A confirmação da identidade das bactérias foi realizada através de sequenciamento parcial do gene RNAr 16S, conforme descrito por de Vasconcellos et al. (2009). Para a análise filogenética, as sequências parciais do gene RNAr 16S obtidas com os *primers* 10F e 1100R (WG et al., 1991) foram montadas em um *contig* (sequência consenso única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados do EZBiocloud (Yoon et al., 2017). Foram então selecionadas sequências de microrganismos relacionados para a construção do dendrograma. As sequências de DNA foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (Edgar, 2004) e as análises de distância genética foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão X 2.2 (Sudhir Kumar et al., 2018). A matriz de distância foi calculada com o modelo de Kimura 2 parâmetros (Kimura, 1980) e a construção do dendrograma foi feita usando o método de clusterização *Neighbor-Joining* (Saitou & Ne, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens.

#### 4.3.3. Sequenciamento do genoma, montagem e anotação

Após confirmação da identidade das bactérias, o DNA genômico destas foi enviado para sequenciamento pela empresa NGS SOLUÇÕES GENÔMICAS, usando a plataforma Illumina e o kit Nextera XT para a construção das bibliotecas. Os dados brutos foram avaliados usando o software FastQC (Andrews, 2010), que permite acessar a qualidade de cada base para as

análises subsequentes. O programa Trimmomatic (Bolger et al., 2014) foi usado para remover as sequências adaptadoras e as bases de baixa qualidade, assim como filtrar sequências menores que 150 pb.

A montagem dos genomas foi feita com o programa SPAdes v3.12.0 (Bankevich et al., 2012; Nurk et al., 2013), que é comumente utilizado na montagem de genomas bacterianos. A qualidade das montagens foi avaliada com o programa Quast (Gurevich et al., 2013), para determinar o N50 e número de *contigs* obtidos. Da mesma forma, o software CheckM v1.1.2 foi usado para estimar a integridade e contaminação dos genomas usando genes marcadores para cada linhagem (Parks et al., 2015) (**Figura 4.1**).

A anotação estrutural dos genomas foi feita usando os programas Prokka (Seemann, 2014) e Prodigal (Hyatt et al., 2010) (linha de comando). Ambos fornecem a predição e localização de genes do genoma inteiro com alta eficiência, precisão e rapidez. A anotação funcional dos genomas foi feita com os servidores de anotação automática *on-line* EGGNOG v5.0 (Huerta-Cepas et al., 2017, 2019), que é um banco de dados público de relações de ortologia (KO), anotação funcional e relações evolutivas dos genes, BlastKOALA v2.2 (Kanehisa et al., 2016), que atribui KO em ajuda com KEGG (Kanehisa, 2019; Kanehisa & Goto, 2000) na reconstrução das vias metabólicas e, por último, BLAST (Madden, 2003), que alinha as sequências locais contrastando as diferentes informações nas bases de dados. Por fim, os genes presentes nas vias metabólicas de degradação de hidrocarbonetos do petróleo foram representados usando o programa PathVisio v3.3.0 (Kutmon et al., 2015) (**Figura 4.1**). Para mensurar a participação das linhagens nas vias de degradação foi calculada a porcentagem de participação em cada via, obtida por meio da fórmula:

$$x = \frac{gmPVMm * 100}{gTVM}$$

**gmPVM:** genes do microrganismo que participam da via metabólica;

**gTVM:** genes totais da via metabólica de acordo com KEGG (Kanehisa, 2019; Kanehisa & Goto, 2000);

**x:** porcentagem de participação do microrganismo na via metabólica

#### 4.3.4. Afiliação taxonômica baseada em dados de genoma

As sequências do gene RNAr 16S das linhagens foram recuperadas dos genomas montados e submetidas ao servidor *online* EZBiocloud (Yoon et al., 2017). Foi obtida uma lista dos organismos de referência mais próximos, baseada em valores de similaridade. As sequências das linhagens e dos organismos de referência foram alinhadas usando o programa CLUSTAL X (Edgar, 2004) e as análises de inferência filogenética foram conduzidas no programa MEGA X v2.2 (Sudhir Kumar et al., 2018). A matriz de distância foi calculada com o modelo de substituição nucleotídica de (Tamura & Nei, 1993) e a construção do dendrograma foi feita com o método de *Maximum Likelihood* (Cam, 1990). Valores de *bootstrap* foram calculados a partir de 1.000 re-amostragens. Para confirmar a identificação baseada nas análises filogenéticas do gene RNAr 16S em nível de espécie, foi usada a ferramenta PhyloPhlAn (versão 3.0.2), que possui 400 genes marcadores universais, com o fim de detectar os marcadores filogenéticos no genoma das linhagens em estudo e realizar a inferência evolutiva através da geração da árvore filogenômica (Asnicar et al., 2020; Segata et al., 2013). Embora o gene RNAr 16S seja comumente usado como marcador taxonômico em estudos de diversidade, seu poder de resolução em nível de espécie é reduzido em determinados grupos taxonômicos, como para os filos Actinobacteriota e Proteobacteria (J. S. Johnson et al., 2019). Em adição, foram calculados os valores OGRI (*Overall Genome Related Index*) (Chun et al., 2018). Estes valores incluem a Identidade Nucleotídica Média (*Average Nucleotide Identity* - ANI), Identidade Nucleotídica Média com base no BLAST+ BLAST + (ANIb), Identidade Nucleotídica Média com base em MUMmer (ANIm) e o índice de correlação de assinatura de tetra-nucleotídeo - Tetra, e foram calculadas no servidor web Jspecies (Richter et al., 2016) (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/#analyse>), usando o alinhador Blast e Mummer. Os valores de hibridização digital de DNA-DNA (dDDH) pode ser feito com as formulas d0: é o comprimento de todos os pares de segmentos de alta pontuação dividido pelo comprimento total do genoma, d4: soma de todas as identidades encontradas em pares de segmentos de alta pontuação dividida pelo comprimento total dos pares de segmentos de alta pontuação e d6: soma de todas as identidades encontradas em pares de segmentos de alta pontuação dividida pelo comprimento total do genoma (Meier-Kolthoff et al., 2013). A identidade média nucleotídica (ANI) (Colston et al., 2014) pode ser calculada com os algoritmos utilizados pelo BLAST + (ANIb) (Kurtz et al., 2004) ou MUMmer (ANIm) (Camacho et al., 2009). O índice de correlação de assinatura de tetra-nucleotídeo Tetra, o qual é um parâmetro livre de alinhamento correlacionado com ANI, determina a variabilidade de sequências longas de DNA em genomas microbianos (Noble et al., 1998; Richter et al., 2016).

O valor de DDH para delimitação de espécies é  $\geq 70\%$ , ou seja, linhagens que apresentem porcentagem de hibridização de DNA-DNA do que 70% pertencem a espécies distintas (Meier-Kolthoff et al., 2013). Os índices foram calculados em relação aos genomas mais próximos filogeneticamente com o software online Genome-to-Genome Distance Calculator 3.0 (Meier-Kolthoff & Göker, 2019) usando o servidor TYGS [TYPE (STRAIN) GENOME SERVER] (<https://tygs.dsmz.de>). Para confirmar alguns dos resultados obtidos, foi realizada a análise bioquímica com o sistema API® 20 NE (BIOMÉRIEUX).

#### **4.3.5. Genômica comparativa**

##### **4.3.5.1. Análise dos genes e vias de degradação de hidrocarbonetos do petróleo**

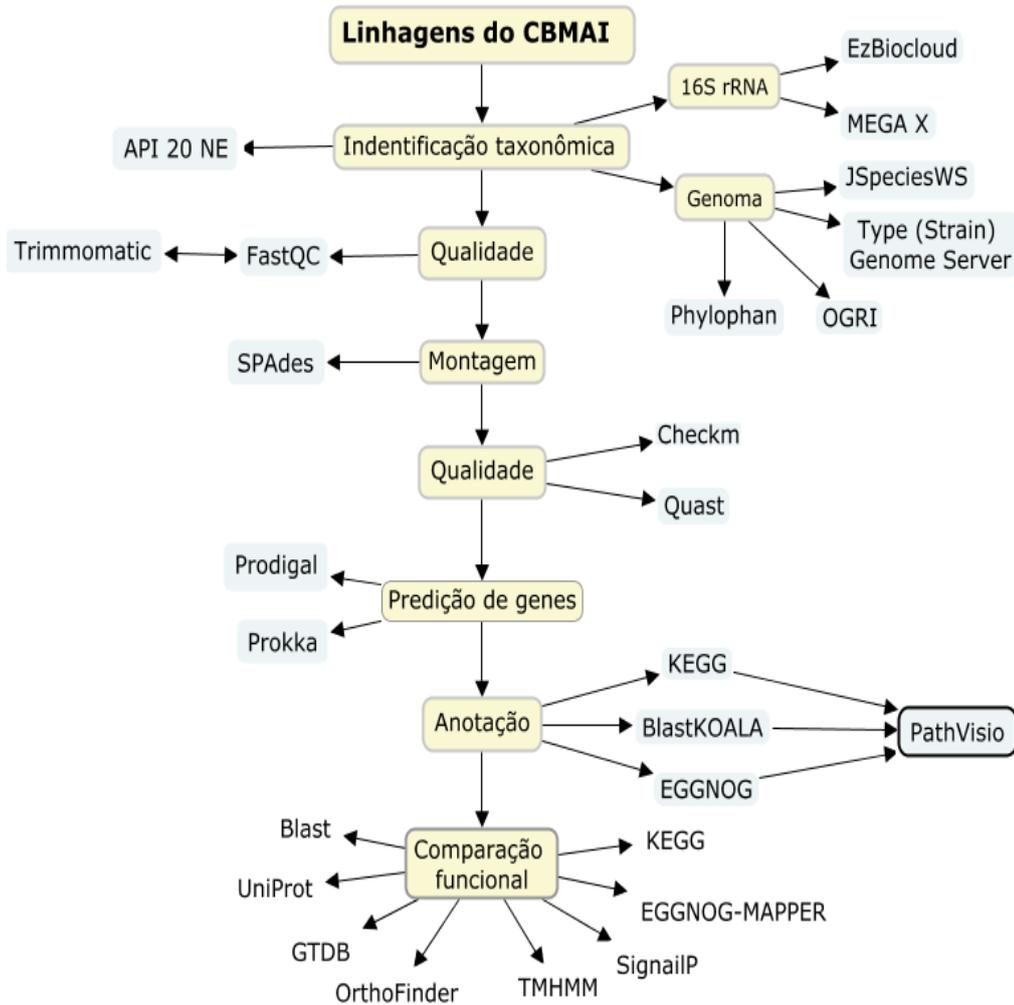
Os genomas das linhagens com maior participação nas vias de degradação foram selecionados. A partir da anotação funcional, os genes de degradação presentes em todas as linhagens foram filtrados, e aqueles que estavam envolvidos em apenas uma via de degradação foram escolhidos para esta análise. As sequências dos genes escolhidos foram submetidas na ferramenta blastp do NCBI, usando o banco de dados *RefSeq select proteins* (refseq select) (M. Johnson et al., 2008). As sequências mais proximamente relacionadas (dez sequências), com base na identidade, foram recuperadas para realizar uma análise de filogenia com o intuito de investigar padrões de distribuição dos genes analisados assim como eventos de transferência genética horizontal. Um alinhamento múltiplo, incluindo as sequências das linhagens em estudo e aquelas usadas como referência, foi realizado usando o algoritmo CLUSTAL X (Julie et al., 2003). A partir do alinhamento se determinou o melhor modelo evolutivo para as sequências analisadas, usando o software MEGA X v2.2 (Sudhir Kumar et al., 2018). A reconstrução das relações filogenéticas foi realizada usando o método *Maximum Likelihood* (Cobat et al., 2010) e o suporte estatístico dos agrupamentos foi calculado por análises de *bootstrap* com 1.000 reamostragens. O arquivo Newick da árvore foi recuperado do software MEGA X v2.2 (Sudhir Kumar et al., 2018).

##### **4.3.5.2. Análise dos grupos ortólogos**

Com o intuito de identificar possíveis adaptações evolutivas relacionadas ao ambiente de isolamento, o genoma com maior participação nas vias de degradação foi comparado com o genoma de cinco bactérias de referência da mesma família. Os critérios para escolha das bactérias de referência foram **i)** locais de isolamento totalmente distintos e **ii)** alto grau de

qualidade dos genomas. A base de dados GTDB ([https://data.gtdb.ecogenomic.org/releases/release89/89.0/gtdb\\_r89\\_rep\\_genomes.protein.faa.tar.gz](https://data.gtdb.ecogenomic.org/releases/release89/89.0/gtdb_r89_rep_genomes.protein.faa.tar.gz)) foi usada para recuperar os genomas e as informações sobre as bactérias de referência foram obtidas do Genome Taxonomy Database (<https://gtdb.ecogenomic.org/>).

A ferramenta OrthoFinder (Emms & Kelly, 2019) foi usada para identificar os genes ortólogos entre os genomas em estudo. A busca consistiu em encontrar os grupos ortólogos (GO) de genes relacionados com a degradação, captação e tolerância ou resistência aos hidrocarbonetos do petróleo utilizando a ferramenta PhyloPhlAn 3.0 (Asnicar et al., 2020). A comparação e anotação de grupos de genes ortólogos entre as bactérias de referência e a linhagem em estudo foram realizadas usando KofamKOALA - KEGG Orthology Search com um valor E de 0,001 (Aramaki et al., 2019), EGGNOG-MAPPER (Huerta-Cepas et al., 2019), Peptídeo Sinal (Almagro Armenteros et al., 2019), Domínio Transmembrana (Krogh et al., 2001; S et al., 2001) e Antismash (Blin et al., 2021) (**Figura 4.1**).



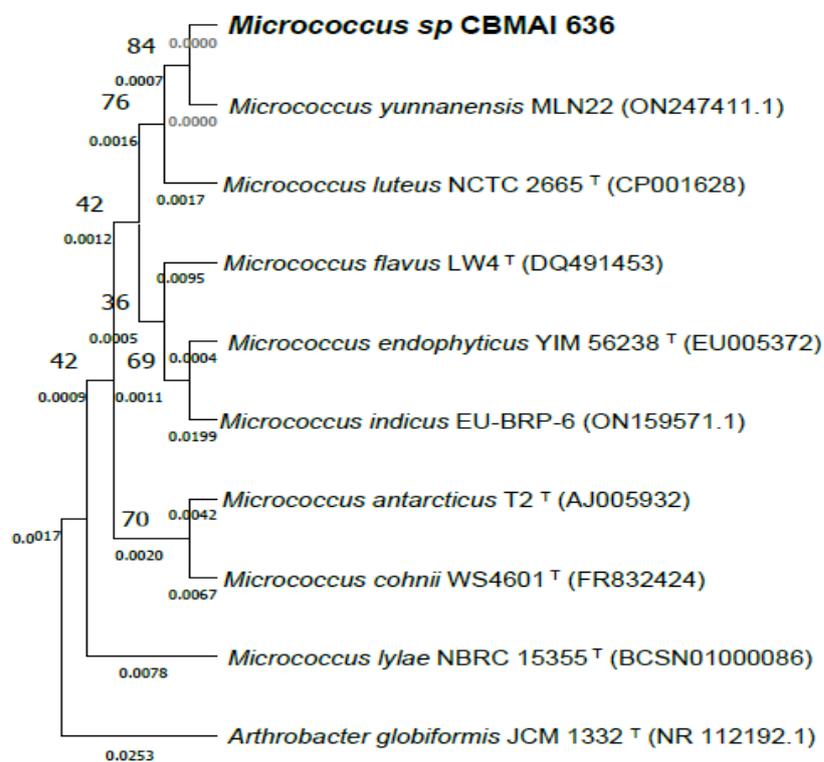
**Figura 4.1:** Pipeline da análise bioinformática dos dados genômicos.

## 4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

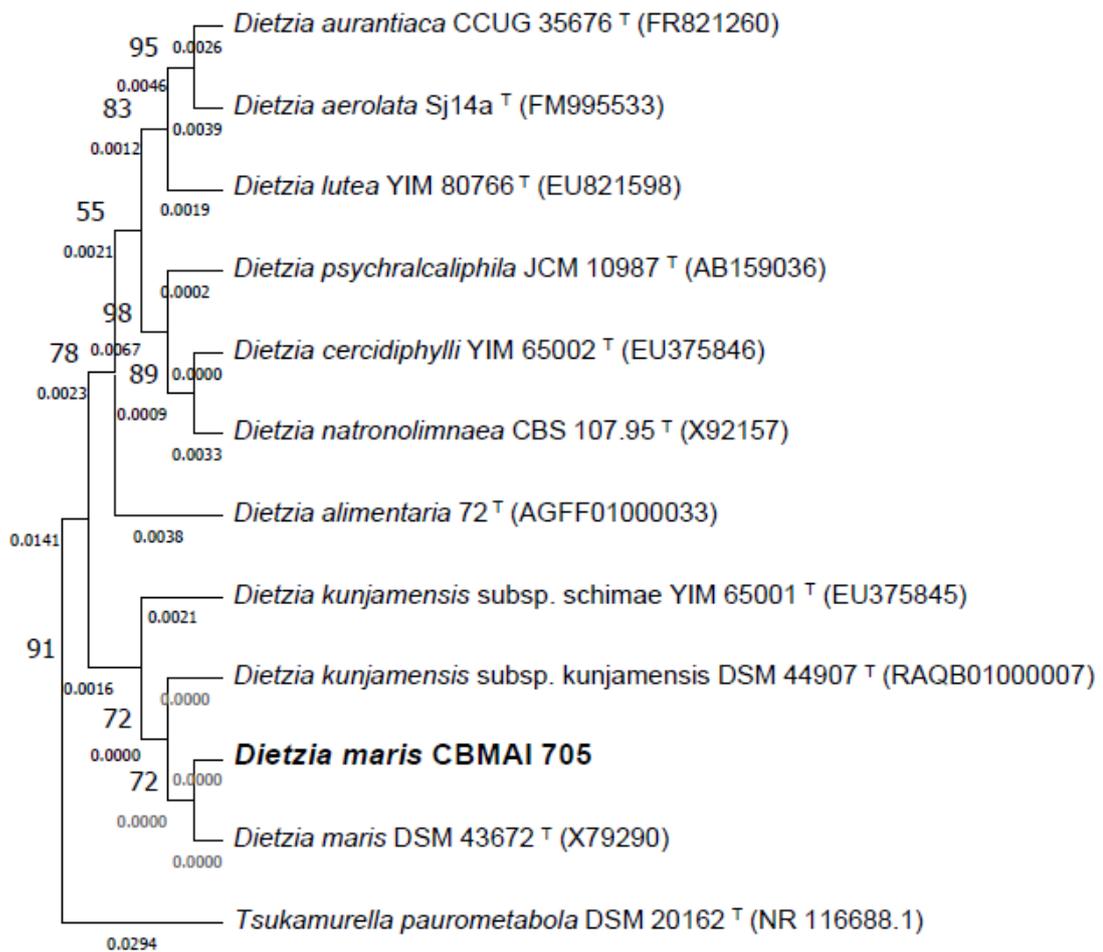
### 4.4.1. Identificação taxonômica

A análise das sequências parciais do gene RNAr 16S foi realizada mediante sequenciamento Sanger para a afiliação taxonômica. As linhagens foram identificadas como pertencendo aos gêneros *Micrococcus* (*Micrococcus* sp. CBMAI 636), *Dietzia* (*Dietzia maris* CBMAI 705), *Bacillus* (*Bacillus subtilis* CBMAI 707) e *Achromobacter* (*Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709), corroborando com os resultados prévios descritos por (Dellagnezze, Bruna Martins et al., 2014) **Anexos 9.1, 9.2, 9.3 9.4**). Usando as sequências do gene RNAr 16S recuperadas do genoma, a reconstrução filogenética corroborou as análises prévias (**Figuras 4.2, 4.3, 4.4, 4.5**). As análises filogenéticas do gene RNAr 16S a partir dos genomas de *Micrococcus* sp CBMAI 636, *Dietzia maris* CBMAI 705, *Bacillus subtilis* CBMAI 707, *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 e microrganismos relacionados recuperados do

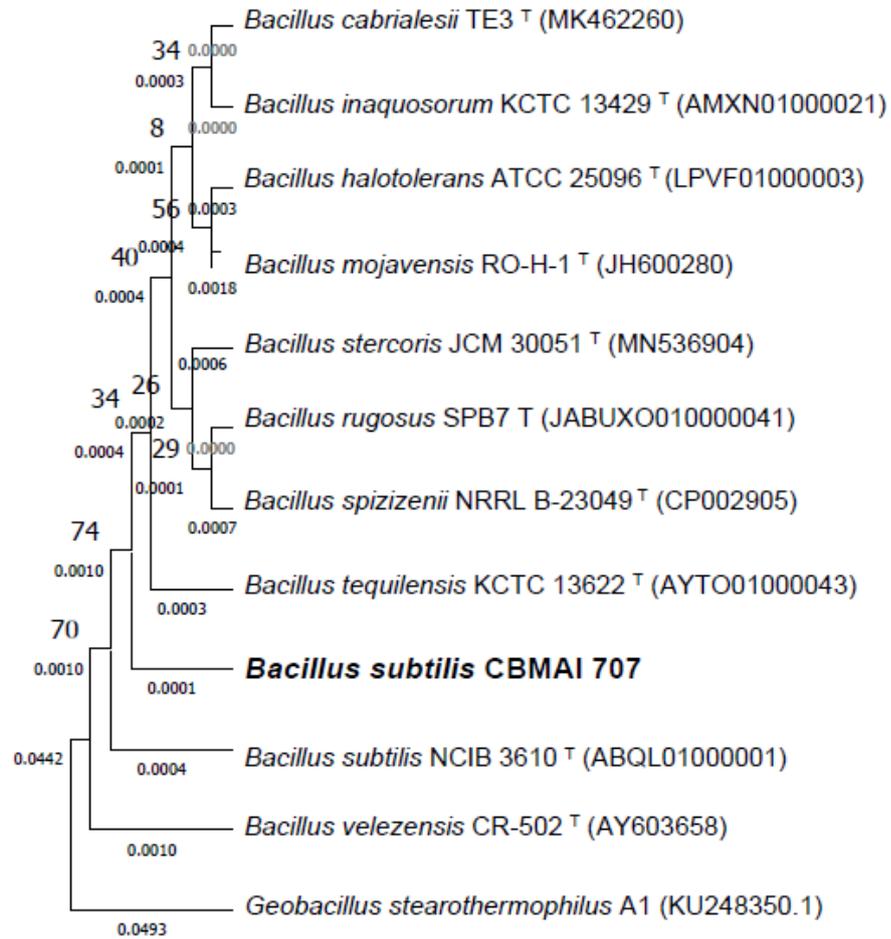
banco de dados EzTaxon, foram feitas utilizando o método de reconstrução filogenética de Neighbor joining e o modelo evolutivo de Tamura-Nei, com distribuição Gama. No caso da linhagem *Micrococcus luteus* CBMAI 636, um total de 1.212 posições nucleotídicas foi avaliado e *Arthrobacter globiformis* JCM 1332<sup>T</sup> foi usado como *outgroup*; no caso de *Dietzia maris* CBMAI 705, um total de 932 posições nucleotídicas foi avaliado e *Tsukamurella paurometabola* DSM 20162<sup>T</sup> foi usada como *outgroup*. Para a linhagem *Bacillus subtilis* CBMAI 707, um total de 1414 posições nucleotídicas foi avaliado e *Geobacillus stearothermophilus* A1 foi usado como *outgroup*. Para *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709, um total de 1453 posições nucleotídicas foi avaliado e usado como *outgroup* *Bordetella avium* ATCC 35086. Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados nas árvores. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.



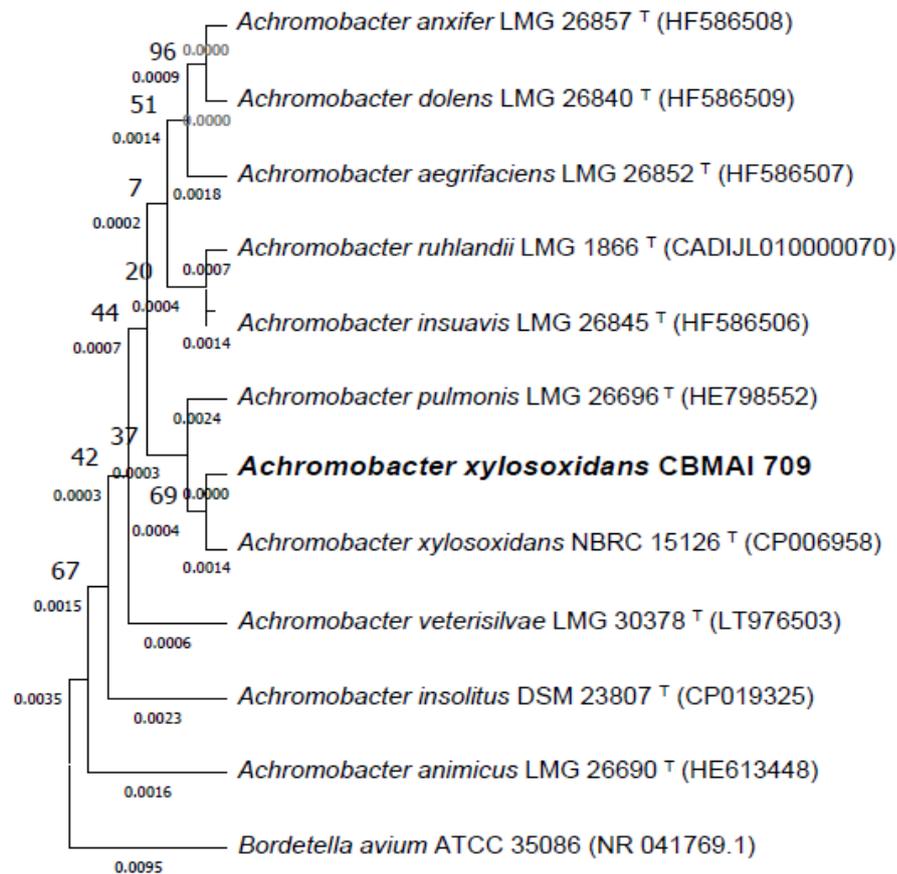
**Figura 4.2:** Análise filogenética da sequência do gene RNAr 16S obtida a partir do genoma de *Micrococcus sp* CBMAI 636, utilizando o método de reconstrução filogenética de Neighbor joining.



**Figura 4.3:** Análise filogenética da sequência do gene RNAr 16S obtida a partir do genoma de *Dietzia maris* CBMAI 705, utilizando o método de reconstrução filogenética de Neighbor joining.



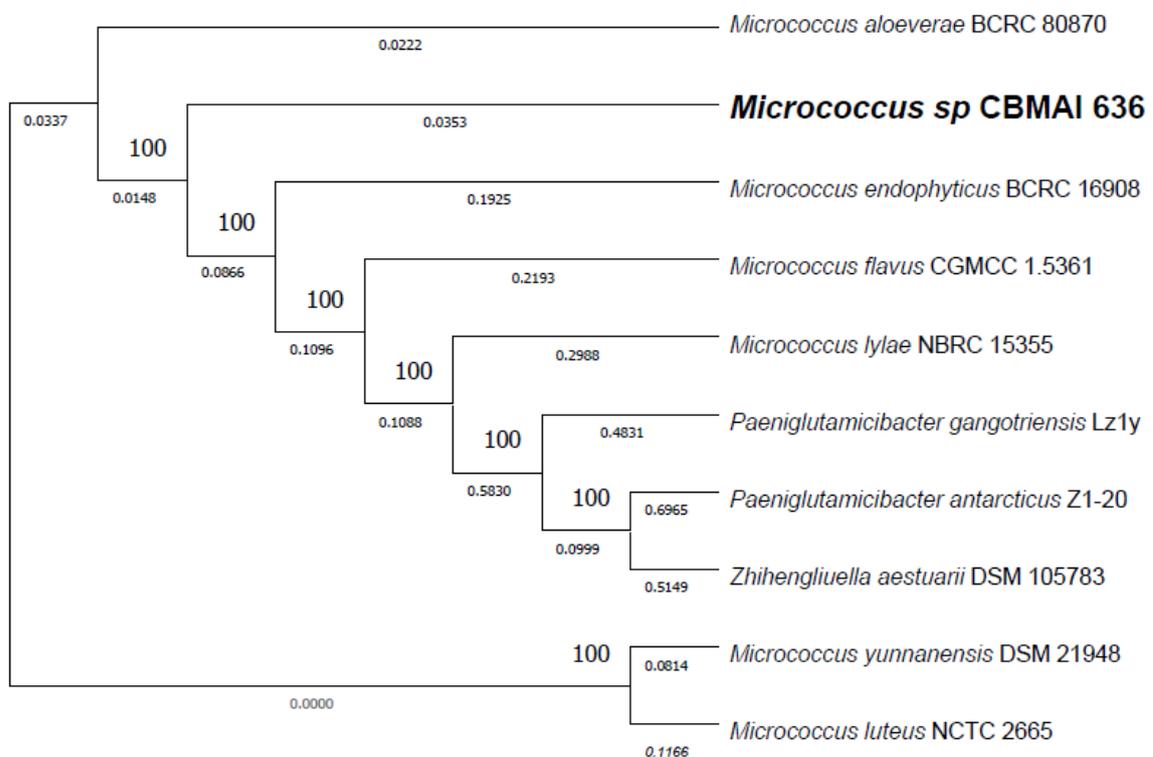
**Figura 4.4:** Análise filogenética da sequência do gene RNAr 16S obtida a partir do genoma de *Bacillus subtilis* CBMAI 707, utilizando o método de reconstrução filogenética de Neighbor joining.



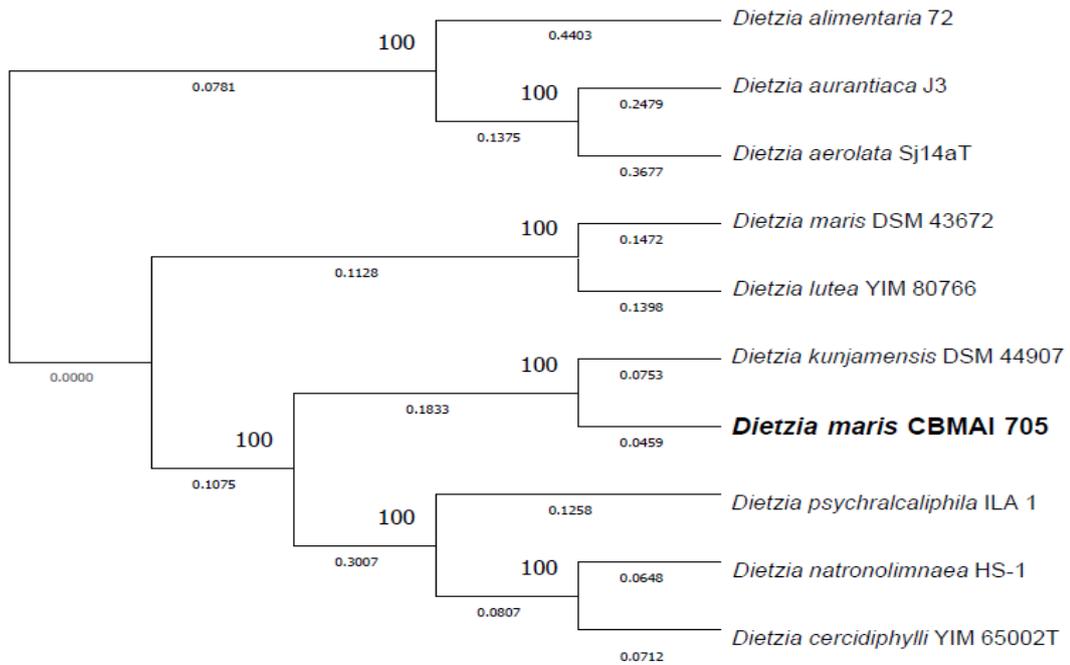
**Figura 4.5:** Análise filogenética da sequência do gene RNAr 16S obtida a partir do genoma de *Achromobacter xylooxidans* CBMAI 70, utilizando o método de reconstrução filogenética de Neighbor joining.

Embora o gene RNAr 16S seja comumente usado como marcador taxonômico em estudos de diversidade, seu poder de resolução em nível de espécie é reduzido em determinados grupos taxonômicos, como para os filos Actinobacteriota e Proteobacteria (J. S. Johnson et al., 2019). Com o advento das tecnologias de sequenciamento de alto rendimento, foi possível recuperar o genoma completo dos organismos. Assim, as análises de filogenia sistemática puderam incluir um grande número de loci e, conseqüentemente, melhorar a definição dos limites entre espécies. Neste sentido, foi proposto usar a ferramenta PhyloPhlAn, que emprega 400 genes marcadores universais, com o fim de detectar os marcadores filogenéticos no genoma das linhagens em estudo e fazer a comparação para uma inferência filogenética mais acurada. As árvores filogenômicas geradas com esta ferramenta podem ser visualizadas nas **Figuras 4.6, 4.7, 4.8, 4.9**. As distâncias evolutivas foram calculadas a partir de 400 genes que codificam para proteínas ubíquas e filogeneticamente informativas. Ortólogos dessas proteínas foram detectados usando USERCH. Vários alinhamentos de sequência dessas proteínas foram gerados

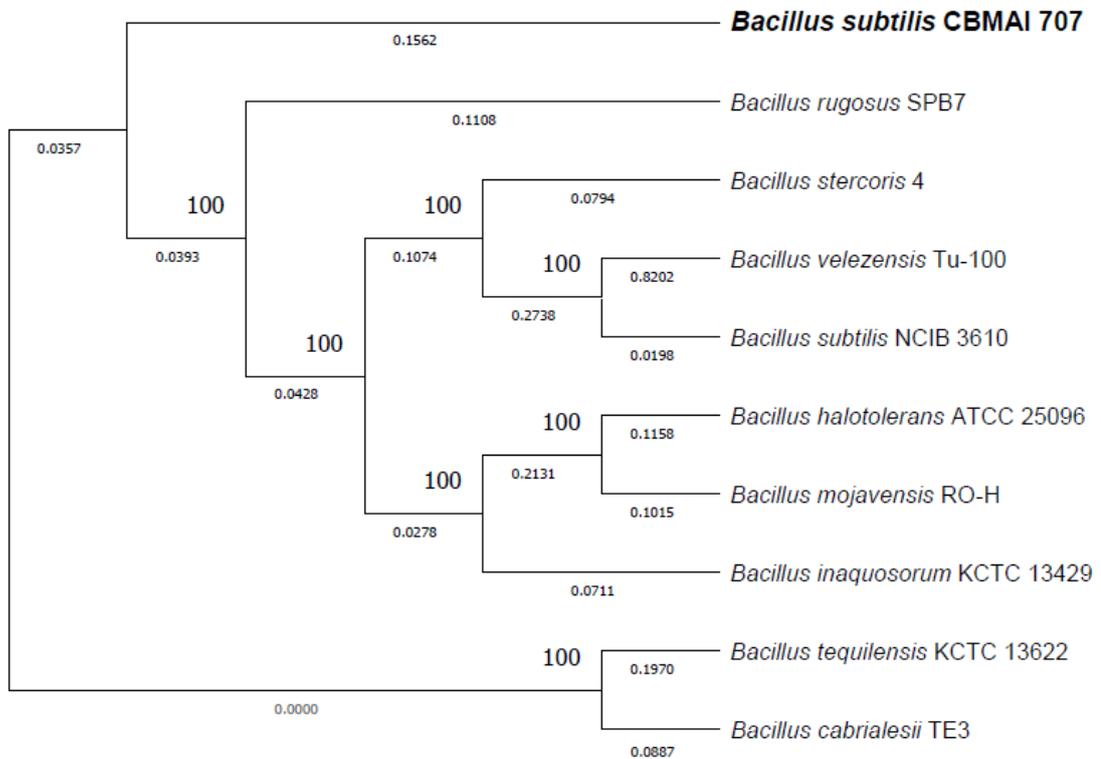
usando MUSLE. A construção final da árvore foi realizada usando FastME 2.1.6.1. Os números acima dos ramos são distâncias genéticas e valores de suporte de pseudo-bootstrap do GBDP > 60% a partir de 100 réplicas, com um suporte médio de ramos de 35,8%. Estas árvores foram conclusivas para todas as linhagens quanto à identificação taxonômica em nível de espécie, com exceção da linhagem *Micrococcus* sp. CBMAI 636. A história evolutiva das espécies pode ser descrita usando sequencias de genes marcadores que contenham regiões conservadas, universais, e que tenham pouca probabilidade de sofrer transferência horizontal e mutações que resultem em alta variabilidade. As sequencias conservadas permitem o uso abrangente do marcador e as regiões variáveis permitem a discriminação dos limites entre espécies. No entanto, o poder de resolução é dependente do sinal filogenético do marcador e do número de marcadores. Alguns genes ortólogos com cópia única no genoma podem ajudar na resolução de especiação bacteriana, assim como os genes *housekeeping* que possuem a característica de poder superar sinais conflitantes de transferência horizontal e recombinação durante a inferência de filogenia (Case et al., 2007).



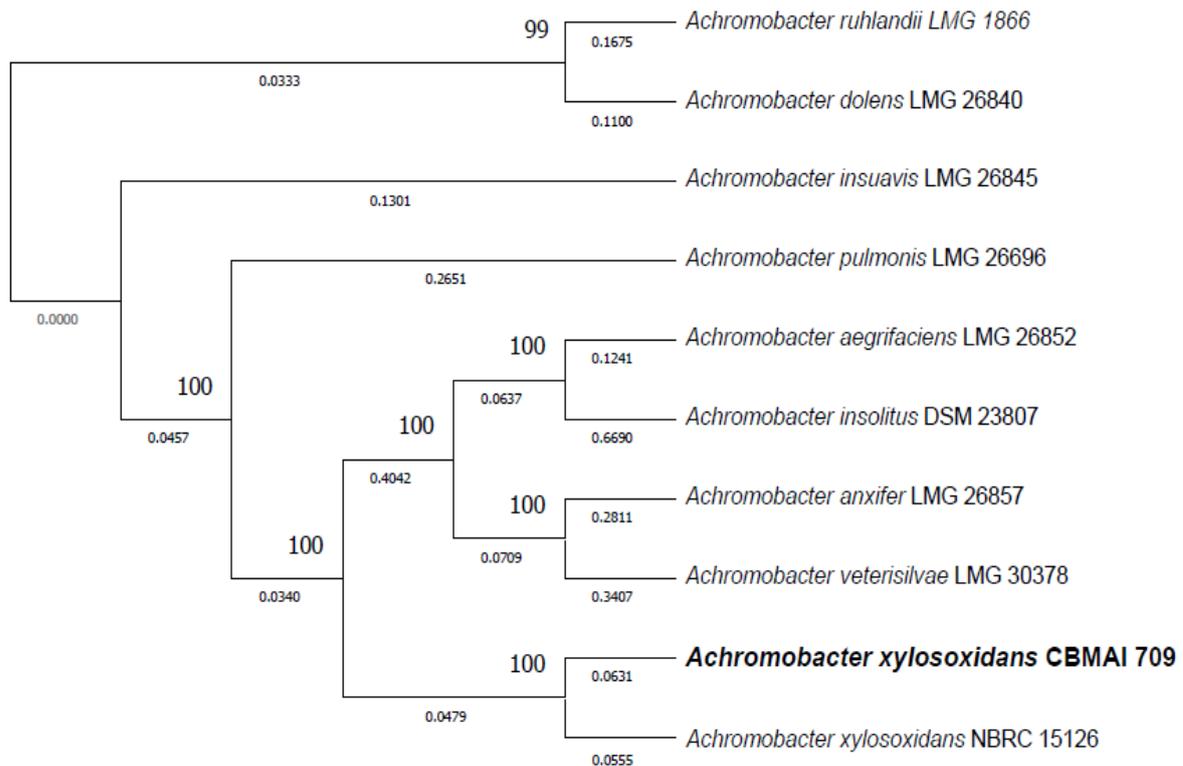
**Figura 4.6:** Árvore filogenética construída a partir das sequencias de 400 genes marcadores universais do genoma da linhagem identificada como *Micrococcus* sp. CBMAI 636.



**Figura 4.7:** Árvore filogenética construída a partir das sequências de 400 genes marcadores universais do genoma da linhagem identificada como *Dietzia maris* CBMAI 705.



**Figura 4.8:** Árvore filogenética construída a partir das sequências de 400 genes marcadores universais do genoma da linhagem identificada como *Bacillus subtilis* CBMAI 707.



**Figura 4.9:** Árvore filogenética construída a partir das sequências de 400 genes marcadores universais do genoma da linhagem identificada como *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709.

Complementarmente, foram calculados os índices OGRI (*Overall Genome Relatedness Index*) (Tabela 4.2). O uso de índices calculados a partir de dados de sequência de genomas completos são capazes de auxiliar na identificação de espécies. O cálculo dos índices OGRI entre as linhagens em estudo e as linhagens tipo resultou em valores superiores a 70% para a dDDH e valores maiores que 95% para o ANI em relação a uma das linhagens tipo usadas como referência, indicando que pertencem à mesma espécie.

Assim, os valores ANI (ANI<sub>b</sub> e ANI<sub>m</sub>), (TNA) e dDDH (d<sub>0</sub>, d<sub>4</sub>, d<sub>6</sub>) permitiram associar taxonomicamente as linhagens CBMAI 705, CBMAI 707 e CBMAI 709 com as espécies *Dietzia kunjamenis*, *Bacillus subtilis* e *Achromobacter xylosoxidans*, respectivamente (Tabela 4.2). De acordo com os índices OGRI se estabeleceu que a linhagem *Dietzia maris* CBMAI 705 pertence a espécie *Dietzia kunjamenis*, por essa razão esta linhagem foi renomeada para *Dietzia kunjamenis* CBMAI 705. Segundo as métricas calculadas, a linhagem CBMAI 636 foi associada com até três espécies do gênero *Micrococcus* (*M. yunnanensis*, *M. aloeverae* e *M. luteus*). Este resultado exhibe uma incongruência taxonômica, porque os valores de ANI e DDH estão acima dos limites de determinação de espécie bacteriana em relação às três espécies descritas usadas como referência. Estes resultados sugerem que a linhagem CBMAI 636 e as

três linhagens tipo pertencem à mesma espécie. De acordo com Huang et al. (2019), as espécies *M. yunnanensis* e *M. aloeverae* são sinônimos heterotípicos da espécie *M. luteus*. Portanto, a linhagem CBMAI 636 foi classificada como pertencendo a esta espécie.

**Tabela 4.2:** Cálculo dos valores de ANI (ANiB e ANIm), TNA, dDDH (d0, d4, d6) e % GC entre as linhagens em estudo e linhagens proximamente relacionadas com base nos dados de sequenciamento do genoma completo.

Microrganismo alvo	Microrganismos relacionados	ANiB (%)	ANIm %	dDDH (d0, in %)	dDDH (d4, in %)	dDDH (d6, in %)	TNA*	Diferença G + C (%)
<b><i>Micrococcus sp.</i> CBMAI 636</b>	<i>Micrococcus yunnanensis</i> DSM 21948	96,89	97,47	84,6	76,7	86,2	0,999	0,01
	<i>Micrococcus aloeverae</i> BCRC 80870	96,68	97,44	84,5	75,8	85,9	0,99884	0,08
	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665	96,17	97,09	76	72,7	78,1	0,99849	0,09
	<i>Micrococcus endophyticus</i> BCRC 16908	88,96	91,9	32,6	43	33	0,99329	1,66
<b><i>Dietzia maris</i> CBMAI 705</b>	<i>Dietzia kunjamensis</i> DSM 44907	96,18	97,1	79,1	73,1	81,3	0,9991	0,45
	<i>Dietzia kunjamensis</i> subsp. schimae DSM 45139	95,65	96,51	76,7	68,5	77,9	0,99884	0,37
	<i>Dietzia cinnamea</i> NBRC 102147	84,54	86,99	54,4	28,5	46,6	0,99501	0,61
	<i>Dietzia maris</i> DSM 43672	84,61	86,97	56	28,5	47,7	0,99562	0,7
<b><i>Bacillus subtilis</i> CBMAI 707</b>	<i>Bacillus subtilis</i> NCIB 3610	98,07	98,46	88,2	85,8	90,6	0,99889	0,03
	<i>Bacillus stercoris</i> D7XPN1	94,78	95,41	82,7	62	81,4	0,99729	0,38
	<i>Bacillus spizizenii</i> TU-B-10	92,7	93,2	80,9	50,6	76,6	0,99798	0,41
	<i>Bacillus inaquosorum</i> KCTC 13429	92,48	93,07	75,7	50,1	72,1	0,99751	0,27
<b><i>Achromobacter xylooxidans</i> CBMAI 709</b>	<i>Achromobacter xylooxidans</i> NBRC 15126	98,57	99,01	89,9	90,5	92,5	0,9998	0,15
	<i>Achromobacter ruhlandii</i> LMG 1866	91,56	92,91	71,2	47,4	67,4	0,99911	0,12
	<i>Achromobacter denitrificans</i> NBRC 15125	83,72	87,46	40,2	29,6	36,8	0,97489	0,05
	<i>Achromobacter aegrifaciens</i> LMG 26852	83,61	87,39	43,1	28,9	38,7	0,96848	1,49

**Nota:** A separação das linhagens é representada por cores, a cor verde refere-se a *Micrococcus sp.* CBMAI 636, vermelho para *Dietzia maris* CBMAI 705, azul para *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e mostarda para *Achromobacter xylooxidans* CBMAI 709, sendo que a cor mais escura se refere ao maior valor para cada análise. \* Os resultados são apresentados como uma lista de ocorrências classificada pela correlação mais alta. Os valores do Tetra: os valores acima de **0,999** indicam que o organismo alvo pertence à mesma espécie.

Buscando discriminar a linhagem de *Micrococcus* sp. CBMAI 636 das espécies de referência, foram realizados testes bioquímicos utilizando o API System 20, cujos resultados estão descritos na **Tabela 4.3**. Porém, os resultados não foram conclusivos, sugerindo que as pequenas diferenças em nível genômico não são expressas de forma consistente no fenótipo das espécies bacterianas.

**Tabela 4.3:** Comparação das características bioquímicas de *Micrococcus* sp. CBMAI 636 com aquelas de outras espécies de *Micrococcus* relacionadas usando o API System 20.

Bioquímica		<i>Micrococcus</i> sp. CBMAI 636	<i>Micrococcus</i> <i>yunnanensis</i> BCRC 80243 <sup>T</sup>	<i>Micrococcus</i> <i>luteus</i> BCRC 80739 <sup>T</sup>	<i>Micrococcus</i> <i>aloeverae</i> BCRC 80870 <sup>T</sup>
Nitrato de potássio	NO3	-	-	-	-
L-triptofano	TRP	-	+	+	-
D-glucose	GLU	+	-	-	-
L-arginina	ADH	-	+	+	+
Ureia	URE	-	-	+	-
D-glucose	GLU	+	+	-	+
L-arabinose	ARA	-	-	-	-
D-manose	MNE	-	+	+	-
D-manitol	MAN	-	-	-	-
N-acetilglucosamina	NAG	-	-	-	-
D-maltose	MAL	+	+	+	+
Gluconato de potássio	GNT	-	-	-	-
Ácido cáprico	CAP	-	+	-	-
Ácido adípico	ADI	+	-	-	-
Ácido málico	MLT	-	+	-	-
Citrato de trisódio	CIT	-	-	-	-
Ácido fenilacético	PAC	+	+	-	-

**Nota:** +, indica sinal positivo de utilização do substrato; -, indica sinal negativo de utilização do substrato.

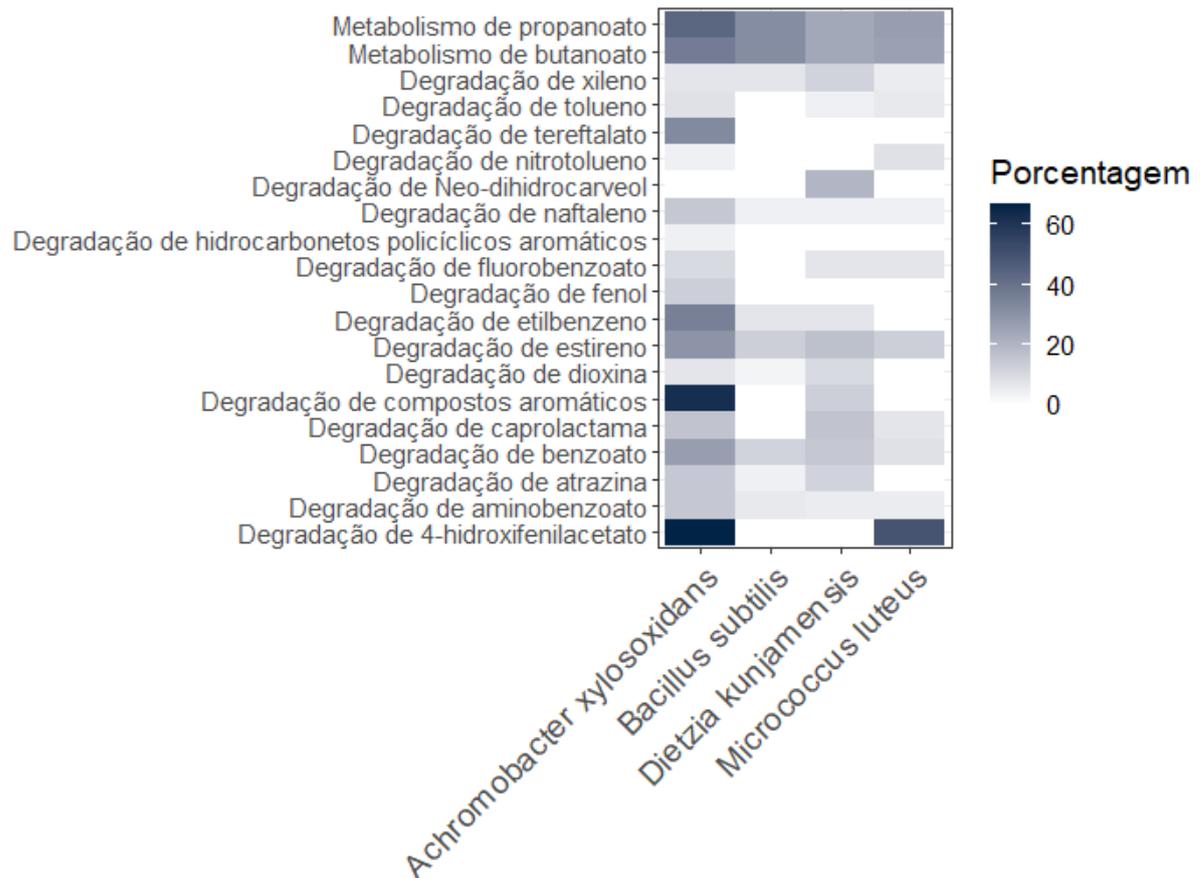
#### 4.4.2. Montagem dos genomas e análise das vias de degradação de hidrocarbonetos

A estatística das montagens dos genomas das quatro linhagens usando o programa SPAdes é mostrada na **Tabela 4.4**.

**Tabela 4.4:** Montagem dos genomas das quatro linhagens bacterianas gerada pelo programa SPAdes.

Dados sequência	<i>Micrococcus luteus</i> CBMAI 636	<i>Dietzia kunjamensis</i> CBMAI 705	<i>Bacillus subtilis</i> CBMAI 707	<i>Achromobacter xylooxidans</i> CBMAI 709
<b>Cobertura (X)</b>	124,35	57,81	74,2	58,75
<b># Contigs</b>	114	156	140	77
<b>Sequências totais</b>	2.139.571	3.740.130	4.117.038	6.368.797
<b>Maior contig</b>	222.405	199.084	272.795	644.671
<b>Menor contig</b>	131	204	240	212
<b>N50</b>	40.958	50.643	102.289	192.647
<b>% CG</b>	73	70,2	43,3	68
<b>% Completude</b>	98,64	99,41	99,59	99,53
<b>% Contaminação</b>	1,38	0,49	1,30	1,04

Os genes preditos serviram de base para a realização da anotação funcional dos genes com capacidade de degradação de hidrocarbonetos do petróleo, usando a base de dados do KEGG. Os genes específicos envolvidos nas vias de degradação de hidrocarbonetos das quatro linhagens bacterianas foram identificados e mapeados (**Anexos 9.5 – 9.16**). Se encontraram genes de degradação dos hidrocarbonetos cloroalcano / alceno, clorociclohexano e clorobenzeno, benzoato, aminobenzoato, fluorobenzoato, tolueno, caprolactama, geraniol, naftaleno, estireno, atrazina, dioxina, xileno, etilbenzeno, policarbonato, hidrocarbonetos alifáticos e hidrocarbonetos aromáticos. A anotação do genoma das linhagens demonstrou o grande potencial destas para a degradação de compostos alifáticos e aromáticos diferentes, tendo um alto envolvimento metabólico. Estas linhagens têm uma participação ampla e diversa (**Figura 4.10**).

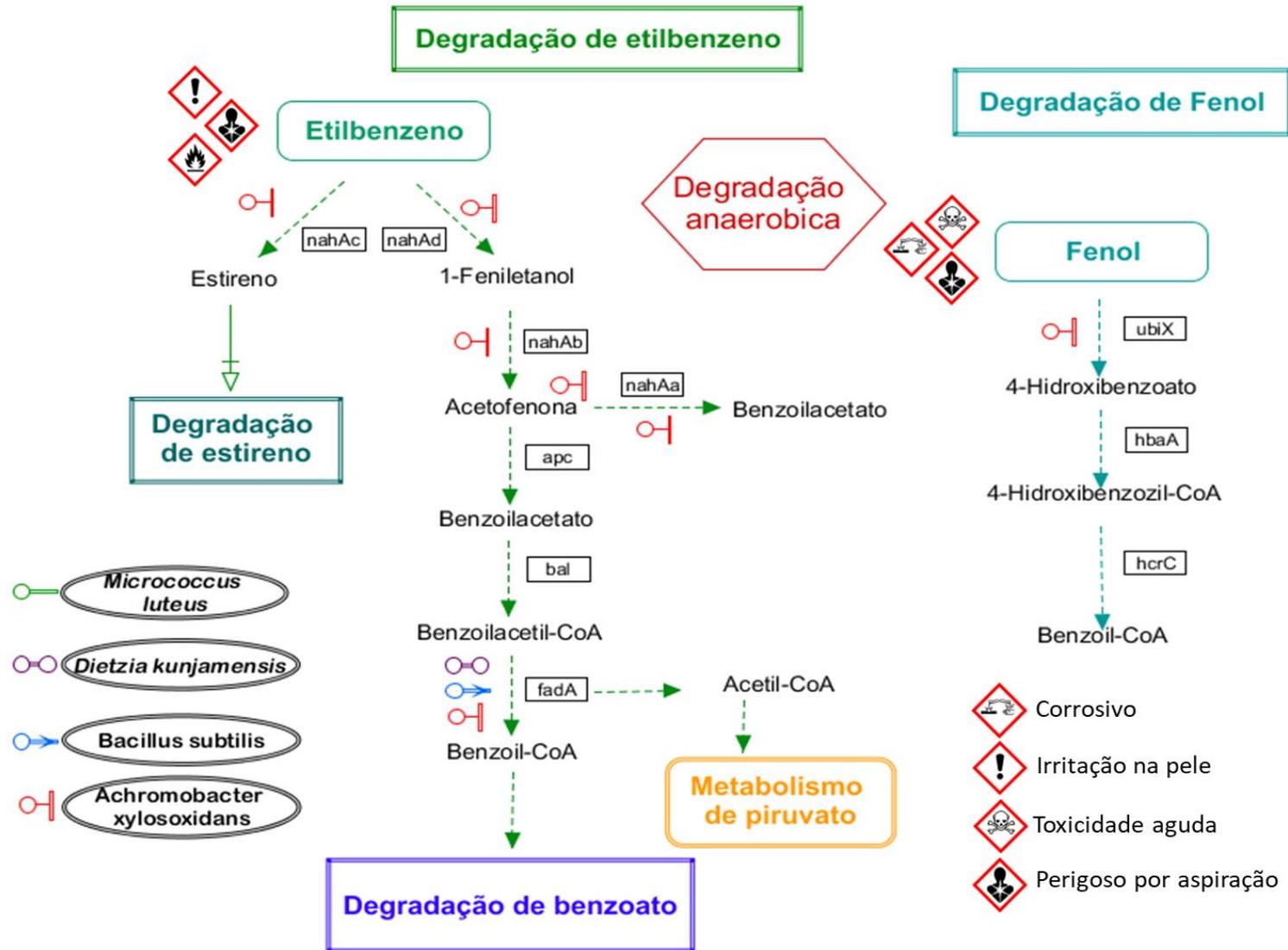


**Figura 4.10:** Heatmap ilustrando a participação das quatro linhagens bacterianas nas vias metabólicas de degradação de alifáticos e aromáticos (valores em porcentagem).

As quatro linhagens juntas possuem um enorme potencial catabólico, sendo possível utilizá-las, por exemplo, na degradação do estireno e benzoato por terem uma alta participação de genes nestas vias (**Figuras 4.11 e 4.12**). Em adição, possuem genes que participam na degradação aeróbia e genes que, em condições anaeróbicas, atuam na degradação de etilbenzeno, fenol e benzoato (**Figuras 4.11 e 4.13**), demonstrando grande versatilidade metabólica. Ensaio prévios de biodegradação já haviam demonstrado a capacidade destas linhagens para a degradação de hidrocarbonetos do petróleo (Dellagnezze, Bruna Martins et al., 2014). As bactérias *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 e *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 mostraram possuir mais de 50% de participação nas vias de degradação de compostos alifáticos e aromáticos da base de dados do KEGG, sendo alguns destes compostos de alto risco para a saúde do homem e do ambiente. São linhagens muito promissoras para ensaios futuros de degradação *in vitro* utilizando vários compostos.







**Figura 4.13:** Vias de degradação do etilbenzeno junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.

### 4.4.3. Genômica comparativa

#### 4.4.3.1. Comparação dos genes degradadores de hidrocarbonetos do petróleo

A anotação funcional e comparação das linhagens *Dietzia kunjamenis* CBMAI 705 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 revelou que estas compartilham 39 genes que participam em 16 vias de degradação de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos nestas linhagens (**Anexos 9.29**). Com o intuito de investigar o grau de proximidade evolutiva ou divergência destes genes com aqueles de organismos relacionados, foi feita a filtragem dos genes considerando aqueles que tinham participação em vias de degradação diferentes, genes que estavam envolvidos em apenas uma via de degradação e que estivessem presentes na anotação funcional das linhagens *Dietzia kunjamenis* CBMAI 705 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 foram escolhidos para esta análise, **Tabela 4.5**.

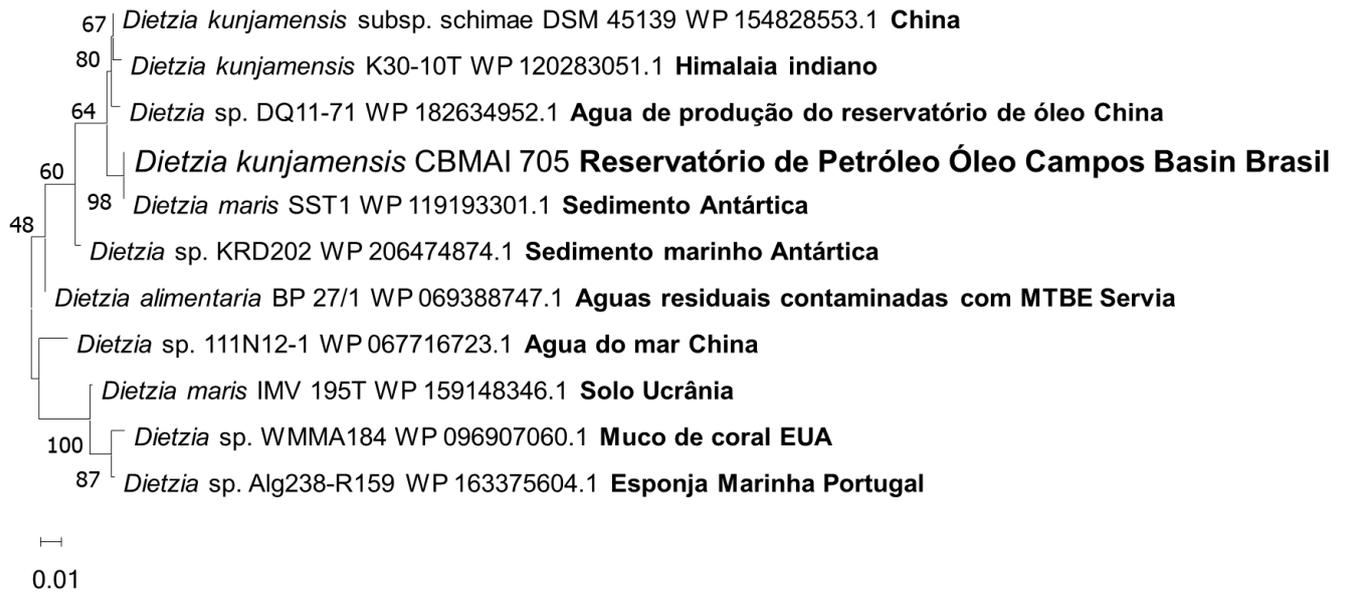
**Tabela 4.5:** Genes selecionados levando em consideração vias de degradação distintas e sua presença em organismos proximalmente relacionados.

Gene	ID	Nome KEGG	VIA METABÓLICA
K00529	<i>hcaD</i>	Componente 3-fenilpropionato / trans-cinamato dioxigenase ferredoxina redutase [EC: 1.18.1.3]	Degradação de compostos aromáticos
K01908	<i>ACSS3, prpE</i>	Propionil-CoA sintetase [EC: 6.2.1.17]	Metabolismo do propanoato
K18118	<i>aarC, cat1</i>	Succinil-CoA: acetato CoA-transferase [EC: 2.8.3.18]	Metabolismo de butanoato
K01512	<i>acyP</i>	Acilfosfatase [EC: 3.6.1.7]	Degradação de aminobenzoato
K00128	ALDH	Aldeído desidrogenase (NAD <sup>+</sup> ) [EC: 1.2.1.3]	Degradação de cloroalcano e cloroalceno
K01941	E6.3.4.6	Uréia carboxilase [EC: 6.3.4.6]	Degradação de atrazina
K06446	DCAA	Acil-CoA desidrogenase [EC: 1.3.99.-]	Degradação de caprolactama

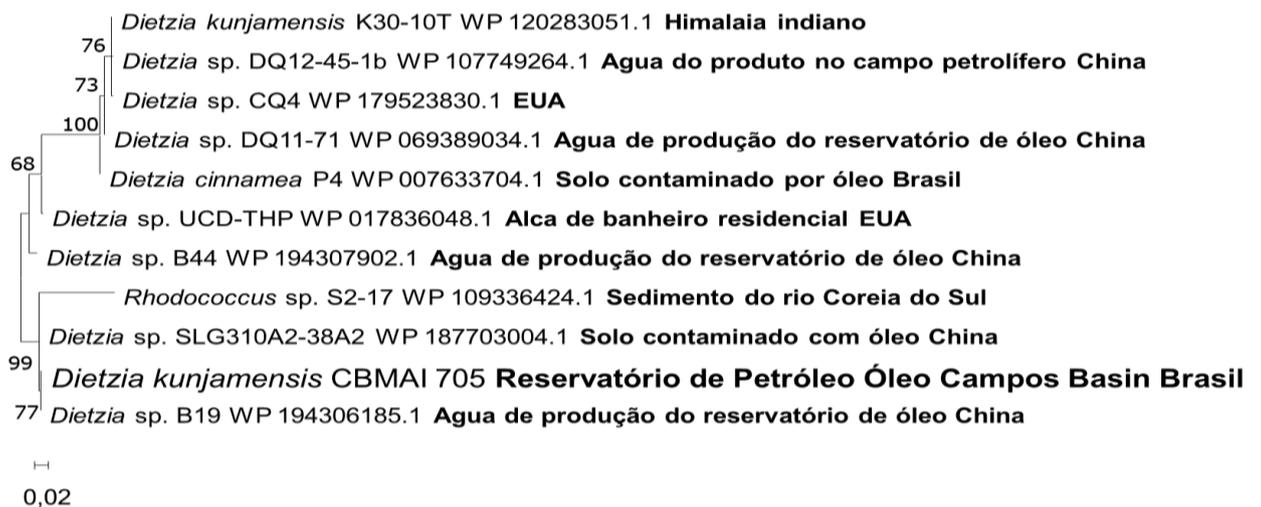
Para a análise da história evolutiva dos genes das linhagens *Dietzia kunjamenis* CBMAI 705 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 foi feita a seleção das sequências gênicas das linhagens mais proximalmente relacionadas (**Anexos 9.30**). A comparação das sequências para cada uma das duas linhagens foi feita em separado, resultando na seleção de dez sequências para serem comparadas com *Dietzia kunjamenis* CBMAI 705 e dez sequências para serem

comparadas com *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709. Os resultados da análise evolutiva destes genes de degradação estão apresentados nos **Anexos 9.17-9.28**.

A análise de distância evolutiva feita com os genes da **Tabela 4.5** mostrou que o gene K18118 succinato CoA transferase de *Dietzia kunjamenis* CBMAI 705 e o gene homólogo de *Dietzia maris* SST1, isolado de sedimento marino, formaram um grupo monofilético (**Figura 4.14**). Entanto, o gene K00529 Componente 3-fenilpropionato / trans-cinamato dioxigenase ferredoxina redutase de *Dietzia kunjamenis* CBMAI 705 se agrupou com o gene homólogo de *Dietzia* sp. B19, isolado de água de produção de reservatório de óleo China (**Figura 4.15**). Por fim, o gene K01941 ureia carboxilase formou um *cluster* com o gene de *Dietzia maris* IMV 195<sup>T</sup>, isolada de solo na Ucrânia, suportado por um valor de *bootstrap* 100 (**Figura 4.16**). Os demais genes incluídos na análise (gene K01908 Propionil-CoA sintetase, K01512 Acilfosfatase, K00128 Aldeído desidrogenase (NAD +), K06446 Acil-CoA desidrogenase, **Anexos 9.17-9.28**, apresentaram uma grande diversidade de lugares de isolamento, sugerindo que não existe um padrão de distribuição geográfico para os genes estudados e que não houve divergência evolutiva entre os mesmos em função de habitats e/ou substratos distintos. De acordo com a literatura, várias cepas identificadas como representantes de espécies do gênero *Dietzia* são potenciais patógenos humanos (Gharibzahedi et al., 2013), assim como apresentam aplicações na indústria (Alonso-Gutiérrez et al., 2011; Sacco et al., 2017; Yamamura et al., 2010). Dentre estas, algumas linhagens mostraram potencial para degradação de hidrocarbonetos do petróleo, as quais foram isoladas de diversos ambientes.



**Figura 4.14:** Análise filogenética do gene K18118 succinato Co-A transferase, obtido a partir do genoma de *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo WAG com distribuição Gama. Valores de *bootstrap* (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.

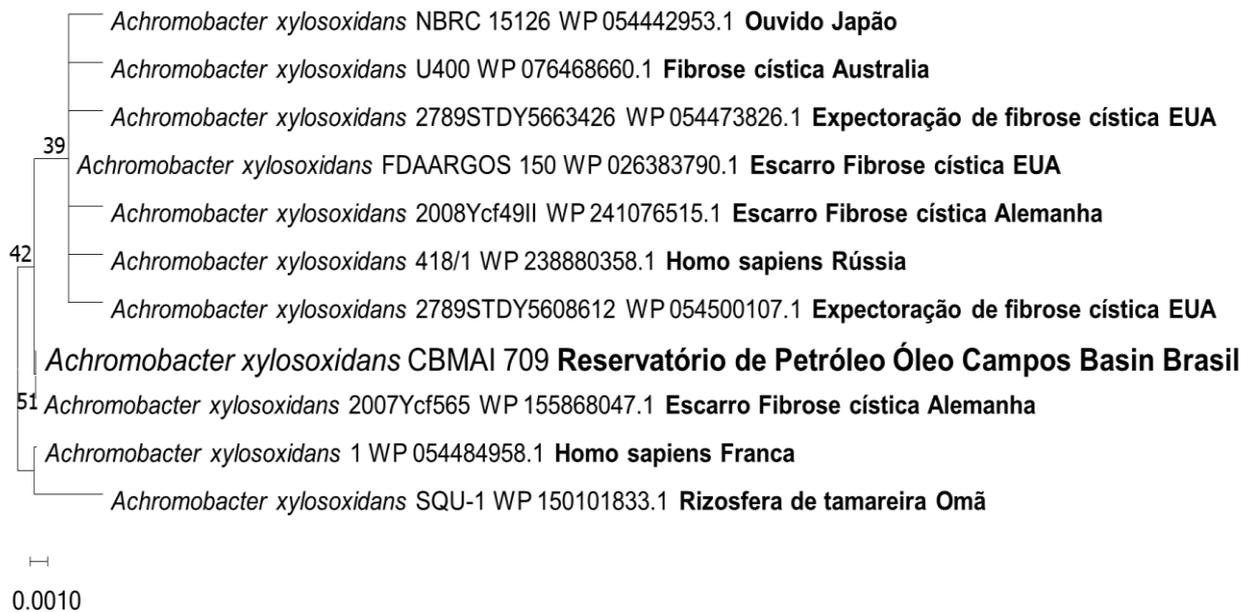


**Figura 4.15:** Análise filogenética do gene K00529 oxidoreductase dependente de FAD, obtido a partir do genoma de *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705, utilizando o método de reconstrução filogenética de máxima verossimilhança e o modelo evolutivo de *Jones-Taylor-Thornton* com distribuição Gama. Valores de *bootstrap* (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.



**Figura 4.16:** Análise filogenética do gene K01941 ureia carboxilase, obtido a partir do genoma de *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo *Jones-Taylor-Thornton* com distribuição Gama. Valores de *bootstrap* (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.

Com relação à linhagem *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709, a análise de distância evolutiva revelou que os genes se agruparam em diferentes clusters com genes de *Achromobacter xylosoxidans* obtidos de locais completamente diferentes (**Figura 4.17 e Anexos 9.17-9.28**) *Achromobacter xylosoxidans* é geralmente isolado de amostras clínicas de humanos, também de hospitais, amostras ambientais domésticas, plantas, rizosfera e solo (Amoureux et al., 2013; Mohamadpoor et al., 2022; Trancassini et al., 2014).



**Figura 4.17:** Análise filogenética evolutiva do gene K18118 proteína da família da hidrolase transferase da Acetil-CoA, obtido a partir do genoma de *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo *General Reversible Chloroplast* com distribuição Gama. Valores de *bootstrap* (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.

A análise de filogenia das linhagens CBMAI 705 e CBMAI 709 mostrou que estas são de famílias diferentes (Dietziaceae e Alcaligenaceae). *Achromobacter xylosoxidans* possui a capacidade de obter genes de resistência e adaptação através da transferência horizontal de genes (Pongchaikul et al., 2020; Traglia et al., 2012). Embora as duas linhagens tenham a mesma origem de isolamento (reservatório de petróleo da Bacia de Campos; **Tabela 4.1**) e capacidade de transferência gênica, os resultados observados sugerem que não houve evento de transferência horizontal desses genes entre as linhagens em estudo.

Apesar de *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 terem sido isoladas de um ambiente extremo, pode-se sugerir que os genes relacionados à degradação de hidrocarbonetos em estudo não apresentaram divergência evolutiva em função das pressões seletivas impostas pelo ambiente. Estes resultados indicam uma evolução adaptativa comum entre cada uma dessas famílias e que não há homologia ortóloga xenóloga dada por transferência horizontal de genes entre *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709.

#### 4.4.3.2. Análise dos grupos ortólogos

A linhagem *Achromobacter xylosoxidans* foi a que apresentou maior participação nas vias de degradação, sendo identificada e usada para a análise de grupos ortólogos com intuito de identificar as adaptações evolutivas resultantes das pressões seletivas inerentes ao ambiente de isolamento de bactérias da mesma família. Neste estudo, a escolha dos genomas de referência para comparação com o genoma de *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 foi baseada no valor do Score (similaridade entre os genomas) e no local de isolamento das bactérias (locais distintos de reservatórios de petróleo; **Tabela 4.6**). A comparação, feita com o programa Orthofinder, revelou que os grupos ortólogos encontrados pertencem a diversas vias do metabolismo primário e secundário (**Tabela 4.7**). Foi observada a existência de três genes únicos que não são compartilhados pelas demais bactérias (estão presentes apenas em *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709), os quais participam, interagem e auxiliam no processo de captura, introdução e/ou degradação de compostos de hidrocarbonetos do petróleo. Estes grupos ortólogos estão identificados como **OG0000837**, **OG0002508**, **OG0002590**.

**Tabela 4.6:** Bactérias de referência recuperadas da base de dados GTDB usadas para a análise de grupos ortólogos (GO).

NÚMERO DE ACESSO		MICRORGANISMO	FONTE DE ISOLAMENTO	
GTDB	GenBank			
RS_GCF_001676705.1	GCA_001676705.1	<i>Bordetella bronchialis</i> AU3182 <sup>T</sup>	Fibrose Cística: garganta	USA
RS_GCF_000209655.1	GCA_000209655.1	<i>Pusillimonas</i> sp. T7-7	Lama de local contaminado com petróleo no Mar de Bohai	China
RS_GCF_000429385.1	GCA_000429385.1	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>phenolicus</i> DSM 16503 <sup>T</sup>	Bioprocessador de águas residuais	USA
RS_GCF_001433395.1	GCA_001433395.1	<i>Bordetella</i> sp. N	Solo	China: Nanjing
RS_GCF_000382185.1	GCA_000382185.1	<i>Bordetella</i> sp. FB-8	Sedimento	Alemanha

**Tabela 4.7:** Grupos ortólogos encontrados na análise de comparação genômica com cinco genomas de referência da base de dados GTDB.

Ortogrupo ID	<i>A. xylosoxidans</i> CBMAI 709 <sup>a</sup>	Descrição da proteína <sup>b</sup>
OG0000837	6	Sistema de dois componentes, família OmpR, sensor quinase ParS [EC: 2.7.13.3] /Histidina quinase
OG0002492	4	Hemoglobina / transferrina / proteína receptora de lactoferrina
OG0002508	4	Transportador MFS, transdutor de sinal putativo /Major Facilitator Superfamily
OG0002590	4	Proteína de quimiotaxia aceitadora de metil
OG0003148	3	Proteína hipotética
OG0003159	3	Hidrolisa cAMP em 5'-AMP. Desempenha um papel regulador importante na modulação da concentração intracelular de cAMP, influenciando assim os processos dependentes de cAMP
OG0003195	3	Serina aminopeptidase, S33
OG0003293	3	COG1020 Módulos de peptídeo sintetase não ribossomal e proteínas relacionadas
OG0003384	3	Proteína transmembrana de ferro-enxofre 4fe-4s ferredoxina
OG0003543	3	Citocromo c oxidase
OG0003555	3	Proteína hipotética
OG0003564	3	Dolicil-fosfato-manose-manosiltransferase
OG0003576	3	Proteína hipotética

<sup>a</sup> Refere-se ao número de contigs que mostram a ortologia única com os cinco genomas de referência.

<sup>b</sup> Descrição da proteína dada pela anotação com o uso dos programas Kofam KOALA - KEGG Orthology Search e EGGNOG-MAPPER.

O grupo ortólogo OG0000837 é um sensor de proteína quinase que sugere que *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 tem a capacidade de detectar hidrocarbonetos no meio ambiente e responder à exposição por meio da expressão de genes envolvidos na degradação de hidrocarbonetos para crescimento e geração de energia ou em mecanismos de defesa contra a toxicidade desses compostos (Joye et al., 2018). Esses mecanismos de detecção envolvem sistemas de dois componentes e vias de sinalização quimiossensorial (Ahmad et al., 2020; Wick et al., 2018), o que ajuda na captura e biodegradação de hidrocarbonetos.

O grupo ortólogo OG0002508 é uma superfamília de transportadores dos principais facilitadores MFS (transdutor de sinal putativo), os quais tem atividade transportadora transmembrana (D. Das et al., 2015; Schneiker et al., 2006b).

O grupo ortólogo OG0002590 é uma proteína de quimiotaxia que aceita metil. A quimiotaxia permite as células bacterianas se moverem seguindo um gradiente de concentração

(Ni et al., 2020). As linhagens podem se adaptar ao ambiente químico detectando mudanças nas concentrações de certos compostos e mudando seus padrões de movimento essencialmente em função do gradiente químico presente (Meng et al., 2019). A quimiotaxia pode aumentar a taxa de degradação microbiana de compostos hidrofóbicos, como alguns hidrocarbonetos (LIANG et al., 2021)

Portanto, a análise genômica de *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 sugere que esta linhagem pode se adaptar a ambientes contaminados com hidrocarbonetos do petróleo. A ocorrência coerente de genes associados a quimiotaxia, termossensibilidade e absorção e desintoxicação de nutrientes suportam a hipótese de que *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 tem um papel relevante na degradação de hidrocarbonetos no ambiente do qual foi isolado.

#### 4.5. CONCLUSÕES

- A linhagem *Micrococcus* sp. CBMAI 636 é classificada taxonomicamente como *Micrococcus luteus* CBMAI 636.
- As linhagens *Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705, *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 mostraram possuir um potencial metabólico amplo, o qual poderá no futuro ser usado na estruturação de consórcios para o uso biotecnológico em processos de biorremediação de compostos de hidrocarbonetos do petróleo.
- *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 mostraram que, apesar de terem sido isoladas do mesmo ambiente e apresentarem participação nas mesmas vias de degradação, suas sequências são diferentes e únicas.
- Os genes envolvidos na degradação de hidrocarbonetos foram agrupados em *clusters* com seus homólogos indistintamente do local de isolamento das bactérias que os carregavam, portanto, estes genes possuem capacidade adaptativa a ambientes extremos, mostrando evidência de convergência evolutiva.
- Os genes encontrados para as linhagens *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 oferecem capacidade adaptativa a ambientes extremos. Portanto, estas linhagens poderiam apresentar maior adaptabilidade, ao contrário de linhagens degradadoras, porém isoladas de ambientes diferentes.

## 5. CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO

Os hidrocarbonetos são compostos amplamente utilizados em diversos setores da sociedade moderna, como geração de energia, fabricação de fármacos, cosméticos, plásticos, lubrificantes, entre outros. Entretanto, a alta demanda por esses compostos gerou graves problemas de saúde e ambientais nas últimas décadas decorrentes de frequentes vazamentos, derramamentos e descartes inapropriados. Uma solução para mitigar os efeitos poluentes dos hidrocarbonetos do petróleo é o uso de técnicas de biorremediação, que prevê o uso de microrganismos capazes de tolerar e degradar estes compostos, promovendo sua transformação em produtos menos tóxicos ou inertes. Pesquisas mais recentes têm demonstrado que o emprego de consórcios de microrganismos distintos permite aumentar a eficiência da biorremediação através das interações sintróficas entre os membros do consórcio, resultando na mineralização dos compostos poluentes. Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a degradação de hidrocarbonetos do petróleo do consórcio das linhagens *Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705, *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709, cujo potencial genético foi demonstrado no capítulo anterior por meio da genômica funcional. Para isso, foram realizados ensaios *in vitro* para cultivo dos microrganismos, sob a forma de consórcio, na presença dos hidrocarbonetos cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).

### 5.1. INTRODUÇÃO

O petróleo tem em sua composição uma mistura complexa de compostos como hidrocarbonetos alifáticos, alicíclicos e aromáticos, e uma variedade de compostos aromáticos polares, polímeros de alto peso molecular, além de compostos como nitrogênio, oxigênio, enxofre e vestígios de metais (Varjani et al., 2015; Wu et al., 2019). Os hidrocarbonetos do petróleo ocorrem naturalmente em depósitos no subsolo, em rochas sedimentares abaixo da superfície da terra, na forma de gases (gás natural), semi-sólidos (betume), sólidos (cera ou asphaltita) e líquidos (Ossai et al., 2020).

Hoje, a indústria petrolífera atende grande parte das demandas globais de energia, bem como supre o mercado com uma ampla variedade de produtos essenciais à sociedade moderna, como polímeros, plásticos, produtos farmacêuticos, corantes, solventes, detergentes, entre outros (Varjani & Upasani, 2017). Os combustíveis fósseis contribuem, portanto, como a

principal fonte de energia para as indústrias e a vida cotidiana em todo o mundo. Produtos de petróleo, como gasolina, diesel ou lubrificantes, são ainda usados em volumes maiores em comparação com outros produtos químicos de apelo ecológico (Logeshwaran et al., 2018). Os hidrocarbonetos do petróleo são um dos poluentes orgânicos persistentes no ambiente, geralmente são tóxicos e letais, dependendo da natureza química, composição e propriedades das frações do composto, assim como do modo, nível e tempo de exposição (Abdulazeez et al., 2017). Muitos hidrocarbonetos do petróleo são recalcitrantes e altamente tóxicos devido à presença de componentes hemotóxicos, carcinogênicos e teratogênicos, como BTEX (benzeno; tolueno; etilbenzeno; I-, m- e p-xilenos) e HAP (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) (Meckenstock et al., 2016; Souza et al., 2014). Atividades antropogênicas, como vazamentos de tanques e derramamentos acidentais, descartes inadequados de efluentes, explosões em tubulações, sabotagem ou guerras, e naturais, como infiltrações de petróleo – *petroleum seeps*, resultam na liberação de poluentes na superfície do solo, nas águas subterrâneas e nos oceanos (Meckenstock et al., 2016; Ossai et al., 2020; Varjani, 2017).

A biorremediação é definida como a redução, degradação, desintoxicação, transformação ou mineralização de poluentes através de mecanismos biológicos (Olawoyin, 2016); consiste em acelerar o processo de limpeza natural, usando o potencial metabólico de organismos, como plantas, bactérias ou fungos, para degradar e transformar os poluentes em compostos minerais ou menos tóxicos (Agrawal et al., 2018; Martinko; & Clark, 2009). Técnicas de biorremediação têm sido aplicadas para a descontaminação de solos superficiais e subterrâneos, além de sistemas de água doce e marinhos, e águas subterrâneas (Panagiotakis & Dermatas, 2015).

Os microrganismos desempenham um papel crucial na manutenção e desenvolvimento de ecossistemas; eles são usados para mitigar e restaurar ecossistemas impactados por poluentes (biorremediação) através de seu metabolismo (Varjani, 2017), e apresentam múltiplas características de degradação e predileção para alguns contaminantes. As bactérias são amplamente encontradas e distribuídas no ambiente; são consideradas degradadores primários e agentes mais ativos para a degradação de contaminantes do petróleo (Abbasian et al., 2015; Meckenstock et al., 2016).

Em geral, as bactérias degradadoras nativas em condições normais (sem contaminação) estão presentes em níveis baixos ou indetectáveis. Por outro lado, quando ocorre a contaminação com hidrocarbonetos no ambiente, a comunidade microbiana sofre uma pressão seletiva e aqueles indivíduos capazes de transformar estes compostos e utilizá-los como fonte de energia são favorecidos e selecionados em detrimento do restante da comunidade, o que resulta no aumento de sua abundância relativa (Varjani, 2017). Neste sentido, o uso de

microrganismos isolados de ambientes associados a petróleo em processos de biorremediação pode representar uma vantagem, uma vez que estes organismos provavelmente foram selecionados de maneira a tolerar e/ou usar hidrocarbonetos do petróleo como fonte de carbono e energia.

Recentemente, consórcios microbianos, ou comunidades sintéticas, tem sido empregados para acelerar e/ou otimizar os processos de degradação, onde microrganismos com capacidades específicas e complementares são utilizados (Smith et al., 2013), resultando em interações sinérgicas que aumentam a eficiência de remoção dos poluentes (Xu et al., 2018)

Assim, este trabalho teve como objetivo estruturar um consórcio de bactérias, selecionadas com base em ensaios funcionais preliminares e análises *in silico* de seu potencial genético, e confirmar a sua capacidade de degradação de hidrocarbonetos do petróleo. Para isso, foi avaliada a dinâmica das populações do consórcio em ensaios *in vitro* e quantificação da degradação de três tipos de hidrocarbonetos (etilbenzeno, fenantreno e antraceno) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

## 5.2. OBJETIVOS

### 5.2.1. Objetivo Geral

Confirmação do potencial de degradação de hidrocarbonetos do petróleo das bactérias isoladas de ambientes da indústria do petróleo (*Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705, *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709) em ensaios *in vitro*.

### 5.2.2. Objetivos Específicos

- Triagem de capacidade de degradação e tolerância aos hidrocarbonetos do petróleo através dos testes colorimétricos DCPIP e MTT das linhagens *Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705, *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709.
- Confirmar e quantificar a degradação de hidrocarbonetos usando as linhagens selecionadas sob a forma de consorcio, através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.
- Avaliar a abundancia relativa dos membros do consorcio bacteriano usando sequenciamento e análise da região V3-V4 do transcrito do gene 16S rRNA durante a degradação dos hidrocarbonetos do petróleo.

### 5.3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 5.3.1. Seleção das linhagens e cultivo bacteriano

De acordo com as informações obtidas do **Capítulo I**, as linhagens *Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705, *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 mostraram um potencial e anotação genômica na participação de vias de degradação de hidrocarbonetos. Por tanto as linhagens foram selecionadas, as quais foram reativadas em placas de Petri usando o meio de cultivo Agar Triptona de Soja (TSA), seguido de incubação por 1-2 dias para *Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 e 5-7 dias para *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705, a 28°C. Após o crescimento e verificação da pureza das linhagens, estas foram inoculadas em Caldo Triptona de Soja (TSB) e incubados por 24 horas (linhagens CBMAI 636 e CBMAI 709) e 196 horas (CBMAI 705) a 28°C sob agitação a 150 rpm. Após o período de crescimento das linhagens em meio líquido, estas foram transferidas para tubos tipo Falcon esterilizados de 50 mL, os quais foram centrifugados a 8.000 rpm, por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em água destilada esterilizada, com o mesmo volume, repetindo duas vezes este passo. Posteriormente, a suspensão bacteriana foi quantificada por densidade ótica (DO) no espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm. A densidade de cada uma das linhagens foi ajustada a 0,5 para sua posterior inoculação em microplacas de 96 poços.

#### 5.3.2. Hidrocarbonetos utilizados

Foram avaliados 2 hidrocarbonetos do petróleo para observar a capacidade de tolerância e degradação das linhagens. Os hidrocarbonetos testados individualmente foram: etilbenzeno (C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>) (SIGMA-ALDRICH, 99%) e antraceno (C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>) (ALDRICH, 97%) em concentrações de 0,01; 0,05; 0,1 mg/mL Cada solução foi preparada com uma concentração inicial de 5mg/mL do hidrocarboneto. Os padrões foram preparados com o solvente N,N-Dimetilformamida (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO) (MERCK), que é considerado um solvente adequado para solubilizar os hidrocarbonetos e não é tóxico aos microrganismos (Gomes et al., 2018).

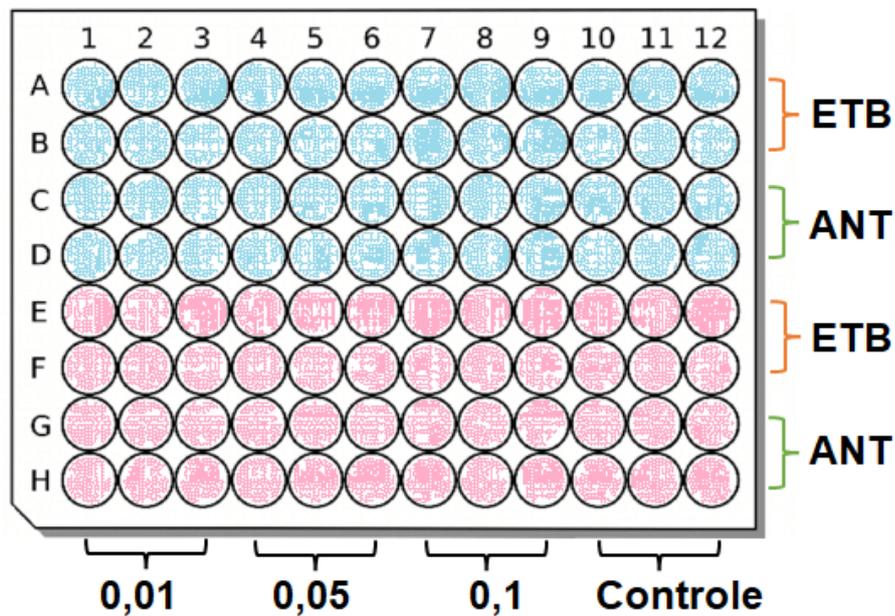
#### 5.3.3. Teste colorimétrico DCPIP e MTT

Com finalidade de avaliar a capacidade de utilização dos hidrocarbonetos como substratos e a viabilidade celular das linhagens, foram usados os testes qualitativos colorimétricos com os compostos brometo de 2, 6-diclorofenol indofenol (DCPIP) (Hanson et al., 1993), quando este esta oxidado é de cor azul (não degradado), ao ser reduzido totalmente torna-se incolor

(degradado) (Peixoto et al., 2018; Sharma et al., 2018) e 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) para avaliar a viabilidade celular (CHACON et al., 1997), o teste se baseia na redução do MTT (amarelo/negativo), formando cristais de formazan (púrpura/positivo); esta reação se deve principalmente pela ação da atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADPH (H. Wang et al., 2010).

### 5.3.3.1. Montagem de placas

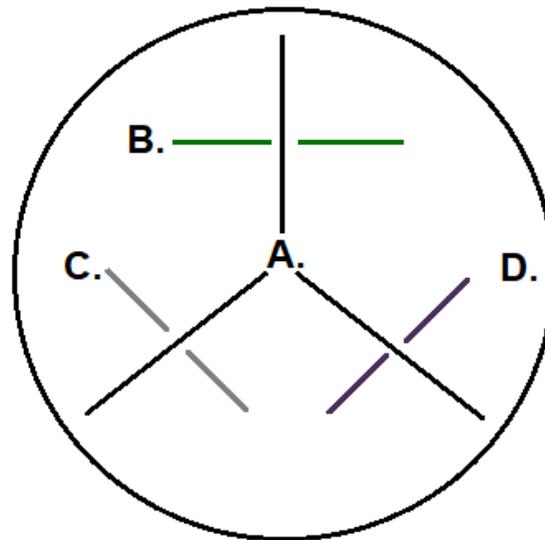
Os testes colorimétricos foram realizados em microplacas com cada uma das quatro linhagens individualmente, avaliando dois meios de cultivo, o Bushnell Hass (BH:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,0 g/L),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1,0 g/L),  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1,0 g/L),  $\text{MgSO}_4$  (7 $\text{H}_2\text{O}$ ) (0,2 g/L),  $\text{FeCl}_3$  (0,05 g/L),  $\text{CaCl}_2$  (2 $\text{H}_2\text{O}$ ) (0,02 g/L)) e o Bushnell Hass + EL (BH+EL:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,0 g/L),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1,0 g/L),  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1,0 g/L),  $\text{MgSO}_4$  (7 $\text{H}_2\text{O}$ ) (0,2 g/L),  $\text{FeCl}_3$  (0,05 g/L),  $\text{CaCl}_2$  (2 $\text{H}_2\text{O}$ ) (0,02 g/L), extrato de levedura (EL) 0,1%). Em cada um dos poços foram adicionados 89% do volume total do poço (134  $\mu\text{L}$ ) de meio de cultivo (BH ou BH+EL), 10% de inóculo celular (com D.O de 0,5, previamente descrito) (15  $\mu\text{L}$ ) e 1% de fonte de hidrocarboneto (Etilbenzeno e antraceno) (1,5  $\mu\text{L}$ ). As microplacas foram testadas com os dois corantes separadamente: **1. DCPIP:** 15  $\mu\text{L}$  (concentração final de 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foram adicionados em cada poço e, em seguida, a placa foi envolvida com papel alumínio e incubada por 7 dias a 28°C sob agitação constante a 150 rpm; **2. MTT:** 30  $\mu\text{L}$  foram adicionados em cada poço (concentração final de 1 mg/mL) após 7 dias de incubação a 28°C e 150 rpm, a placa foi então envolvida com papel alumínio durante duas horas a 28°C e 150 rpm. O esquema ilustrativo do ensaio é mostrado na **Figura 5.1**. As cores azuis indicam os poços com meio de cultivo com extrato de levedura (BH + EL), e as cores roxas indicam os poços nos quais foi adicionado meio sem extrato de levedura (BH). Concentrações avaliados: 0,01; 0,05 e 0,1 mg/mL.



**Figura 5.1:** Triagem preliminar para tolerância e degradação de hidrocarbonetos através dos testes de MTT e DCPIP, respectivamente, em microplacas de 96 poços.

#### 5.3.4. Teste de inibição cruzada

Com a finalidade de verificar a possibilidade de inibição cruzada entre as linhagens, através da produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, foi realizado o teste de compatibilidade entre as linhagens. Para isso, as linhagens foram cultivadas em meio TSB, lavadas duas vezes com água destilada esterilizada e a D.O. foi ajustada em 0,5 a 600 nm. A compatibilidade foi avaliada testando as cepas selecionadas em pares. Uma das linhagens foi inoculada em meio sólido TSA, conforme a **Figura 5.2**, e incubada até atingir a fase estacionária. A outra linhagem a ser testada foi inoculada perpendicularmente à primeira; este procedimento foi repetido com as mesmas duas linhagens invertendo a ordem de inoculação (Santiago et al., 2017). Para atingir a fase estacionária das linhagens *Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 estas foram crescidas por 48 horas a 28°C, enquanto a linhagem *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 foi crescida por 96 horas a 28°C.



**Figura 5.2:** Esquema de inoculação para teste de compatibilidade *in vitro*.

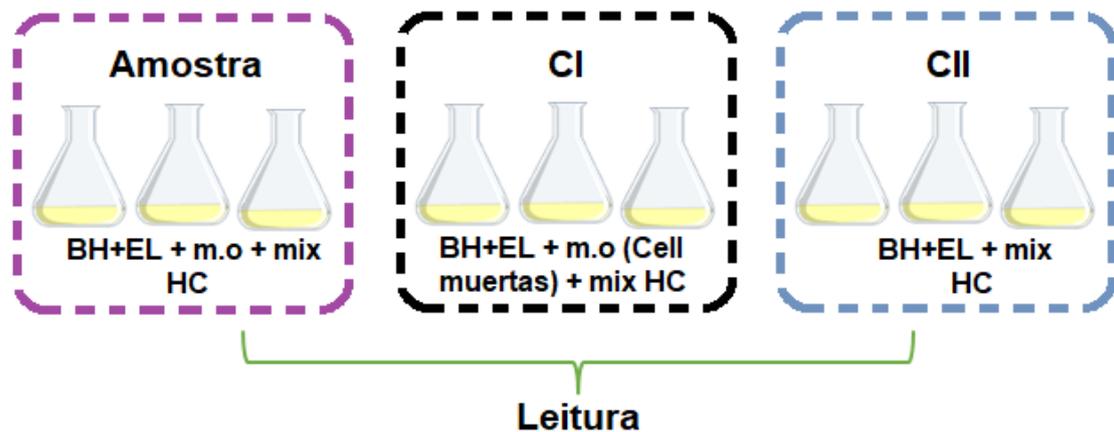
### 5.3.5. Biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo

A seleção das linhagens para o ensaio de biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo foi feita com base em resultados prévios de nosso grupo de pesquisa (Suzan Pantaroto de Vasconcellos et al., 2009b; Dellagnezze, Bruna Martins et al., 2014; Dellagnezze et al., 2016; S. P. Vasconcellos et al., 2011), na anotação dos genes e vias de degradação usando a base de dados de KEGG (capítulo anterior) e nos resultados da triagem qualitativa com os ensaios colorimétricos usando DCPIP e MTT e do teste de inibição cruzada das linhagens. Três linhagens identificadas como potenciais degradadoras de hidrocarbonetos foram escolhidas para estes ensaios, *Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709.

#### 5.3.5.1. Montagem do ensaio de biodegradação

O ensaio de biodegradação foi implementado de acordo os protocolos adotados pelo nosso grupo de pesquisa (Dellagnezze, Bruna Martins et al., 2014), com algumas modificações. No ensaio foram utilizadas as mesmas proporções de meio de cultura BH+EL (89%), inóculo de células (10%) com  $D.O_{600} = 0,5$  e fonte de hidrocarbonetos (1%) (Mix: etilbenzeno, antraceno e fenantreno (ALDRICH, 98%), em uma concentração final de 0,5 mg/mL). Para o ensaio foram utilizados frascos Erlenmeyer de 120 mL, aos quais foram adicionados um volume de 40 mL de meio Bushnell Haas suplementado com 0,1% de extrato de levedura preparado com água esterilizada, 4,5 mL do consórcio bacteriano com D.O. 0,5, e 450  $\mu$ L do mix de hidrocarbonetos. Foram feitos dois controles negativos: **CI.** com células mortas para avaliar a adsorção dos

compostos às células; e **CII**. sem inóculo celular (abiótico) para avaliar a perda do hidrocarboneto por volatilização, **Figura 5.3**. Os tratamentos foram realizados em triplicata, incubados a 28°C e 150 rpm por 45 dias, com leituras nos tempos T0, T8, T15, T25, T35, T45 dias. No total foram utilizados 54 frascos Erlenmeyer com volume final de 45 mL, sendo os frascos sacrificados em cada leitura. Antes de sacrificar o frasco, foram retiradas alíquotas de 6 mL do cultivo para extração do RNA, 1 mL para avaliação espectrofotométrica e 100 µL para diluições e plaqueamento em meio TSA.



**Figura 5.3:** Esquema da montagem do ensaio de degradação de hidrocarbonetos com os tratamentos para cada uma das leituras.

### 5.3.5.2. Dinâmica metabólica do consórcio

#### 5.3.5.2.1. Extração do RNA

Para a extração do RNA foram coletadas alíquotas de 2 mL de cada réplica do experimento. O RNA foi extraído usando o Kit RNeasy PowerMicrobiome (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante, com algumas modificações. Brevemente, a amostra foi centrifugada a 13.000 rpm a 4°C por 10 min a fim de concentrar as células, em seguida o precipitado foi transferido para microtubos com as pérolas (*beads*) proveniente do kit. Todos os microtubos foram mantidos em gelo para evitar a degradação do material genético. Em seguida, as soluções foram tratadas com DNase usando o Kit DNase Max (QIAGEN) para remoção do DNA contaminante e, em seguida, armazenadas a -20°C. A quantificação do RNA obtido foi feita com o equipamento Qubit® (Fluorometer 3.0, LifeTechnologies) usando o kit específico para RNA (Qubit® RNA HS Assay Kit). A qualidade e integridade do RNA foram avaliadas usando

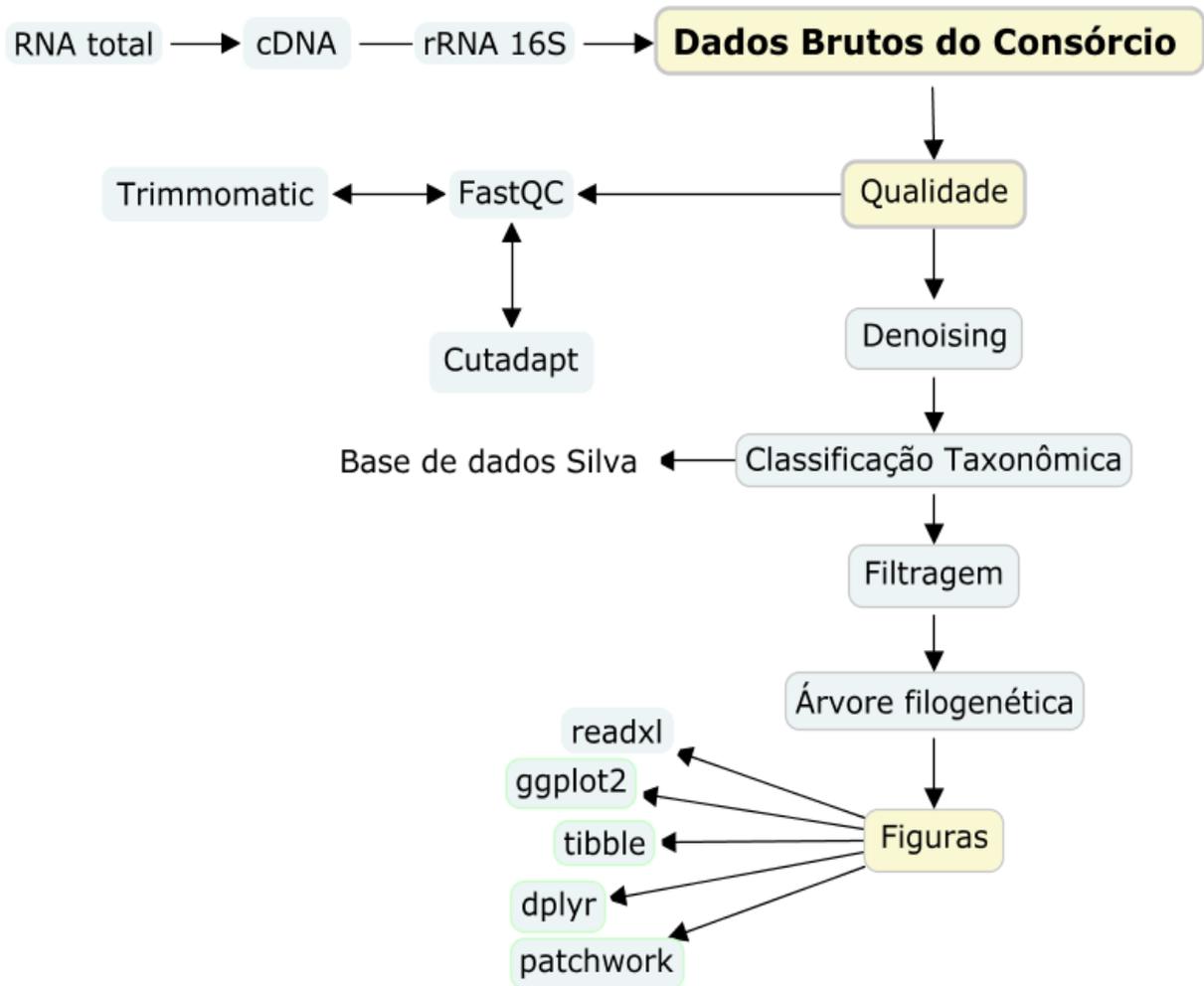
NanoDrop e eletroforese em gel de agarose modificado 1,2% (90% de tampão TBE + 10% de Formaldeído (Synth)), respectivamente.

#### 5.3.5.2.2. Síntese do cDNA e PCR do gene RNAr 16S

As amostras de RNA foram tratadas com o kit RT-PCR System for First-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen™ ThermoScript™), com a finalidade de sintetizar a fita de DNA a partir do RNA simples fita e, na sequência, amplificar parte do gene RNAr 16S. Os *primers* específicos usados na PCR foram homólogos às sequências flanqueadoras da região V3-V4 do RNAr 16S (*Forward*: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' e *Reverse*: 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3' (Klindworth et al., 2013)). A quantificação dos produtos de PCR foi feita por fluorometria usando Qubit®. Os amplicons do gene RNAr 16S obtidos foram enviados para a empresa NGS Soluções Genômicas (Piracicaba) para sequenciamento em larga escala com uma cobertura de 20.000 sequências paired-end por amostra.

#### 5.3.5.2.3. Análise dos dados de sequenciamento

As sequências de amplicons do gene RNAr 16s obtidas foram submetidas no programa FASTQC (versão 0.11.9) para avaliação da qualidade das (Andrews, 2010); em seguida foi realizada a remoção dos *primers* usando a ferramenta Cutadapt (versão 3.5) (Martin, 2011) e a trimagem das sequências com Trimmomatic (versão 0.39) para remoção das bases de baixa qualidade (Bolger et al., 2014). Com o software QIIME2 (versão 2021.4) (Bolyen et al., 2019), sequências foram analisadas com o pacote DADA2 (Callahan et al., 2016) em conjunto com Qiime2, conforme detalhado na **Figura 5.4**. A classificação taxonômica das ASVs (*Amplicon Sequence Variants*) foi feita usando o banco de dados SILVA 138.1 (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-1381/>) (Quast et al., 2013), gerando uma tabela de taxonomia e a árvore filogenética. Os dados foram introduzidos no software RStudio (versão 2022.02.3) para gerar gráficos de abundância.

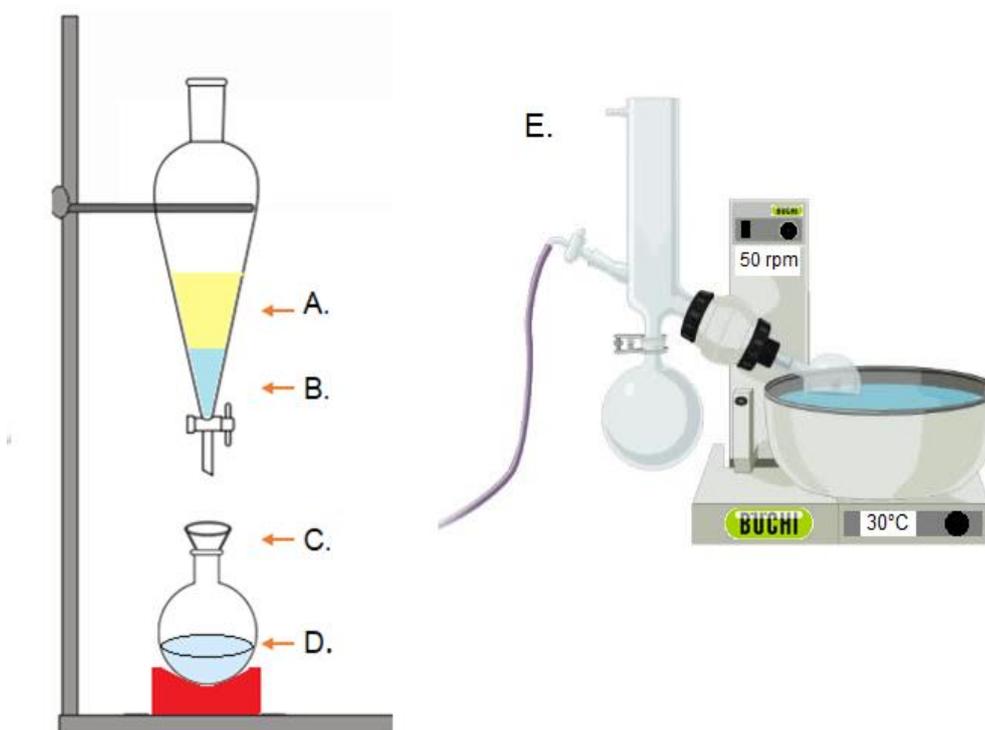


**Figura 5.4:** Pipeline utilizado para a análise das seqüências do RNAr 16S do consórcio microbiano.

### 5.3.5.3. Análise CG-EM dá biodegradação de hidrocarbonetos

As amostras e os controles negativos CI e CII com as respectivas triplicatas de cada leitura foram levadas para extração química usando o solvente orgânico Diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) (Synth), fim de separar as células bacterianas do mix de hidrocarbonetos (etilbenzeno, fenantreno e antraceno). Um volume de 40 mL de diclorometano foi adicionado dentro de um funil junto com o volume de cada réplica, e a mistura foi agitada vigorosamente (este passo foi feito duas vezes). A fase orgânica foi coletada em um balão de fundo redondo de 100 mL que possuía um funil analítico com camada de algodão e sulfato de sódio (isso para evitar a passagem da fase aquosa). Uma vez obtida a fração orgânica, a amostra foi concentrada a vácuo, 30°C e 50 rpm, usando um rota-evaporador (Rotavapor R-215 Buchi), até obter aproximadamente 1 mL de volume (**Figura 5.5**). A suspensão foi transferida para um frasco

(vial) de cromatografia, adicionada de 1 mL de diclorometano e armazenada a 4°C até o momento da análise. Todos os extratos foram injetados no cromatógrafo a gás Agilent, modelo HP-6890 equipado com um detetor seletivo de massas Agilent, modelo HP-5975. As condições da corrida cromatográfica foram estabelecidas de acordo com os trabalhos de (Abu et al., 2018; Passarini et al., 2011). A quantificação dos hidrocarbonetos etilbenzeno, fenantreno e antraceno foi feita em colaboração com a Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica (DQOF/CPQBA) sob a supervisão do Dr. Adilson Sartoratto e se deu pela comparação das áreas dos picos com os respectivos padrões previamente quantificados.



**Figura 5.5:** Ilustração do processo de extração de hidrocarbonetos com solventes orgânicos. **A.** Fase aquosa. **B.** Fase orgânica. **C.** Camada de algodão com sulfato de sódio. **D.** Recuperação da fase aquosa. **E.** Secagem da amostra em rotaevaporador.

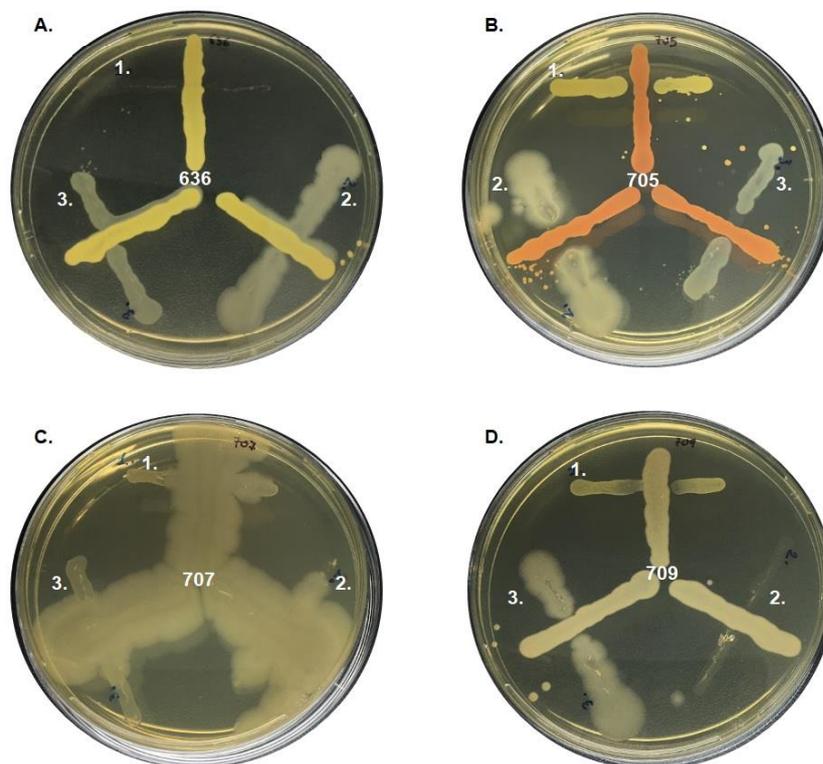
### 5.3.6. Análises estatísticas

Os dados obtidos da biodegradação dos hidrocarbonetos, abundância das sequências de RNAr 16S e contagens em placa (UFC/mL) foram processados no programa Excel (Microsoft Office Professional Plus 2016) para a obtenção da média e avaliação do desvio padrão.

## 5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.4.1. Estruturação do consórcio microbiano

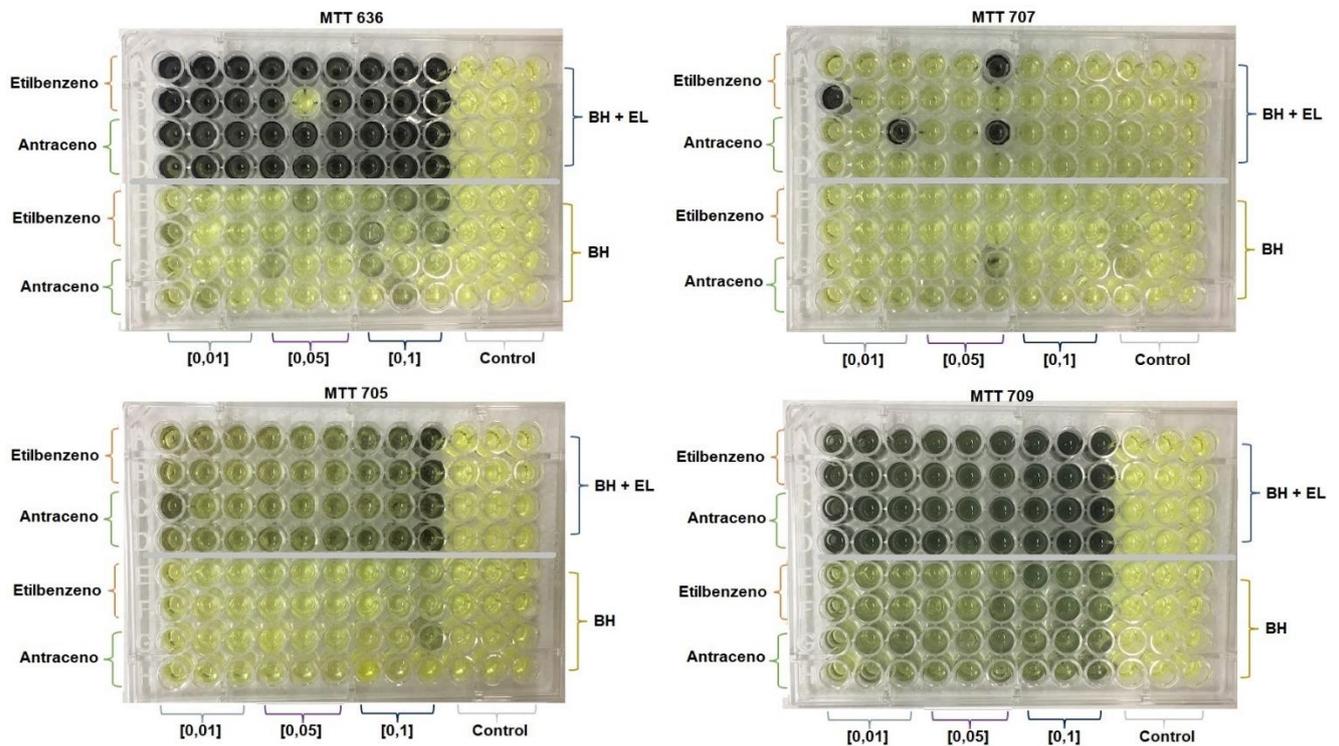
No teste de inibição cruzada entre as linhagens *Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705, *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709, se pode observar que a linhagem *Bacillus subtilis* CBMAI 707 apresentou um crescimento mais rápido em relação às outras linhagens (**Figura 5.6-C**). Diversos estudos relatam que *Bacillus subtilis* atinge a fase estacionária depois de 10 horas de incubação em ágar nutritivo a 37°C (Sahoo et al., 2016). Por outro lado, *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 possui um metabolismo mais lento (Mayilraj et al., 2006; Niwa et al., 2012) (**Figura 5.6-B**). Não foram observados halos de inibição no crescimento das linhagens testadas, sugerindo a compatibilidade para a estrutura do consórcio.



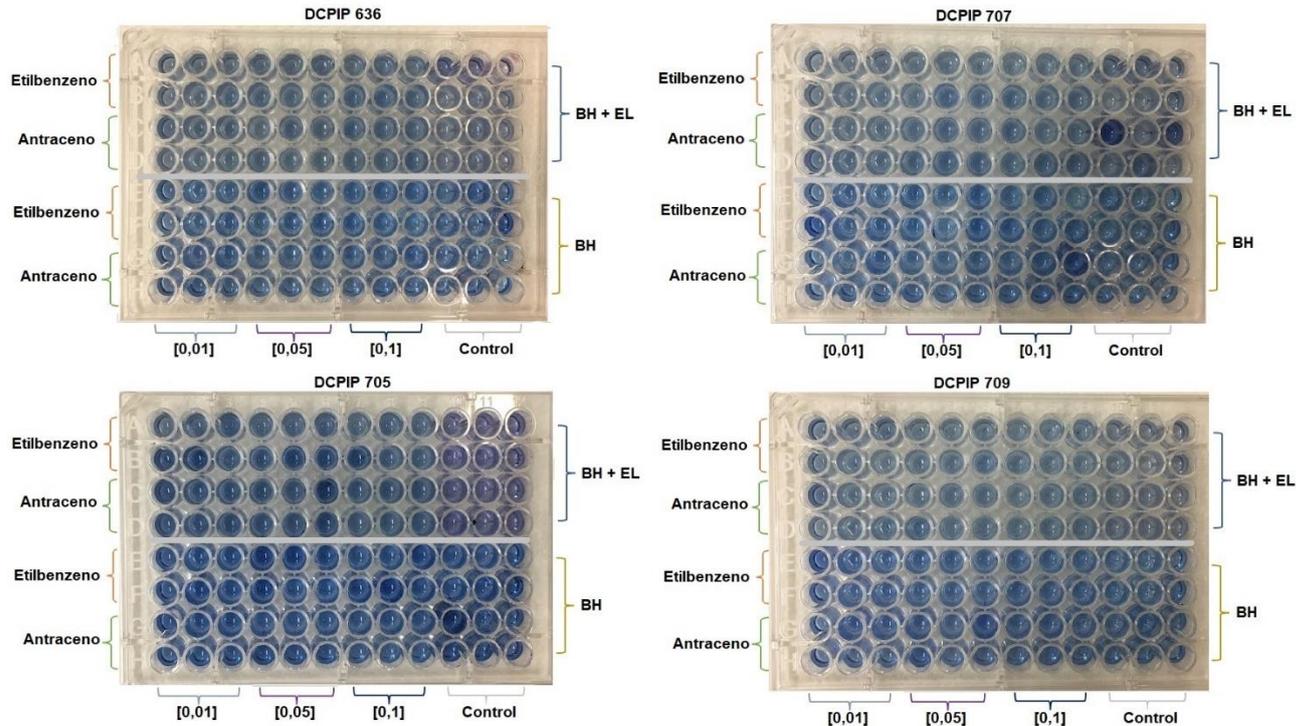
**Figura 5.6:** Teste de inibição cruzada entre as linhagens do consórcio bacteriano. **A.** *Micrococcus luteus* CBMAI 636 frente às linhagens: 1. *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705, 2. *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e 3. *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709; **B.** *D. kunjamensis* CBMAI 705 frente às linhagens: 1. *M. luteus* CBMAI 636, 2. *B. subtilis* CBMAI 707 e 3. *A. xylosoxidans* CBMAI 709; **C.** *B. subtilis* CBMAI 707 frente às linhagens: 1. *M. luteus* CBMAI 636, 2. *D. kunjamensis* CBMAI 705 e 3. *A. xylosoxidans* CBMAI 709; **D.** *A. xylosoxidans* CBMAI 709 frente às linhagens: 1. *M. luteus* CBMAI 636, 2. *D. kunjamensis* CBMAI 705 e 3. *B. subtilis* CBMAI 707.

#### 5.4.2. Ensaios colorimétricos MTT e DCPIP

Para a avaliação da viabilidade celular das linhagens *Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705, *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709, e da capacidade de utilização dos hidrocarbonetos como substratos, foram empregados os testes colorimétricos MTT e DCPIP, respectivamente (**Figuras 5.7 e 5.8**).



**Figura 5.7:** Avaliação da viabilidade celular das linhagens *Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705, *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 frente aos hidrocarbonetos etilbenzeno e antraceno, através do teste de MTT.



**Figura 5.8:** Avaliação da capacidade de degradação das linhagens *Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705, *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 frente aos hidrocarbonetos etilbenzeno e antraceno, através do teste de DCPIP.

No teste MTT, as linhagens *Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709, apresentaram ótima resposta de tolerância na presença dos hidrocarbonetos etilbenzeno e antraceno, na concentração de 0,1 mg/mL, usando o meio de cultura BH+EL (**Figura 5.7**). A mudança de amarelo para roxo escuro sugere que a bactéria está ativa metabolicamente ao reduzir o NADH para NADPH (Van Tonder et al., 2015). Contrariamente, *Bacillus subtilis* CBMAI 707 não mostrou tolerância aos hidrocarbonetos testados em nenhuma das concentrações e em nenhum dos meios utilizados (**Figura 5.7-MTT 709**).

No teste de DCPIP, a leitura da mudança de cores foi feita de forma qualitativa usando o branco como controle. Este ensaio permite a detecção rápida da oxidação de uma fonte de carbono (etilbenzeno ou antraceno) mostrando a redução do DCPIP (mudança da dor de azul para incoloro; o qual vai aceitar os elétrons doados pela fonte de carbono). A assimilação para a degradação de hidrocarbonetos por microrganismos tem sido confirmada pelo ensaio DCPIP (Kubota et al., 2008), portanto pode-se observar que as linhagens *Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705, *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 mostraram captação dos hidrocarbonetos etilbenzeno e antraceno na

concentração de 0,1 mg/mL quando foram cultivadas no meio BH+EL (**Figura 5.8-DCPIP 636, 705, 709**).

Linhagens pertencentes a estes gêneros já foram relatadas na literatura como sendo capazes de degradar hidrocarbonetos do petróleo. No estudo feito por (Toledo et al., 2006), os autores avaliaram a degradação de naftaleno, pireno, fluoranteno e fenantreno de quinze linhagens bacterianas, sendo que três destas pertenciam a *Micrococcus luteus*; No seu trabalho foi observado um comportamento diferente de degradação dos hidrocarbonetos naftaleno e fenantreno para uma das linhagens e não degradação para as linhagens restantes mostrando uma capacidade metabólica diferencial para cada espécie de *Micrococcus luteus*. Enquanto no estudo de (Vural et al., 2020) uma cepa de *Micrococcus luteus* foi utilizada para a criação de um consorcio bacteriano usando bactérias isoladas de ambientes contaminados, nos resultados mostrou que o consorcio conseguiu a degradação de um 70% da mistura de hidrocarbonetos aromáticos usados no estudo; por tanto as diferentes cepas de *Micrococcus luteus* vão reagir de forma diferente para cada tratamento de biorremediação usando hidrocarbonetos do petróleo.

Estudos prévios já mostraram que cepas do gênero *Dietzia* têm a capacidade de degradar compostos aromáticos policíclicos através da produção de biossurfactantes (W. Wang et al., 2014). No estudo de (Gao et al., 2019), uma cepa identificada como *Dietzia* ZQ-4 mostrou degradação preferencial de n - alcanos de cadeia curta (n-C<sub>14</sub>- n-C<sub>33</sub>).

Um estudo conduzido por Olowomofe e colaboradores (2019)(Olowomofe et al., 2019) demonstrou a capacidade de uma cepa de *Bacillus subtilis* para reduzir parcialmente hidrocarbonetos poliaromáticos, quando na sua estrutura não possuíam apenas anéis benzênicos como benzo[a,h]antraceno e benzo[b]fluoranteno, mostrando preferência de clivagem em estruturas mais simples.

Li et al., 2020, *Achromobacter xylooxidans* é relatada como um eficiente degradador de amplo espectro de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e inseticidas organofosforados (Li et al., 2020). Outros autores demonstraram a capacidade de *Achromobacter xylooxidans* de degradar fluoreno e pireno em solução (Villaverde et al., 2019), embora esta seja uma espécie composta por patógenos oportunistas, comumente isolados de amostras clínicas.

#### **5.4.3. Ensaio de biodegradação de hidrocarbonetos**

Os testes colorimétricos preliminares corroboraram os dados da anotação *in silico* dos genes e vias de degradação, demonstrando que as linhagens de bactéria em estudo têm potencial para tolerar e degradar os hidrocarbonetos testados. Neste sentido, e com base nos resultados de

inibição cruzada das linhagens, foi estruturado um consórcio com as linhagens *Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Dietzia kunjomensis* CBMAI 705, e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 para a quantificação da degradação dos hidrocarbonetos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Para o ensaio de biodegradação foram usados dois controles negativos: **CI** (Com células mortas, BH+EL e Mix de HC) e **CII** (Sem células, BH+EL e Mix de HC) e as coletas das amostras foram feitas ao longo de 45 dias de experimento em seis tempos (T0, T8, T15, T25, T35, e T45 dias).

As vias de degradação microbiana do etilbenzeno podem seguir dois caminhos: anaeróbico e aeróbico. Como o ensaio foi conduzido em condições aeróbicas, se esperava a participação da subunidade alfa de naftaleno 1,2-dioxigenase que converte o etilbenzeno em estireno (Lee & Gibson, 1996), a qual foi detectada e anotada funcionalmente no genoma da *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709. Na **Figura 5.9** pode-se observar que a partir do tempo T8 o etilbenzeno não é mais detectado no tratamento e tampouco nos controles negativos, o que sugere a volatilização do composto por causa da temperatura ocorre durante o tratamento, já que o etilbenzeno possui seu ponto de fulgor aos 15 °C (*Ethylbenzene*, n.d.) o que pode explicar por que o composto não foi detectado a partir do T8. A diminuição da concentração de etilbenzeno no tratamento pode estar associado a propriedades intrínsecas do composto; as condições do sistema poderiam ter sugerido um constante risco de evaporação do composto.

Na pesquisa feita por (Hazrati et al., 2015), os autores avaliaram o etilbenzeno junto com estireno em condições aeróbicas; o experimento consistiu em trabalhar em um sistema fechado onde foi possível recuperar os dados da evaporação dos hidrocarbonetos. Os autores concluíram que em maiores quantidades, há uma diminuição da concentração do hidrocarboneto de forma constante. Para a degradação do etilbenzeno, foi criado um sistema com os BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), devido à alta volatilização que possui o etilbenzeno (Wongbunmak et al., 2020).

O fenantreno é um hidrocarboneto aromático policíclico composto por três anéis de benzeno (*Phenanthrene* /  $C_{14}H_{10}$  - PubChem, n.d.-b). A degradação de fenantreno pelos microrganismos é feita inicialmente pelos genes *fenantreno 1,2-monoxigenase* ou subunidade grande de *PAH dioxigenase*, que codificam oxigenases que catalisam a incorporação de um ou mais átomos de oxigênio no substrato (Johannes Everse, 2004).

Á anotação funcional dos genomas do consórcio não evidenciou genes associados à degradação de fenantreno. No entanto, em um estudo prévio foi relatado a degradação de fenantreno pelas linhagens *Micrococcus luteus* CBMAI 636 (antes identificado como

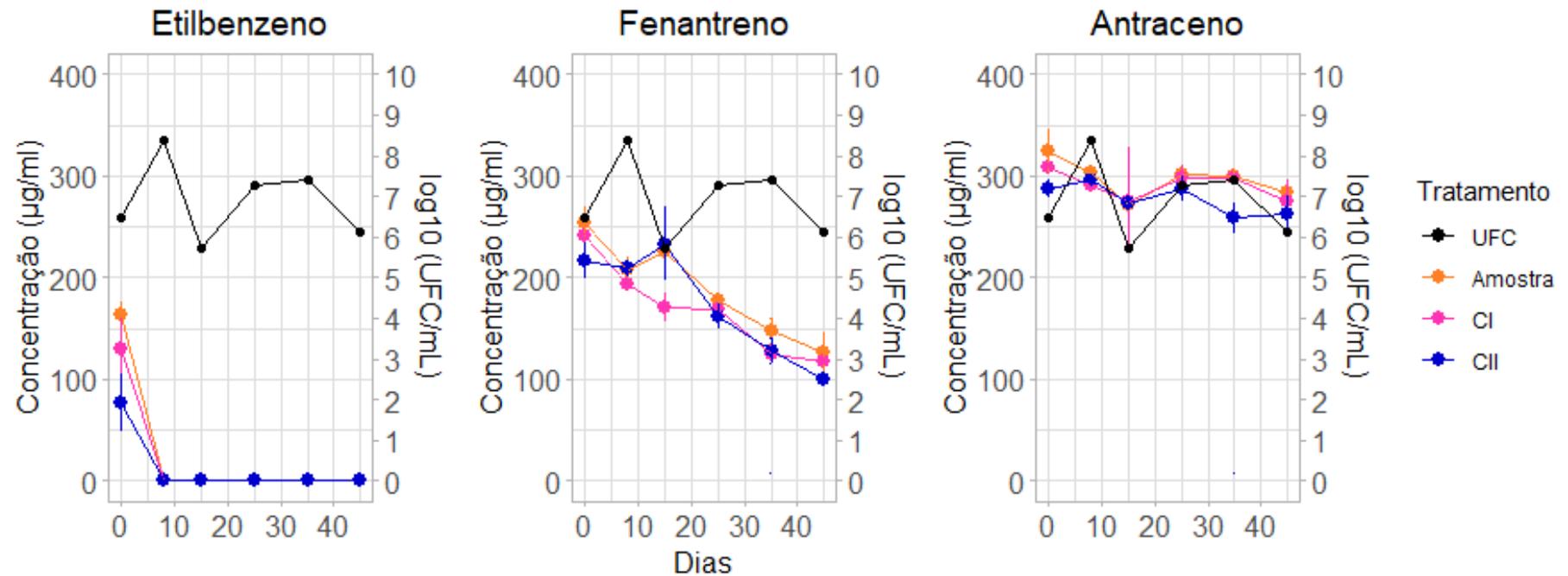
*Micrococcus* sp. CBMAI 636) e *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 (antes identificado como *Dietzia maris* CBMAI 705), com porcentagens de até 99% de degradação com relação à amostra controle em 21 dias (Dellagnezze et al., 2014). Durante o ensaio de biodegradação, foi observado um padrão similar de diminuição do composto nos controles negativos (CI e CII) e no tratamento (**Figura 5.9**). O cromatógrafo de gases, possui a capacidade de obter limites de detecção de faixa baixa de  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Hopfer, 2022), pelo qual pode-se registrar as leituras de baixa concentração. No entanto à baixa quantidade de composto utilizado no sistema, aquosidade e salinidade do meio poderiam ter resultado na insolubilidade do composto e, portanto, na perda destes no momento da extração, concentração e injeção no cromatógrafo. Para próximos testes é recomendável a avaliação no GC-MS das quantidades dos compostos de hidrocarbonetos dos petróleos a testar antes e depois da biodegradação.

O antraceno é um hidrocarboneto aromático policíclico sólido (PAH) composto por três anéis de benzeno. É o hidrocarboneto aromático tricíclico mais simples (*Anthracene / (C6H4CH)2* - PubChem, n.d.-b). As condições para a degradação deste são aeróbicas, portanto, a primeira enzima a ser ativada é a subunidade alfa de naftaleno 1,2-dioxigenase. Segundo a genômica funcional, este gene está presente em *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 sugerindo a ação inicial na via de degradação por parte desta linhagem; para as outras linhagens do consorcio não foi identificado nenhum gene de participação esta via, podendo ser uma das razões pelas quais não se pode observar degradação do composto por ação do consórcio testado, **Figura 5.9**; esperava-se que as linhagens *Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 tivessem participado na degradação do antraceno assim como se observou no trabalho da Dellagnezze e colaboradores (2014) ao degradar o fenantreno, porque de acordo com a anotação genômica (**Capítulo I**), estas linhagens não mostram genes de degradação do fenantreno. Outro fator importante a ser considerado é que o antraceno tem maior hidrofobicidade e potencial de bioacumulação que os outros compostos, o que faz deste hidrocarboneto um composto de difícil degradação (Bibi et al., 2018). Em um estudo recente, uma linhagem de *Micrococcus luteus* foi avaliada para a degradação de antraceno, tendo sido observada uma redução parcial após 21 dias de ensaio. Porém, o teste com a linhagem mostrou maior redução dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de 5 ou mais anéis (Olowomofe et al., 2019).

No estudo de Abuhamed e colaboradores (2014) os autores avaliaram a degradação da mistura de benzeno, tolueno e fenol por uma linhagem de *Pseudomonas putida*, e observaram um aumento na degradação do fenol e inibição da degradação do benzeno e tolueno. O mesmo poderia ter acontecido com o consórcio ao ter escolhido por preferência o fenantreno como

composto principal de carbono. Além disso, deve-se considerar que os PAHs de três ou menos anéis aromáticos são facilmente sublimados durante os processos de concentração. Portanto, a quantificação da concentração deve ser monitorada cuidadosamente a fim de evitar a perda de umidade ou qualquer evaporação dos PAHs (Peng & Lim, 2022).

## Teste de Degradação de Hidrocarbonetos Consórcio de Três Bactérias



**Figura 5.9:** Ensaio de degradação dos compostos etilbenzeno, fenantreno e antraceno pelo consórcio composto pelas linhagens *Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 ao longo de 45 dias de monitoramento e amostragens realizadas em 6 tempos diferentes. Amostra refere-se aos hidrocarbonetos do petróleo avaliados, **CI**: Controle negativo com células mortas, BH+EL e Mix de HC e **CII**: Controle negativo sem células, BH+EL e Mix de HC. As barras representam os desvios padrão.

O potencial de degradação de hidrocarbonetos das linhagens *Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 exibidos nos testes colorimétricos não foi refletido no ensaio de biodegradação *in vitro*, quando foram avaliados em consorcio. As condições de crescimento microbiano junto com as propriedades intrínsecas dos compostos e as técnicas de extração e quantificação, podem ter dificultado a determinação da capacidade de degradação dos compostos (etilbenzeno, fenantreno e antraceno). Além disso, a biodegradação é influenciada diretamente pela solubilidade dos hidrocarbonetos, considerando que a temperaturas de (28°C e 31°C), a volatilidade dos hidrocarbonetos e a solubilidade em água diminuem resultando na diminuição da biodegradação (Behera et al., 2021). A combinação complexa de vários fatores biológicos e abióticos pode limitar a ação das bactérias sobre os hidrocarbonetos do petróleo de várias maneiras (Xu et al., 2018c), como a biodisponibilidade limitada de hidrocarbonetos do petróleo, o contato da célula bacteriana com os substratos de hidrocarbonetos, a introdução de oxigênio molecular na molécula de hidrocarboneto pelas oxigenases funcionais, e até mesmo as condições de cultivo dos microrganismos, como nutrientes disponíveis, temperatura, pH, salinidade, velocidade de agitação, e tempo de incubação (Xu et al., 2018a).

Paralelamente, a dinâmica metabólica do consórcio foi avaliada durante os 45 dias do experimento. Determinou-se por técnicas microbiológicas a concentração de células microbianas viáveis totais nos seis pontos de amostragem. Entre o T0 e T8 houve um incremento populacional de duas unidades logarítmicas, o que pode estar associado ao consumo da fonte de carbono de mais fácil absorção como o extrato de levedura. No seguinte ponto de amostragem, foi observada uma queda da densidade populacional. No T25 pode-se observar um pequeno aumento no número de células, o que sugere que neste momento a degradação dos hidrocarbonetos começa ocorrer. No estudo prévio realizado por (Dellagnezze, Bruna Martins et al., 2014), as linhagens *Micrococcus luteus* CBMAI 636 e *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 foram testadas separadamente e mostraram degradação do fenantreno (que foram obtidos de frações de petróleo cru) durante 21 dias. Neste estudo, o consorcio foi monitorado durante 45 dias usando *Bushnell Haas* (BH) junto com os hidrocarbonetos em concentrações tolerantes, porém a degradação dos hidrocarbonetos não pode ser confirmada pelo método utilizado.

A dinâmica metabólica do consórcio ao longo do ensaio de biodegradação foi também caracterizada. Para isso, o RNA total foi extraído das alíquotas retiradas dos tempos T0, T8, T15, T25, T35, T45 dias, e a partir do RNA extraído foi realizada a síntese do cDNA e a subsequente amplificação por PCR da região V3-V4 do gene RNAr 16S. Os amplicons obtidos

foram sequenciados na plataforma Illumina. A qualidade das sequências (*reads*) obtidas foi avaliada e, em seguida, estas foram processadas com o pipeline do Qiime e o algoritmo DADA2, gerando dados que estão sumarizados **Tabela 5.1**.

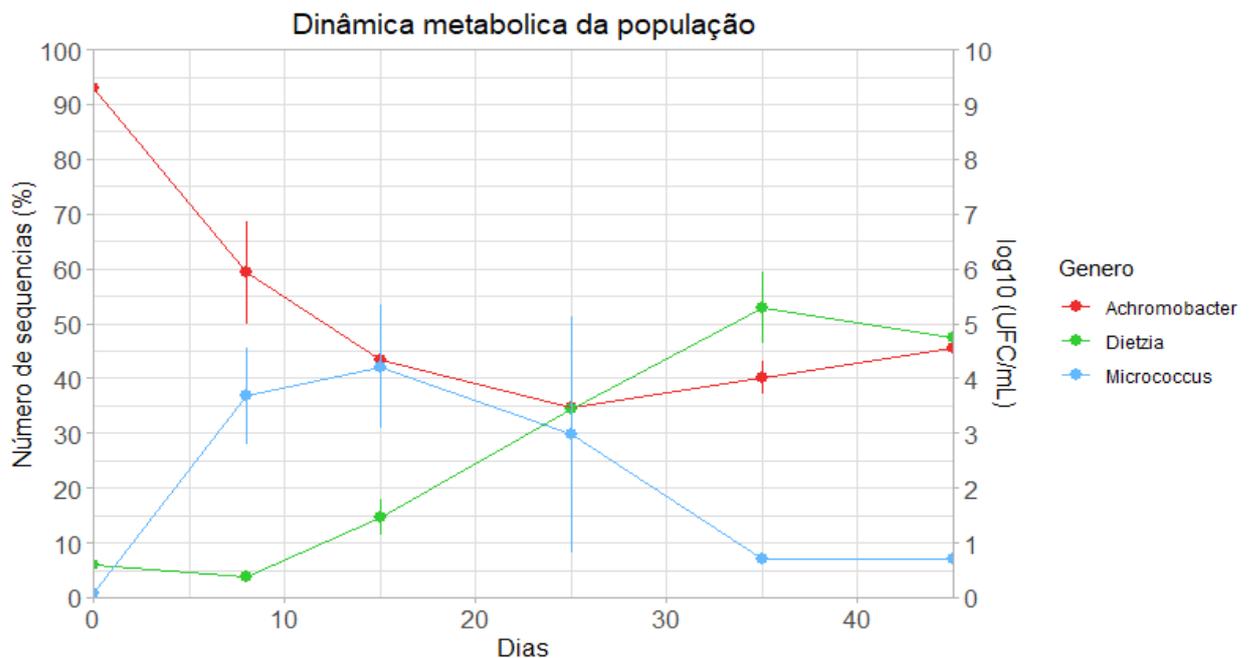
**Tabela 5.1:** Dados das sequências de amplicons do RNAr 16S, após trimagem e verificação da qualidade.

Amostras*	Sequências RNAr 16S				
	Entrada	Filtrada	Denoised	Merged	Não químérico
<i>T0a</i>	9007	8205	8149	8075	8075
<i>T0b</i>	12480	11586	11542	11485	11366
<i>T0c</i>	10065	9177	9150	9051	8866
<i>T8a</i>	10407	9584	9562	9279	8460
<i>T8b</i>	11935	11078	11059	10736	9485
<i>T8c</i>	9630	8813	8784	8598	7655
<i>T15a</i>	10755	9878	9844	9478	8022
<i>T15b</i>	10745	9883	9860	9542	8162
<i>T15c</i>	10057	9285	9258	8954	7799
<i>T25a</i>	12112	11132	11107	10749	9897
<i>T25b</i>	8908	8039	8008	7640	6539
<i>T25c</i>	10932	10041	10015	9586	8009
<i>T35a</i>	11723	10825	10784	10656	10031
<i>T35b</i>	12347	11340	11317	11035	9755
<i>T35c</i>	11558	10589	10553	10341	9674
<i>T45a</i>	11171	10295	10264	10090	9549
<i>T45b</i>	14368	13279	13241	12938	11441
<i>T45c</i>	10444	9596	9576	9330	8711

**Nota:** \*Cada número representa os dias que foram feitas as leituras durante os 45 dias junto com suas triplicatas.

A composição taxonômica determinada a partir dos dados de sequenciamento confirma a presença das linhagens de bactérias avaliadas em consórcio. De acordo com as análises feitas, a atividade metabólica dos filós das sequências (**Figura 5.10**) mostrou para o T0 havia maior taxa metabólica de *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709. A dinâmica metabólica da população foi variando ao longo dos 45 dias para cada uma das linhagens que formam o consórcio; no T8 *Micrococcus luteus* CBMAI 636 foi o mais ativo metabolicamente possivelmente, devido a adição do extrato de levedura ao meio, já que este é enriquecido com aminoácidos e vitaminas que atuaram como co-fatores para a produção de enzimas (Farg &

Soliman, 2011). Já para o T15 a diminuição do extrato de levedura afetou diretamente a capacidade metabólica de *Micrococcus luteus* CBMAI 636. No T25 *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 começam aumentar seu metabolismo devido a possível adaptação metabólica aos substratos (mistura de hidrocarbonetos) no médio. *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 mostrou ser a linhagem mais ativa metabolicamente no T45 seguida de *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709. As cepas de *Dietzia* são reconhecidas como bactérias ideais para atividades de degradação de hidrocarbonetos do petróleo devido à capacidade de aumentar as atividades de hidrogenase e catalase e, desta forma, acelerar o processo de síntese proteica (Alonso-Gutiérrez et al., 2011). Em adição, tem sido observado a presença de uma ampla gama de genes catabólicos de monoxigenases e dioxigenases em espécies de *Dietzia* (Ausuri et al., 2021), as quais tem demonstrado a capacidade de degradar hidrocarbonetos aromáticos como naftaleno, fenantreno e fluoranteno (Sushil Kumar et al., 2011).



**Figura 5.10:** Dinâmica metabólica das populações do consórcio bacteriano, avaliada em função do número de sequências de RNAr 16S de cada gênero nos diferentes tempos amostrados ao longo do ensaio de biodegradação. As barras representam os desvios padrão.

A dinâmica da população bacteriana do consórcio mostrou a *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 como as linhagens com melhor participação metabólica no T45. Na literatura é reportado que *Achromobacter xylosoxidans* possui tolerância a compostos aromáticos e metais pesados (Wittmann et al., 2014). *A. xylosoxidans* pode

degradar uma ampla gama de PAHs LMW e HMW, incluindo naftaleno, fenantreno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, dibenzo[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-cd]pireno presentes em solos (Dave et al., 2014).

Da mesma maneira, o gênero *Dietzia* é conhecido pela capacidade de degradação de compostos hidrocarbonados (Chang et al., 2018).

Este ensaio de biodegradação será repetido com algumas modificações com o intuito de se confirmar o potencial de degradação das linhagens. Estas modificações incluirão um enriquecimento prévio das bactérias em meio mínimo mineral com extrato de levedura e hidrocarbonetos, seguido de subseqüentes transferências para meio mínimo contendo apenas os hidrocarbonetos, sendo que o meio de cultivo do ensaio de biodegradação não deverá conter extrato de levedura. Ainda, modificações de ordem analítica serão feitas, como a quantificação prévia de diferentes concentrações dos padrões dos hidrocarbonetos para conhecer o limite de detecção do cromatógrafo utilizado, o comportamento do composto e o quanto é recuperado após o processo de extração com solventes, e também uso de compostos correspondentes a subprodutos da degradação como padrões e a realização de sua quantificação. Muito provavelmente testaremos outras técnicas cromatográficas para avaliar a eficiência na detecção dos hidrocarbonetos, como cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

## 5.5. CONCLUSÕES

- Os testes colorimétricos MTT e DCPIP ajudaram na identificação rápida da tolerância e capacidade de degradação dos hidrocarbonetos, e o teste de inibição cruzada permitiu confirmar a compatibilidade entre as linhagens de bactérias para a estruturação do consórcio.
- A inconsistência observada entre o tratamento com as linhagens potencialmente degradadoras e os controles negativos não permitiu confirmar quimicamente se houve degradação dos hidrocarbonetos etilbenzeno, fenantreno e antraceno pelas linhagens *Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709.
- O metabolismo das bactérias *Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 no consórcio foi distinto e variou significativamente ao longo do experimento, demonstrando que estas bactérias usaram os nutrientes disponíveis e reagiram

às condições de incubação de maneiras diferentes, *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 foi a linhagem cujo metabolismo prosperou nas condições de incubação, aumentando sua atividade metabólica do T8 ao T35, provavelmente sendo capaz de utilizar os hidrocarbonetos como fonte de energia após o esgotamento dos nutrientes presentes no extrato de levedura.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

- A genômica funcional permitiu elucidar os genes e vias metabólicas para degradação de hidrocarbonetos das linhagens *Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705, *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 e *Bacillus subtilis* CBMAI 707, revelando um amplo potencial metabólico.
- As análises de genômica comparativa sugerem que os genes de degradação de hidrocarbonetos das bactérias *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 não sofreram transferência horizontal e, possivelmente, foram selecionados por eventos independentes como resposta à pressão seletiva constante da presença de hidrocarbonetos do petróleo no reservatório.
- Reservatórios de petróleo são ambientes capazes de selecionar bactérias de diferentes grupos taxonômicos com potencial genético distinto para se adaptar e sobreviver às condições extremas e utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos no presente trabalho trouxeram uma melhor compreensão das capacidades metabólicas de degradação de hidrocarbonetos do petróleo das linhagens *Micrococcus luteus* CBMAI 636, *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705, *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709. Porém, os dados de degradação não foram conclusivos. Neste sentido, como estudo futuro, recomenda-se o emprego de um sistema *in vitro* de degradação de hidrocarbonetos que seja fechado, com o fim de evitar a perda dos compostos por evaporação, assim como o estabelecimento de uma metodologia analítica mais eficiente para a extração e análise da concentração dos hidrocarbonetos.

Da mesma forma, será necessário determinar ainda se existe sinergismo entre as linhagens. Neste sentido, as informações do potencial metabólico das linhagens, obtidas a partir dos genomas, serão empregadas em análises de balanço de fluxo para avaliar as possibilidades de interações positivas entre as mesmas. A eficiência de degradação dos hidrocarbonetos será então avaliada em ensaios *in vitro* utilizando as linhagens em consórcio (3 a 3) e também de forma independente. A dinâmica populacional e metabólica do consórcio ao longo do ensaio também será investigada. A criação de um consórcio bacteriano eficiente na degradação de diferentes classes de hidrocarbonetos do petróleo pode representar uma ferramenta com grande potencial de aplicação para mitigar a poluição em processos da cadeia produtiva da indústria de petróleo e gás.

## 8. REFERÊNCIAS

- Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., & Naidu, R. (2015). A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(3), 670–699. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1603-5>
- Abdulazeez, T. Lawal, D. of C., Sciences, Fountain University, O., & Nigeria. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, 3(5–6), 537–567. <https://doi.org/10.1080/23311843.2017.1339841>
- Abu, G. O., Emmanuel, O., Enobong, E., Gideon, A., Gomes, S., & Leite, F. (2018). Laboratory-Scale Bioremediation of Crude Oil Polluted Soil Using a Consortia of Rhizobacteria Obtained from Plants in Gokana-Ogoni, Rivers State. *Article in Journal of Advances in Microbiology*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.9734/JAMB/2018/38708>
- Adeniji, A. O., Okoh, O. O., & Okoh, A. I. (2017). Analytical methods for the determination of the distribution of total petroleum hydrocarbons in the water and sediment of aquatic systems: A review. *Journal of Chemistry*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5178937>
- Agência France-Press. (2018, April 26). *Explosão em refinaria de petróleo nos EUA deixa vários feridos*. Correio Braziliense. [https://www.correiobraziliense.com.br/app/noticia/mundo/2018/04/26/interna\\_mundo,676579/explosao-em-refinaria-de-petroleo-nos-eua-deixa-varios-feridos.shtml](https://www.correiobraziliense.com.br/app/noticia/mundo/2018/04/26/interna_mundo,676579/explosao-em-refinaria-de-petroleo-nos-eua-deixa-varios-feridos.shtml)
- Agrawal, N., Verma, P., & Shahi, S. K. (2018). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (phenanthrene and pyrene) by the ligninolytic fungi *Ganoderma lucidum* isolated from the hardwood stump. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0197-5>
- Ahmad, F., Zhu, D., & Sun, J. (2020). Bacterial chemotaxis: a way forward to aromatic compounds biodegradation. *Environmental Sciences Europe 2020 32:1*, 32(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/S12302-020-00329-2>
- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology 2019 37:4*, 37(4), 420–423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
- Alonso-Gutiérrez, J., Teramoto, M., Yamazoe, A., Harayama, S., Figueras, A., & Novoa, B. (2011). Alkane-degrading properties of *Dietzia* sp. H0B, a key player in the Prestige oil spill biodegradation (NW Spain). *Journal of Applied Microbiology*, 111(4), 800–810. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2011.05104.X>

- American Petroleum Institute, Association for the Environmental Health of Soils, Association of American Railroads, British Petroleum, Chevron Research and Technology Company, Exxon Biomedical Sciences, I., Retec, I., Shell Development Company, United States Air Force, A. F. R. L., & University of Massachusetts. (1998). Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Environmental Media. *Amherst Scientific Publishers*, 98.
- Amoureux, L., Bador, J., Fardeheb, S., Mabile, C., Couchot, C., Massip, C., Salignon, A. L., Berlie, G., Varin, V., & Neuwirth, C. (2013). Detection of *Achromobacter xylosoxidans* in hospital, domestic, and outdoor environmental samples and comparison with human clinical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7142–7149.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.02293-13>
- Andrews, S. (2010). *FastQC A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data*.  
<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Anthracene | (C6H4CH)2 - PubChem*. (n.d.-a). Retrieved July 20, 2022, from  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Anthracene#section=Raman-Spectra>
- Anthracene | (C6H4CH)2 - PubChem*. (n.d.-b). Retrieved July 4, 2022, from  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Anthracene>
- Aramaki, T., Blanc-Mathieu, R., Endo, H., Ohkubo, K., Kanehisa, M., Goto, S., & Ogata, H. (2019). KofamKOALA: KEGG Ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold. *Bioinformatics*, 36(7), 2251–2252.  
<https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTZ859>
- Arulazhagan, P., Sivaraman, C., Kumar, S. A., Aslam, M., & Banu, J. R. (2014). Co-metabolic degradation of benzo(e)pyrene by halophilic bacterial consortium at different saline conditions. *Journal of Environmental Biology*, 35(3), 445–452.
- Asnicar, F., Thomas, A. M., Beghini, F., Mengoni, C., Manara, S., Manghi, P., Zhu, Q., Bolzan, M., Cumbo, F., May, U., Sanders, J. G., Zolfo, M., Kopylova, E., Pasolli, E., Knight, R., Mirarab, S., Huttenhower, C., & Segata, N. (2020). Precise phylogenetic analysis of microbial isolates and genomes from metagenomes using PhyloPhlAn 3.0. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16366-7>
- Ausuri, J., Vitale, G. A., Coppola, D., Esposito, F. P., Buonocore, C., & de Pascale, D. (2021). Assessment of the degradation potential and genomic insights towards phenanthrene by *dietzia psychralcaliphila* j11d. *Microorganisms*, 9(6).  
<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9061327/S1>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V.

- M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, *19*(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Bayat, Z., Hassanshahian, M., & Hesni, M. A. (2016). Study the symbiotic crude oil-degrading bacteria in the mussel *Macra stultorum* collected from the Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin*, *105*(1), 120–124. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2016.02.042>
- Behera, I. D., Nayak, M., Biswas, S., Meikap, B. C., & Sen, R. (2021). Enhanced biodegradation of total petroleum hydrocarbons by implementing a novel two-step bioaugmentation strategy using indigenous bacterial consortium. *Journal of Environmental Management*, *292*, 112746. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2021.112746>
- Bibi, N., Hamayun, M., Khan, S. A., Iqbal, A., Islam, B., Shah, F., Khan, M. A., & Lee, I. J. (2018). Anthracene biodegradation capacity of newly isolated rhizospheric bacteria *Bacillus cereus* S13. *PLoS ONE*, *13*(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0201620>
- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Weber, T. (2021). antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research*, *49*(W1), W29–W35. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB335>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU170>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* *2019* *37*:8, *37*(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bounous, D. I., Campagnoli, R. P., & Brown, J. (1992). Comparison of MTT colorimetric assay and tritiated thymidine uptake for lymphocyte proliferation assays using chicken splenocytes. *Avian Diseases*, *36*(4), 1022–1027. <https://doi.org/10.2307/1591566>
- Bradl, H., & Xenidis, A. (2005). Chapter 3 Remediation techniques. *Interface Science and*

- Technology*, 6(C), 165–261. [https://doi.org/10.1016/S1573-4285\(05\)80022-5](https://doi.org/10.1016/S1573-4285(05)80022-5)
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 2016 13:7, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Cam, L. Le. (1990). Maximum Likelihood: An Introduction. *International Statistical Review / Revue Internationale de Statistique*, 58(2), 153. <https://doi.org/10.2307/1403464>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421/FIGURES/4>
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 278–288. <https://doi.org/10.1128/AEM.01177-06/ASSET/FF76FE77-5FE8-4630-AC9E-5A721DEB6DAA/ASSETS/GRAPHIC/ZAM0010773950004.JPEG>
- Cerqueira, V. S., Hollenbach, E. B., Maboni, F., Vainstein, M. H., Camargo, F. A. O., Peralba, M. do C. R., & Bento, F. M. (2011). Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.074>
- CHACON, E., ACOSTA, D., & LEMASTERS, J. J. (1997). Primary Cultures of Cardiac Myocytes as In Vitro Models for Pharmacological and Toxicological Assessments. *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*, 209–223. <https://doi.org/10.1016/B978-012163390-5.50010-7>
- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahall, D. R., Da Costa, M. S., Rooney, A. P., Yi, H., Xu, X.-W., De Meyer, S., & Trujillo, M. E. (2018). *Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes*. 68, 461–466. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516>
- Cobat, A., Orlova, M., Alcayicyrillics, A., & Schurr, E. (2010). Genetics of Susceptibility and Resistance to Infection. *Methods in Microbiology*, 37(C), 67–99. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(10\)37004-8](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(10)37004-8)
- Colston, S. M., Fullmer, M. S., Beka, L., Lamy, B., Gogarten, J. P., & Graf, J. (2014). Bioinformatic Genome Comparisons for Taxonomic and Phylogenetic Assignments Using *Aeromonas* as a Test Case. *MBio*, 5(6). <https://doi.org/10.1128/MBIO.02136-14>
- Cycoń, M., Mroziak, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2017). Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: A review. *Chemosphere*, 172, 52–71.

- <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.129>
- Da Silva, T. F., Azevedo, D. D. A., & Neto, F. R. D. A. (2007). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments and waters from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *18*(3), 628–637.  
<https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000300021>
- Das, D., Baruah, R., Sarma Roy, A., Singh, A. K., Deka Boruah, H. P., Kalita, J., & Bora, T. C. (2015). Complete genome sequence analysis of *Pseudomonas aeruginosa* N002 reveals its genetic adaptation for crude oil degradation. *Genomics*, *105*(3), 182–190.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2014.12.006>
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, *2011*, 1–13.  
<https://doi.org/10.4061/2011/941810>
- Dave, B. P., Ghevariya, C. M., Bhatt, J. K., Dudhagara, D. R., & Rajpara, R. K. (2014). Enhanced biodegradation of total polycyclic aromatic hydrocarbons (TPAHs) by marine halotolerant *Achromobacter xylosoxidans* using Triton X-100 and  $\beta$ -cyclodextrin – A microcosm approach. *Marine Pollution Bulletin*, *79*(1–2), 123–129.  
<https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2013.12.027>
- de Vasconcellos, Suzan Pantaroto, Crespim, E., da Cruz, G. F., Senatore, D. B., Simioni, K. C. M., dos Santos Neto, E. V., Marsaioli, A. J., & de Oliveira, V. M. (2009a). Isolation, biodegradation ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. *Organic Geochemistry*, *40*(5), 574–588. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2009.02.006>
- de Vasconcellos, Suzan Pantaroto, Crespim, E., da Cruz, G. F., Senatore, D. B., Simioni, K. C. M., dos Santos Neto, E. V., Marsaioli, A. J., & de Oliveira, V. M. (2009b). Isolation, biodegradation ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. *Organic Geochemistry*, *40*(5), 574–588. <https://doi.org/10.1016/J.ORGGEOCHEM.2009.02.006>
- Dellagnezze, Bruna Martins, G. V., Martins, L. L., Domingos, D. F., Limache, E. E. G., de Vasconcellos, S. P., da Cruz, G. F., & de Oliveira, V. M. (2014). Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. *Marine Pollution Bulletin*, *89*(1–2), 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.003>
- Dellagnezze, B. M., Vasconcellos, S. P., Angelim, A. L., Melo, V. M. M., Santisi, S., Cappello, S., & Oliveira, V. M. (2016). Bioaugmentation strategy employing a microbial consortium immobilized in chitosan beads for oil degradation in mesocosm scale.

- Marine Pollution Bulletin*, 107(1), 107–117.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.011>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 2004 5:1, 5(1), 1–19.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
- Ethylbenzene*. (n.d.). Retrieved July 3, 2022, from  
<https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-09/documents/ethylbenzene.pdf>
- Ethylbenzene | C6H5C2H5 - PubChem*. (n.d.). Retrieved July 20, 2022, from  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethylbenzene#section=Solubility>
- Farag, S., & Soliman, N. A. (2011). BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY Biodegradation of Crude Petroleum Oil and Environmental Pollutants by *Candida tropicalis* Strain. *Arch. Biol. Technol*, 54, 821–830.  
[www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)
- Fatehbasharad, P., Aliasghari, S., Shaterzadeh Tabrizi, I., Khan, J. A., & Boczkaj, G. (2022). Microbial fuel cell applications for removal of petroleum hydrocarbon pollutants: A review. *Water Resources and Industry*, 28, 100178.  
<https://doi.org/10.1016/J.WRI.2022.100178>
- Feng, L., Wang, W., Cheng, J., Ren, Y., Zhao, G., Gao, C., Tang, Y., Liu, X., Han, W., Peng, X., Liu, R., & Wang, L. (2007). Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(13), 5602–5607. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609650104>
- Fingas, M., Yang, C., Brown, C. E., Hollebone, B., Yang, Z., Lambert, P., Fieldhouse, B., Landriault, M., & Wang, Z. (2017). Chemical Fingerprints of Crude Oils and Petroleum Products. *Oil Spill Science and Technology*, 209–304. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809413-6.00004-7>
- Gao, P., Wang, H., Li, G., & Ma, T. (2019). Low-Abundance *Dietzia* Inhabiting a Water-Flooding Oil Reservoir and the Application Potential for Oil Recovery. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2193453>
- Gharibzahedi, S. M. T., Razavi, S. H., & Mousavi, S. M. (2013). Characterization of bacteria of the genus *Dietzia*: an updated review. *Annals of Microbiology* 2013 64:1, 64(1), 1–11.  
<https://doi.org/10.1007/S13213-013-0603-3>
- Ghosh, S., Chowdhury, R., & Bhattacharya, P. (2016). Mixed consortia in bioprocesses: role of microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2016 100:10,

- 100(10), 4283–4295. <https://doi.org/10.1007/S00253-016-7448-1>
- Gomes, M. B., Gonzales-Limache, E. E., Sousa, S. T. P., Dellagnezze, B. M., Sartoratto, A., Silva, L. C. F., Gieg, L. M., Valoni, E., Souza, R. S., Torres, A. P. R., Sousa, M. P., De Paula, S. O., Silva, C. C., & Oliveira, V. M. (2018). Exploring the potential of halophilic bacteria from oil terminal environments for biosurfactant production and hydrocarbon degradation under high-salinity conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 231–242. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2016.08.014>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Hanson, K. G., Desai, J. D., & Desai, A. J. (1993). A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology Techniques* 1993 7:10, 7(10), 745–748. <https://doi.org/10.1007/BF00152624>
- Hazen, T. C., Dubinsky, E. A., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., Piceno, Y. M., Singh, N., Jansson, J. K., Probst, A., Borglin, S. E., Fortney, J. L., Stringfellow, W. T., Bill, M., Conrad, M. E., Tom, L. M., Chavarria, K. L., Alusi, T. R., Lamendella, R., Joyner, D. C., Spier, C., ... Mason, O. U. (2010). Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6001), 204–208. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1195979>
- Hazrati, H., Shayegan, J., & Seyedi, S. M. (2015). Biodegradation kinetics and interactions of styrene and ethylbenzene as single and dual substrates for a mixed bacterial culture. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 13(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S40201-015-0230-Y/FIGURES/6>
- Hopfer, H. (2022). Gas Chromatography. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 382–390. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00024-6>
- Huerta-Cepas, J., Forslund, K., Coelho, L. P., Szklarczyk, D., Jensen, L. J., von Mering, C., & Bork, P. (2017). Fast Genome-Wide Functional Annotation through Orthology Assignment by eggNOG-Mapper. *Molecular Biology and Evolution*, 34(8), 2115–2122. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx148>
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H., Mende, D. R., Letunic, I., Rattei, T., Jensen, L. J., Von Mering, C., & Bork, P. (2019). EggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D309–D314. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1085>

- Hyatt, D., Chen, G. L., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, *11*, 119. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>
- Imam, A., Suman, S. K., Ghosh, D., & Kanaujia, P. K. (2019). Analytical approaches used in monitoring the bioremediation of hydrocarbons in petroleum-contaminated soil and sludge. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *118*, 50–64. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2019.05.023>
- Imhoff, J. F. (2016). New Dimensions in Microbial Ecology—Functional Genes in Studies to Unravel the Biodiversity and Role of Functional Microbial Groups in the Environment. *Microorganisms*, *4*(2). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS4020019>
- Jacques, R. J. S., Okeke, B. C., Bento, F. M., Teixeira, A. S., Peralba, M. C. R., & Camargo, F. A. O. (2008). Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Bioresource Technology*, *99*(7), 2637–2643. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.047>
- Jahn, B., Jonasson, N. S. W., Hu, H., Singer, H., Pol, A., Good, N. M., den Camp, H. J. M. O., Martinez-Gomez, N. C., & Daumann, L. J. (2020). Understanding the chemistry of the artificial electron acceptors PES, PMS, DCPIP and Wurster's Blue in methanol dehydrogenase assays. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *25*(2), 199–212. <https://doi.org/10.1007/S00775-020-01752-9/TABLES/3>
- Jiménez, S., Velásquez, C., Mejía, F., Arias, M., & Hormaza, A. (2019). Comparative studies of pure cultures and a consortium of white-rot fungi to degrade a binary mixture of dyes by solid-state fermentation and performance at different scales. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *145*, 104772. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2019.104772>
- Johannes Everse. (2004). Heme Proteins. *Advances in Inorganic Biochemistry*, *7*, 354–361. <https://doi.org/10.1016/B0-12-443710-9/00304-5>
- Johns, N. I., Blazejewski, T., Gomes, A. L. C., & Wang, H. H. (2016). Principles for Designing Synthetic Microbial Communities. *Current Opinion in Microbiology*, *31*, 146. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2016.03.010>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications* 2019 10:1, *10*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>

- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezuk, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, *36*(Web Server issue), W5. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKN201>
- Joye, S., Kleindienst, S., & Peña-Montenegro, T. D. (2018, March 8). *SnapShot: Microbial Hydrocarbon Bioremediation*. [https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(18\)30236-8.pdf](https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(18)30236-8.pdf)
- Juhasz, A. L., Stanley, G. A., & Britz, M. L. (2000). Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. *Letters in Applied Microbiology*, *30*(5), 396–401. <https://doi.org/10.1046/J.1472-765X.2000.00733.X>
- Julie, D., Thompson, T., & Gibson, J. (2003). UNIT 2.3 Multiple Sequence Alignment Using ClustalW and ClustalX. 2003. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0203s00>
- Kanehisa, M. (2019). Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. In *Protein Science* (Vol. 28, Issue 11, pp. 1947–1951). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/pro.3715>
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 28, Issue 1, pp. 27–30). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kanehisa, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2016). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *Journal of Molecular Biology*, *428*(4), 726–731. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, *16*(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, *41*(1), e1–e1. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS808>
- Kobras, C. M., Fenton, A. K., & Sheppard, S. K. (2021). Next-generation microbiology: from comparative genomics to gene function. *Genome Biology* *2021 22:1*, *22*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S13059-021-02344-9>
- Kotterman, M. J. J., Vis, E. H., & Field, J. A. (1998). Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 and indigenous microflora. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(8), 2853–2858.

- <https://doi.org/10.1128/AEM.64.8.2853-2858.1998>
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, *305*(3), 567–580.  
<https://doi.org/10.1006/JMBI.2000.4315>
- Kube, M., Chernikova, T. N., Al-Ramahi, Y., Beloqui, A., Lopez-Cortez, N., Guazzaroni, M. E., Heipieper, H. J., Klages, S., Kotsyurbenko, O. R., Langer, I., Nechitaylo, T. Y., Lünsdorf, H., Fernández, M., Juárez, S., Ciordia, S., Singer, A., Kagan, O., Egorova, O., Alain Petit, P., ... Golyshin, P. N. (2013). Genome sequence and functional genomic analysis of the oil-degrading bacterium *Oleispira antarctica*. *Nature Communications*, *4*.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms3156>
- Kubota, K., Koma, D., Matsumiya, Y., Chung, S. Y., & Kubo, M. (2008). Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbon-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-degradation by the 2,6-DCPIP assay. *Biodegradation*, *19*(5), 749–757.  
<https://doi.org/10.1007/S10532-008-9179-1/TABLES/3>
- Kumar, Sanjay, & Acharya, S. K. (1999). 2,6-Dichloro-phenol indophenol prevents switch-over of electrons between the cyanide-sensitive and -insensitive pathway of the mitochondrial electron transport chain in the presence of inhibitors. *Analytical Biochemistry*, *268*(1), 89–93. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1998.3009>
- Kumar, Sudhir, Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSY096>
- Kumar, Sushil, Upadhayay, S. K., Kumari, B., Tiwari, S., Singh, S. N., & Singh, P. K. (2011). In vitro degradation of fluoranthene by bacteria isolated from petroleum sludge. *Bioresource Technology*, *102*(4), 3709–3715.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.11.101>
- Kurtz, S., Phillippy, A., Delcher, A. L., Smoot, M., Shumway, M., Antonescu, C., & Salzberg, S. L. (2004). Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biology*, *5*(2), 1–9. <https://doi.org/10.1186/GB-2004-5-2-R12/FIGURES/3>
- Kutmon, M., van Iersel, M. P., Bohler, A., Kelder, T., Nunes, N., Pico, A. R., & Evelo, C. T. (2015). PathVisio 3: An Extendable Pathway Analysis Toolbox. *PLOS Computational Biology*, *11*(2), e1004085. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004085>
- Lee, K., & Gibson, D. T. (1996). Toluene and ethylbenzene oxidation by purified naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816-4. *Applied and Environmental*

- Microbiology*, 62(9), 3101–3106. <https://doi.org/10.1128/AEM.62.9.3101-3106.1996>
- Li, Y., Tian, Y., Hao, Z., & Ma, Y. (2020). Complete genome sequence of the aromatic-hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter xylosoxidans* DN002. *Archives of Microbiology*, 202(10), 2849–2853. <https://doi.org/10.1007/S00203-020-01977-X/TABLES/2>
- LIANG, K., GAO, R., WANG, C., WANG, W., & YAN, W. (2021). Chemotaxis Toward Crude Oil by an Oil-Degrading *Pseudomonas aeruginosa* 6-1B Strain. *Polish Journal of Microbiology*, 70(1), 69. <https://doi.org/10.33073/PJM-2021-006>
- Lin, T. C., Pan, P. T., & Cheng, S. S. (2010). Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1–3), 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.080>
- Logeshwaran, P., Megharaj, M., Chadalavada, S., Bowman, M., & Naidu, R. (2018). Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environmental Technology and Innovation*, 10, 175–193. <https://doi.org/10.1016/J.ETI.2018.02.001>
- Madden, T. (2003). *The BLAST Sequence Analysis Tool*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21097/>
- Margesin, R., Labbé, D., Schinner, F., Greer, C. W., & Whyte, L. G. (2003). Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils. [file:///C:/Users/Altogen/Documents/Catrina/BRM Manuscript/Article References/margesin.pdf](file:///C:/Users/Altogen/Documents/Catrina/BRM%20Manuscript/Article%20References/margesin.pdf). *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3085–3092. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3085>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), 10–12. <https://doi.org/10.14806/EJ.17.1.200>
- Martinko, M. T. M. J. M., & Clark, P. V. D. D. P. (2009). *Broch Biología de Los microorganismos* (S. A. PEARSON EDUCACIÓN (Ed.); Duodécima).
- Mayilraj, S., Suresh, K., Kroppenstedt, R. M., & Saini, H. S. (2006). *Dietzia kunjamensis* sp. nov., isolated from the Indian Himalayas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(7), 1667–1671. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.64212-0/CITE/REFWORKS>
- Meckenstock, R. U., Boll, M., Mouttaki, H., Koelschbach, J. S., Cunha Tarouco, P., Weyrauch, P., Dong, X., & Himmelberg, A. M. (2016). Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Molecular Microbiology and*

- Biotechnology*, 26(1–3), 92–118. <https://doi.org/10.1159/000441358>
- Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P., & Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60/TABLES/2>
- Meier-Kolthoff, J. P., & Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications* 2019 10:1, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>
- Meng, L., W, L., M, B., & P, S. (2019). Great correlation: Biodegradation and chemotactic adsorption of *Pseudomonas synxantha* LSH-7' for oil contaminated seawater bioremediation. *Water Research*, 153, 160–168. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2019.01.021>
- Mishra, S., Chauhan, G., Verma, S., & Singh, U. (2022). The emergence of nanotechnology in mitigating petroleum oil spills. *Marine Pollution Bulletin*, 178, 113609. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2022.113609>
- Mohamadpoor, M., Amini, J., Ashengroph, M., & Azizi, A. (2022). Evaluation of biocontrol potential of *Achromobacter xylosoxidans* strain CTA8689 against common bean root rot. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 117, 101769. <https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2021.101769>
- Mohan, S. V., Rohit, M. V., Subhash, G. V., Chandra, R., Devi, M. P., Butti, S. K., & Rajesh, K. (2019). Algal oils as biodiesel. *Biofuels from Algae*, 287–323. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64192-2.00012-3>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Ni, B., R, C., H, L., RG, E., & V, S. (2020). Growth-rate dependent resource investment in bacterial motile behavior quantitatively follows potential benefit of chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(1), 595–601. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1910849117>
- Niwa, H., Lasker, B. A., Hinrikson, H. P., Franzen, C. G., Steigerwalt, A. G., Whitney, A. M., & Brown, J. M. (2012). Characterization of human clinical isolates of *Dietzia* species previously misidentified as *Rhodococcus equi*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 31(5), 811–820. <https://doi.org/10.1007/S10096-011-1379-7/FIGURES/3>
- Noble, P. A., Citek, R. W., & Ogunseitan, O. A. (1998). Tetranucleotide frequencies in

- microbial genomes. *Electrophoresis*, *19*(4), 528–535.  
<https://doi.org/10.1002/ELPS.1150190412>
- Nurk, S., Bankevich, A., Antipov, D., Gurevich, A., Korobeynikov, A., Lapidus, A., Prjibelsky, A., Pyshkin, A., Sirotkin, A., Sirotkin, Y., Stepanauskas, R., McLean, J., Lasken, R., Clingenpeel, S. R., Woyke, T., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2013). Assembling genomes and mini-metagenomes from highly chimeric reads. *Lecture Notes in Computer Science (Including Subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, *7821 LNBI*, 158–170.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-37195-0\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-642-37195-0_13)
- Oil thieves cause spill in Rio de Janeiro's Guanabara Bay - BBC News.* (2018, December 11). News. <https://www.bbc.com/news/av/world-latin-america-46524258>
- Olawoyin, R. (2016). Application of backpropagation artificial neural network prediction model for the PAH bioremediation of polluted soil. *Chemosphere*, *161*, 145–150.  
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.07.003>
- Olowomofe, T. O., Oluyeye, J. O., Aderiye, B. I., & Oluwole, O. A. (2019). Degradation of poly aromatic fractions of crude oil and detection of catabolic genes in hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Agbabu bitumen sediments in Ondo State. *AIMS Microbiology*, *5*(4), 308. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2019.4.308>
- Ossai, I. C., Ahmed, A., Hassan, A., & Hamid, F. S. (2020). Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology & Innovation*, *17*, 100526. <https://doi.org/10.1016/J.ETI.2019.100526>
- Oyetibo, G. O., Chien, M. F., Ikeda-Ohtsubo, W., Suzuki, H., Obayori, O. S., Adebusoye, S. A., Ilori, M. O., Amund, O. O., & Endo, G. (2017). Biodegradation of crude oil and phenanthrene by heavy metal resistant *Bacillus subtilis* isolated from a multi-polluted industrial wastewater creek. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *120*, 143–151. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2017.02.021>
- Pal, S., Kundu, A., Banerjee, T. Das, Mohapatra, B., Roy, A., Manna, R., Sar, P., & Kazy, S. K. (2017). Genome analysis of crude oil degrading *Franconibacter pulveris* strain DJ34 revealed its genetic basis for hydrocarbon degradation and survival in oil contaminated environment. *Genomics*, *109*(5–6), 374–382.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.06.002>
- Panagiotakis, I., & Dermatas, D. (2015). Remediation of contaminated sites. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *94*(3), 267–268.  
<https://doi.org/10.1007/s00128-015-1490-z>

- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*, 25(7), 1043–1055.  
<https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Passarini, M. R. Z., Sette, L. D., & Rodrigues, M. V. N. (2011). Improved extraction method to evaluate the degradation of selected PAHs by marine fungi grown in fermentative medium. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(3), 564–570.  
<https://doi.org/10.1590/S0103-50532011000300022>
- Peixoto, F. B. S., Da Cunha Peixoto, J. C., Lucas Motta, D. C., Peixoto, A. T. M., Pereira, J. O., & Astolfi Filho, S. (2018). Assessment of petroleum biodegradation for *Bacillus toyonensis* by the using redox indicator 2,6 dichlorophenol indophenol. *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, 40(1). <https://doi.org/10.4025/ACTASCIBIOLSCI.V40I1.35640>
- Peng, P. L., & Lim, L. H. (2022). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Sample Preparation and Analysis in Beverages: A Review. *Food Analytical Methods*, 15(4), 1042–1061. <https://doi.org/10.1007/S12161-021-02178-Y/TABLES/3>
- Phenanthrene | C14H10 - PubChem*. (n.d.-a). Retrieved July 20, 2022, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenanthrene#section=Raman-Spectra>
- Phenanthrene | C14H10 - PubChem*. (n.d.-b). Retrieved July 4, 2022, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenanthrene>
- Pongchaikul, P., Santanirand, P., Antonyuk, S., Winstanley, C., & Darby, A. C. (2020). AcGII, a novel genomic island carrying antibiotic resistance integron In687 in multidrug resistant *Achromobacter xylosoxidans* in a teaching hospital in Thailand. *FEMS Microbiology Letters*, 367(14), 109. <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNAA109>
- Qian, X., Chen, L., Sui, Y., Chen, C., Zhang, W., Zhou, J., Dong, W., Jiang, M., Xin, F., & Ochsenreither, K. (2020). Biotechnological potential and applications of microbial consortia. *Biotechnology Advances*, 40.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2019.107500>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590–D596.  
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKS1219>
- Quirk, R. P., & Pickel, D. L. (2012). Controlled End-Group Functionalization (Including Telechelics). *Polymer Science: A Comprehensive Reference, 10 Volume Set*, 6, 351–412.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00168-0>

- Rao, H., Xue, X., Luo, M., Liu, H., & Xue, Z. (2021). Recent advances in the development of colorimetric analysis and testing based on aggregation-induced nanozymes. *Chinese Chemical Letters*, 32(1), 25–32. <https://doi.org/10.1016/J.CCLET.2020.09.017>
- RC, J., JP, E., SB, A., & GC, O. (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from aviation fuel spill site at Ibeno, Nigeria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88(6), 1014–1019. <https://doi.org/10.1007/S00128-012-0598-7>
- Reddy, P. V., Karegoudar, T. B., Monisha, T. R., & Nayak, A. S. (2017). Catabolism of fluorene through 2,3-dihydroxy indanone in *Paenibacillus* sp. PRNK-6. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 123, 156–163. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2017.05.019>
- Richard Pallardy. (2010). *Deepwater Horizon oil spill | Summary, Effects, Cause, Clean Up, & Facts*. Britannica. <https://www.britannica.com/event/Deepwater-Horizon-oil-spill>
- Richter, M., R, R.-M., F, O. G., & J, P. (2016). JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32(6), 929–931. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTV681>
- Rojo, F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria: Minireview. *Environmental Microbiology*, 11(10), 2477–2490. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x>
- Russians Struggle to Clean Up Spill* . (1994, November 1). The New York Times. <https://www.nytimes.com/1994/11/01/world/russians-struggle-to-clean-up-spill.html>
- S, M., MD, C., & R, A. (2001). Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 17(7), 646–653. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/17.7.646>
- Sacco, N. J., Bonetto, M. C., & Cortón, E. (2017). Isolation and Characterization of a Novel Electrogenic Bacterium, *Dietzia* sp. RNV-4. *PLOS ONE*, 12(2), e0169955. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0169955>
- Sahoo, K. K., Arakha, M., Sarkar, P., Robin, D. P., & Jha, S. (2016). Enhancement of properties of recycled coarse aggregate concrete using bacteria. <Http://Dx.Doi.Org/10.1080/19475411.2016.1152322>, 7(1), 22–38. <https://doi.org/10.1080/19475411.2016.1152322>
- Saitou, N., & Ne, I. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A040454>
- Santiago, C. D., Yagi, S., Ijima, M., Nashimoto, T., Sawada, M., Ikeda, S., Asano, K., Orikasa, Y., & Ohwada, T. (2017). Bacterial Compatibility in Combined Inoculations

- Enhances the Growth of Potato Seedlings. *Microbes and Environments*, 32(1), 14.  
<https://doi.org/10.1264/JSME2.ME16127>
- Sanusi, S. N. A., Halmi, M. I. E., Abdullah, S. R. S., Hassan, H. A., Hamzah, F. M., & Idris, M. (2016). Comparative process optimization of pilot-scale total petroleum hydrocarbon (TPH) degradation by *Paspalum scrobiculatum* L. Hack using response surface methodology (RSM) and artificial neural networks (ANNs). *Ecological Engineering*, 97, 524–534. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLENG.2016.10.044>
- Schneiker, S., dos Santos, V. A. M., Bartels, D., Bekel, T., Brecht, M., Buhrmester, J., Chernikova, T. N., Denaro, R., Ferrer, M., Gertler, C., Goesmann, A., Golyshina, O. V., Kaminski, F., Khachane, A. N., Lang, S., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Nechitaylo, T., ... Golyshin, P. N. (2006a). Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nature Biotechnology* 24:8, 24(8), 997–1004. <https://doi.org/10.1038/nbt1232>
- Schneiker, S., dos Santos, V. A. M., Bartels, D., Bekel, T., Brecht, M., Buhrmester, J., Chernikova, T. N., Denaro, R., Ferrer, M., Gertler, C., Goesmann, A., Golyshina, O. V., Kaminski, F., Khachane, A. N., Lang, S., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Nechitaylo, T., ... Golyshin, P. N. (2006b). Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nature Biotechnology* 24:8, 24(8), 997–1004. <https://doi.org/10.1038/nbt1232>
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Segata, N., Börnigen, D., Morgan, X. C., & Huttenhower, C. (2013). PhyloPhlAn is a new method for improved phylogenetic and taxonomic placement of microbes. *Nature Communications* 2013 4:1, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms3304>
- Seip, K. L. (1984). The Amoco Cadiz oil spill—At a glance. *Marine Pollution Bulletin*, 15(6), 218–220. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(84\)90290-X](https://doi.org/10.1016/0025-326X(84)90290-X)
- Selley, R. C., & Sonnenberg, S. A. (2015). The Physical and Chemical Properties of Petroleum. In *Elements of Petroleum Geology* (pp. 13–39). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-386031-6.00002-3>
- Sharma, B., Dangi, A. K., & Shukla, P. (2018). Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. *Journal of Environmental Management*, 210, 10–22.  
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.075>
- Singh, A., Hamme, J. D. Van, Singh, A., & Ward, O. P. (2015). Recent Advances in Petroleum Microbiology Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiol. Mol.*

- Biol. R.*, 67(August), 503–549. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.503>
- Smith, R. P., Tanouchi, Y., & You, L. (2013). Synthetic Microbial Consortia and their Applications. *Synthetic Biology*, 243–258. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394430-6.00013-3>
- Sorkhoh, N. A., Ibrahim, A. S., Ghannoum, M. A., & Radwan, S. S. (1993). High-temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-polluted Kuwaiti desert. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1993 39:1, 39(1), 123–126. <https://doi.org/10.1007/BF00166860>
- Souza, E. C., Vessoni-Penna, T. C., & De Souza Oliveira, R. P. (2014). Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 89, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.007>
- Srivastava, A. K., Singh, R. K., & Singh, D. (2021). Microbe-based bioreactor system for bioremediation of organic contaminants: present and future perspective. *Microbe Mediated Remediation of Environmental Contaminants*, 241–253. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821199-1.00020-1>
- Stahl., M. M. J. M. K. B. D. B. D. (2016). *Brock biology of microorganisms*, (S. de Fraga (Ed.); 14th editi). Pearson Education,Inc.
- Stauffer, E., Dolan, J. A., & Newman, R. (2008). Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry. *Fire Debris Analysis*, 235–293. <https://doi.org/10.1016/B978-012663971-1.50012-9>
- Sunken tanker Sanchi: Four oil slicks seen, says China* . (2018, January 18). BBC News. <https://www.bbc.com/news/world-asia-china-42728251>
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), 512–526. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A040023>
- Toledo, F. L., Calvo, C., Rodelas, B., & González-López, J. (2006). Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(3), 244–252. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2005.09.003>
- Traglia, G. M., Almuzara, M., Merquier, A. K., Adams, C., Galanternik, L., Vay, C., Centrón, D., & Ramírez, M. S. (2012). *Achromobacter xylosoxidans*: An Emerging Pathogen Carrying Different Elements Involved in Horizontal Genetic Transfer. *Current Microbiology* 2012 65:6, 65(6), 673–678. <https://doi.org/10.1007/S00284-012-0213-5>

- Trancassini, M., Iebba, V., Citerà, N., Tuccio, V., Magni, A., Varesi, P., De Biase, R. V., Totino, V., Santangelo, F., Gagliardi, A., & Schippa, S. (2014). Outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* in an Italian Cystic fibrosis center: genome variability, biofilm production, antibiotic resistance, and motility in isolated strains. *Frontiers in Microbiology*, *0*(APR), 138. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00138>
- Turner, N. R., & Renegar, D. A. (2017). Petroleum hydrocarbon toxicity to corals: A review. *Marine Pollution Bulletin*, *119*(2), 1–16. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2017.04.050>
- Van Beilen, J. B., Funhoff, E. G., Loon, A. van, Just, A., Kaysser, L., Bouza, M., Rene, Holtackers, Ro, M., Thlisberger, Li, Z., & Witholt, B. (2006). Long-Term Persistence of Dispersants following the Deepwater Horizon Oil Spill. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(1), 59–65. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.59>
- Van Tonder, A., Joubert, A. M., & Cromarty, A. D. (2015). Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Research Notes*, *8*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S13104-015-1000-8/FIGURES/3>
- Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, *223*, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>
- Varjani, S. J., Rana, D. P., Jain, A. K., Bateja, S., & Upasani, V. N. (2015). Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *103*, 116–124. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2015.03.030>
- Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2016). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresource Technology*, *222*, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.006>
- Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2017). A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *120*, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.02.006>
- Vasconcellos, Suzan Pantaroto de, Angolini, C. F. F., García, I. N. S., Martins Dellagneze, B., Silva, C. C. da, Marsaioli, A. J., Neto, E. V. dos S., & de Oliveira, V. M. (2010). Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs. *Organic Geochemistry*, *41*(7), 675–681. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2010.03.014>
- Vasconcellos, S. P., Dellagneze, B. M., Wieland, A., Klock, J. H., Neto, E. V. S., Marsaioli,

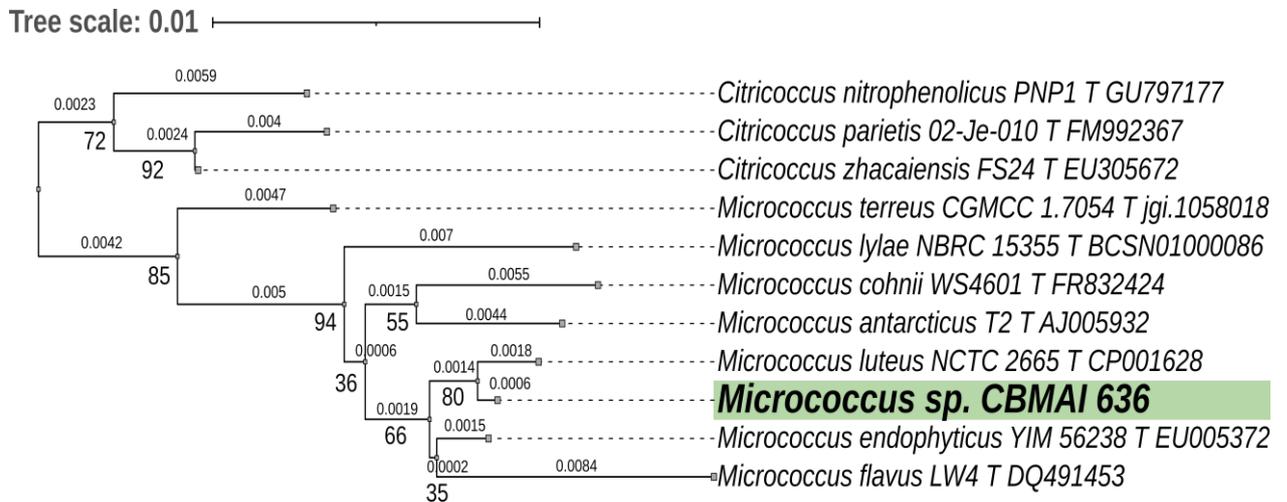
- A. J., Oliveira, V. M., & Michaelis, W. (2011). The potential for hydrocarbon biodegradation and production of extracellular polymeric substances by aerobic bacteria isolated from a Brazilian petroleum reservoir. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(6), 1513–1518. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0581-6>
- Vieira, G. A. L., Magrini, M. J., Bonugli-Santos, R. C., Rodrigues, M. V. N., & Sette, L. D. (2018). Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by marine-derived basidiomycetes: optimization of the degradation process. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(4), 749–756. <https://doi.org/10.1016/J.BJM.2018.04.007>
- Villaverde, J., Láiz, L., Lara-Moreno, A., González-Pimentel, J. L., & Morillo, E. (2019). Bioaugmentation of PAH-Contaminated Soils With Novel Specific Degradation Strains Isolated From a Contaminated Industrial Site. Effect of Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin as PAH Bioavailability Enhancer. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2588. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02588/BIBTEX>
- Vural, C., Vural, C., & Ozdemir, G. (2020). Monitoring of the degradation of aromatic hydrocarbons by bioaugmented activated sludge. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(1), 52–62. <https://doi.org/10.1002/JCTB.6200>
- Wang, F., Li, C., Wang, H., Chen, W., & Huang, Q. (2016). Characterization of a phenanthrene-degrading microbial consortium enriched from petrochemical contaminated environment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 115, 286–292. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2016.08.028>
- Wang, H., Cheng, H., Wang, F., Wei, D., & Wang, X. (2010). An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of Escherichia coli cells. *Journal of Microbiological Methods*, 82(3), 330–333. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2010.06.014>
- Wang, W., Cai, B., & Shao, Z. (2014). Oil degradation and biosurfactant production by the deep sea bacterium Dietzia maris As-13-3. *Frontiers in Microbiology*, 5(DEC), 711. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00711/ABSTRACT>
- WG, W., SM, B., DA, P., & DJ, L. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/JB.173.2.697-703.1991>
- Wick, L. Y., Harms, H., & Smith, K. E. C. (2018). Microorganism-Hydrophobic Compound Interactions. *Cellular Ecophysiology of Microbe: Hydrocarbon and Lipid Interactions*, 17–31. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-50542-8\\_40](https://doi.org/10.1007/978-3-319-50542-8_40)
- Wongbunmak, A., Khiawjan, S., Suphantharika, M., & Pongtharangkul, T. (2020). BTEX

- biodegradation by *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* W1 and its proposed BTEX biodegradation pathways. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–13.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-74570-3>
- Worst Oil Spills: The ABT Summer Oil Spill Incident*. (n.d.). Retrieved August 2, 2022, from <https://www.marineinsight.com/life-at-sea/worst-oil-spills-the-abt-summer-oil-spill-incident/>
- Wu, M., Wu, J., Zhang, X., & Ye, X. (2019). Effect of bioaugmentation and biostimulation on hydrocarbon degradation and microbial community composition in petroleum-contaminated loessal soil. *Chemosphere*, 237, 124456.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124456>
- Xia, Y., Min, H., Rao, G., Lv, Z. M., Liu, J., Ye, Y. F., & Duan, X. J. (2005). Isolation and characterization of phenanthrene-degrading *Sphingomonas paucimobilis* strain ZX4. *Biodegradation*, 16(5), 393–402. <https://doi.org/10.1007/s10532-004-2412-7>
- Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., Gao, X., Li, F., Li, H., & Yu, H. (2018a). Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 0, 2885. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02885>
- Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., Gao, X., Li, F., Li, H., & Yu, H. (2018b). Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02885>
- Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., Gao, X., Li, F., Li, H., & Yu, H. (2018c). Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02885>
- Yamamura, H., Lisdiyanti, P., Ridwan, R., Ratnakomala, S., Sarawati, R., Lestari, Y., Triana, E., Kartina, G., Widyastuti, Y., & Ando, K. (2010). *Dietzia timorensis* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(2), 451–454. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.012229-0/CITE/REFWORKS>
- Yamashita, T., & Butler, W. L. (1968). Photoreduction and Photophosphorylation with Tris-Washed Chloroplasts. *Plant Physiology*, 43(12), 1978–1986.  
<https://doi.org/10.1104/PP.43.12.1978>
- Yang, J., Wang, K., Xu, H., Yan, W., Jin, Q., & Cui, D. (2019). Detection platforms for point-of-care testing based on colorimetric, luminescent and magnetic assays: A review.

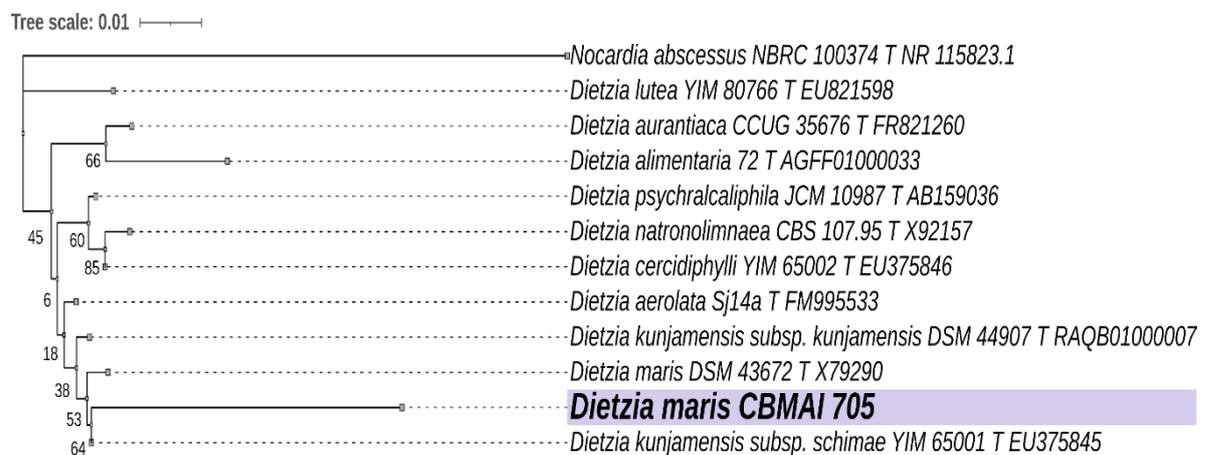
- Talanta*, 202, 96–110. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2019.04.054>
- Yang, Y., Wang, J., Liao, J., Xie, S., & Huang, Y. (2015). Abundance and diversity of soil petroleum hydrocarbon-degrading microbial communities in oil exploring areas. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1935–1946. <https://doi.org/10.1007/S00253-014-6074-Z>
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- Yvette Sierra Praeli. (2022, March 25). *Oil spill contaminates wildlife, beaches and protected areas in Peru*. MONGABAY. <https://news.mongabay.com/2022/03/oil-spill-contaminates-wildlife-beaches-and-protected-areas-in-peru/>
- Zafra, G., Taylor, T. D., Absalón, A. E., & Cortés-Espinosa, D. V. (2016). Comparative metagenomic analysis of PAH degradation in soil by a mixed microbial consortium. *Journal of Hazardous Materials*, 318, 702–710. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2016.07.060>

## 9. ANEXOS

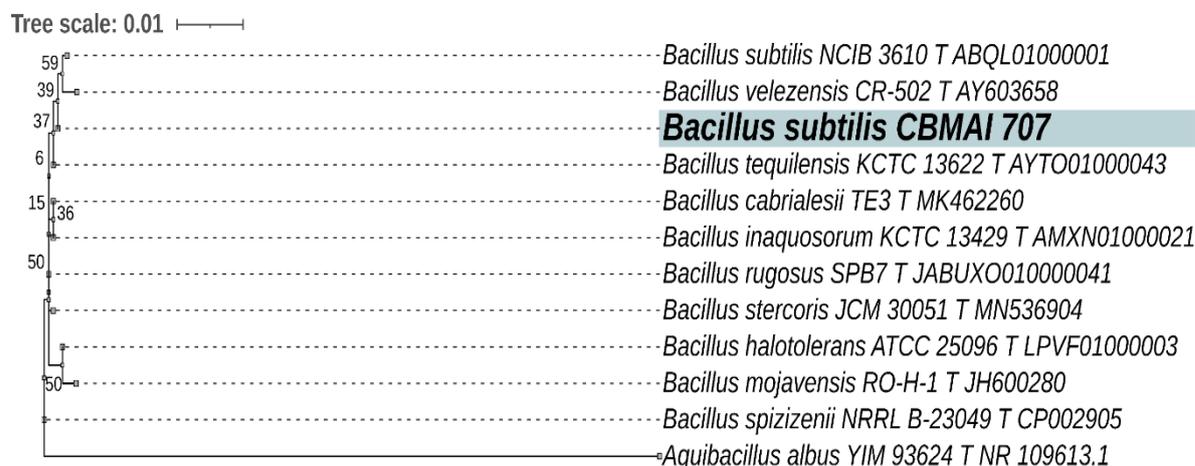
**Anexo 9.1:** Análise filogenética da sequência parcial do gene RNAr 16S obtida de *Micrococcus luteus* CBMAI 636 e de microrganismos relacionados recuperados do banco de dados EzTaxon, utilizando o método de reconstrução filogenética de Neighbor joining, utilizando 1000 repetições bootstrap. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies. *Citricoccus* spp foi usado como outgroup.



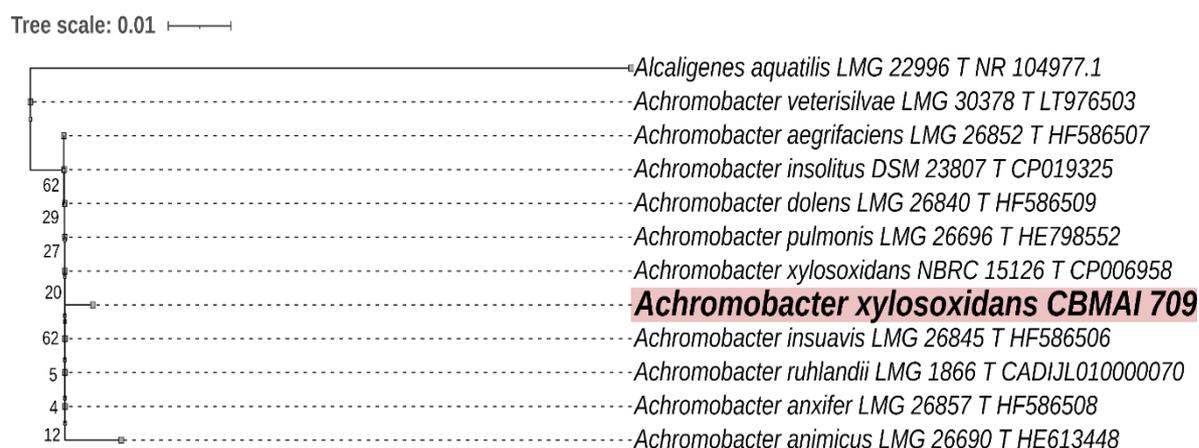
**Anexo 9.2:** Análise filogenética da sequência parcial do gene RNAr 16S obtida de *Dietzia maris* CBMAI 705 e de microrganismos relacionados recuperados do banco de dados EzTaxon, utilizando o método de reconstrução filogenética de Neighbor joining, utilizando 1000 repetições bootstrap. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies. *Nocardia abscessus* NBRC 100374<sup>T</sup> foi usado como outgroup.



**Anexo 9.3:** Análise filogenética da sequência parcial do gene RNAr 16S obtida de *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e de microrganismos relacionados recuperados do banco de dados EzTaxon, utilizando o método de reconstrução filogenética de Neighbor joining, utilizando 1000 repetições bootstrap. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies. *Aquibacillus albus* YIM 93624<sup>T</sup> foi usado como outgroup.

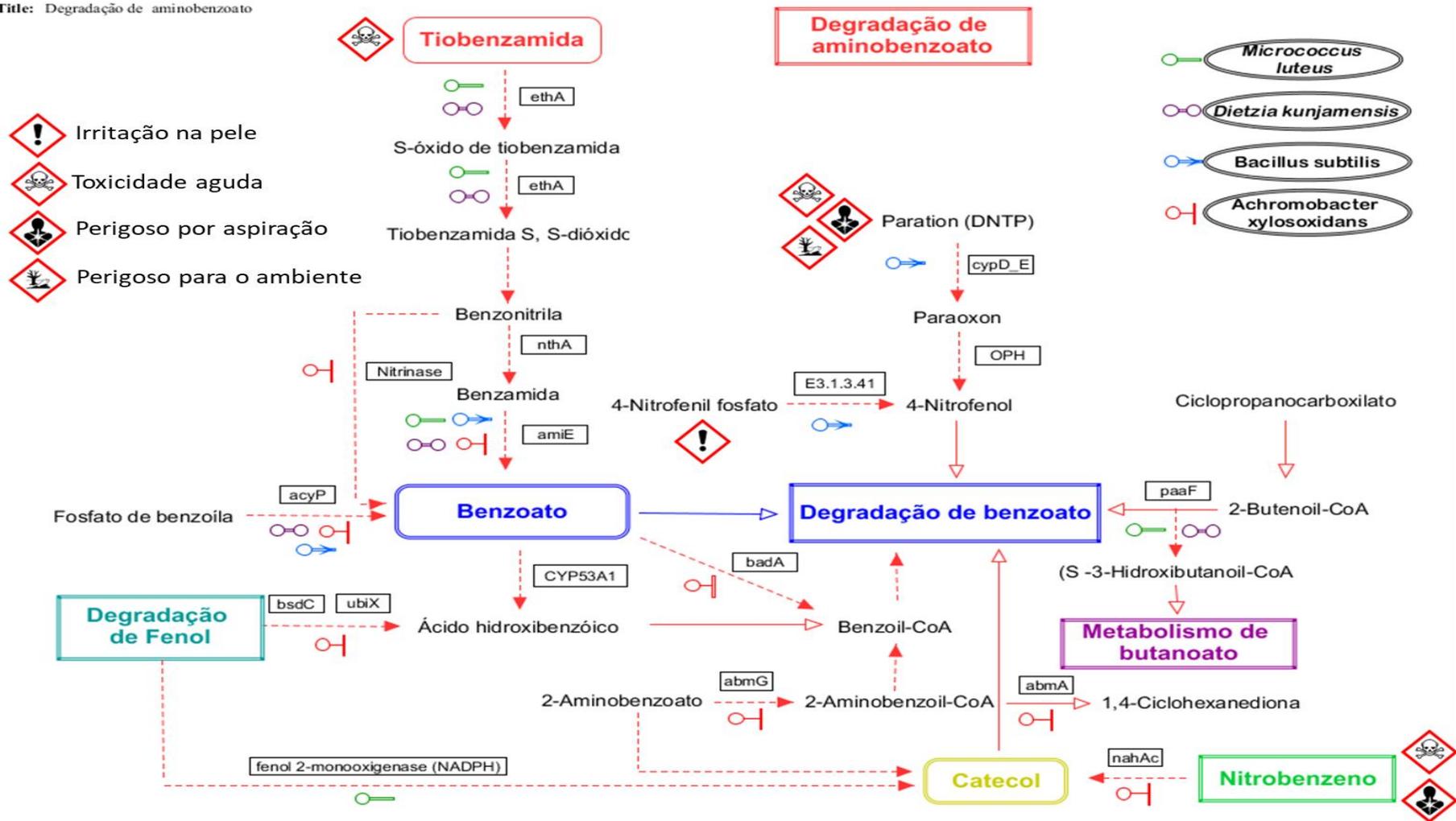


**Anexo 9.4:** Análise filogenética da sequência parcial do gene RNAr 16S obtida de *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 e de microrganismos relacionados recuperados do banco de dados EzTaxon, utilizando o método de reconstrução filogenética de Neighbor joining, utilizando 1000 repetições bootstrap. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies. *Alcaligenes aquatilis* LMG 22996<sup>T</sup> foi usado como outgroup.



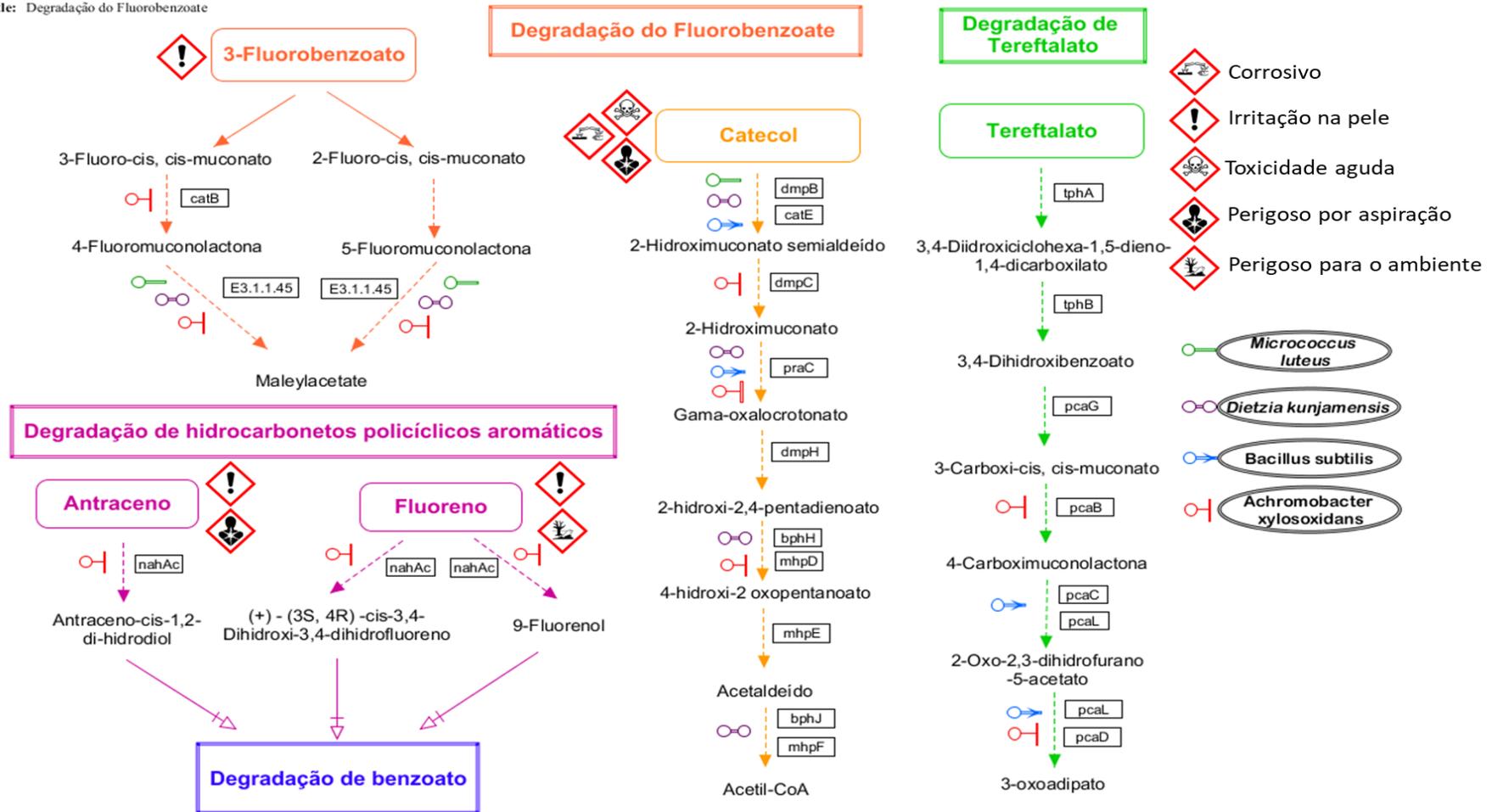
**Anexo 9.5:** Via de degradação do aminobenzoato junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.

Titulo: Degradação de aminobenzoato



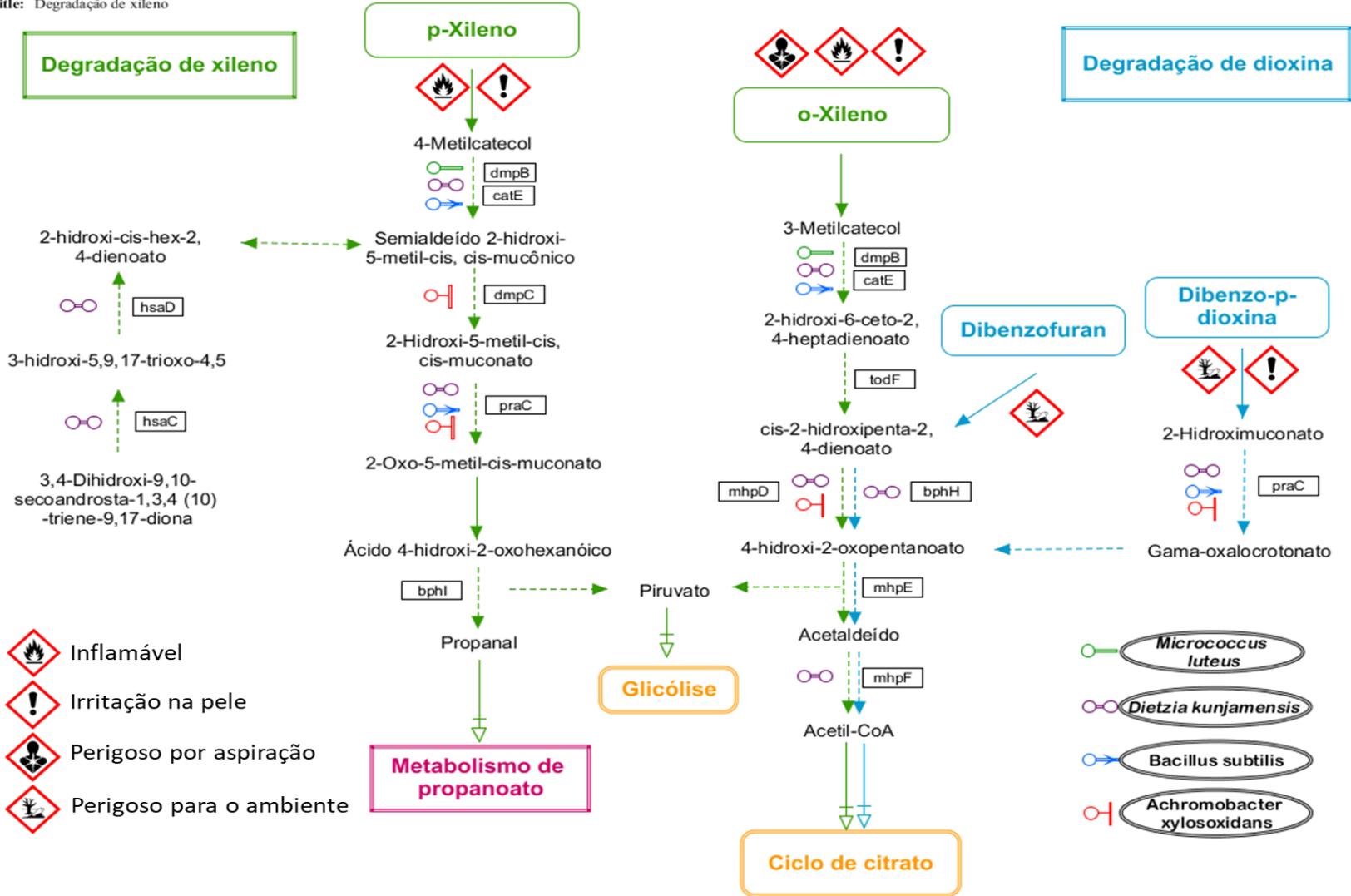
**Anexo 9.6:** Via de degradação do Fluorobenzoate, tereftalato e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.

Titulo: Degradação do Fluorobenzoate

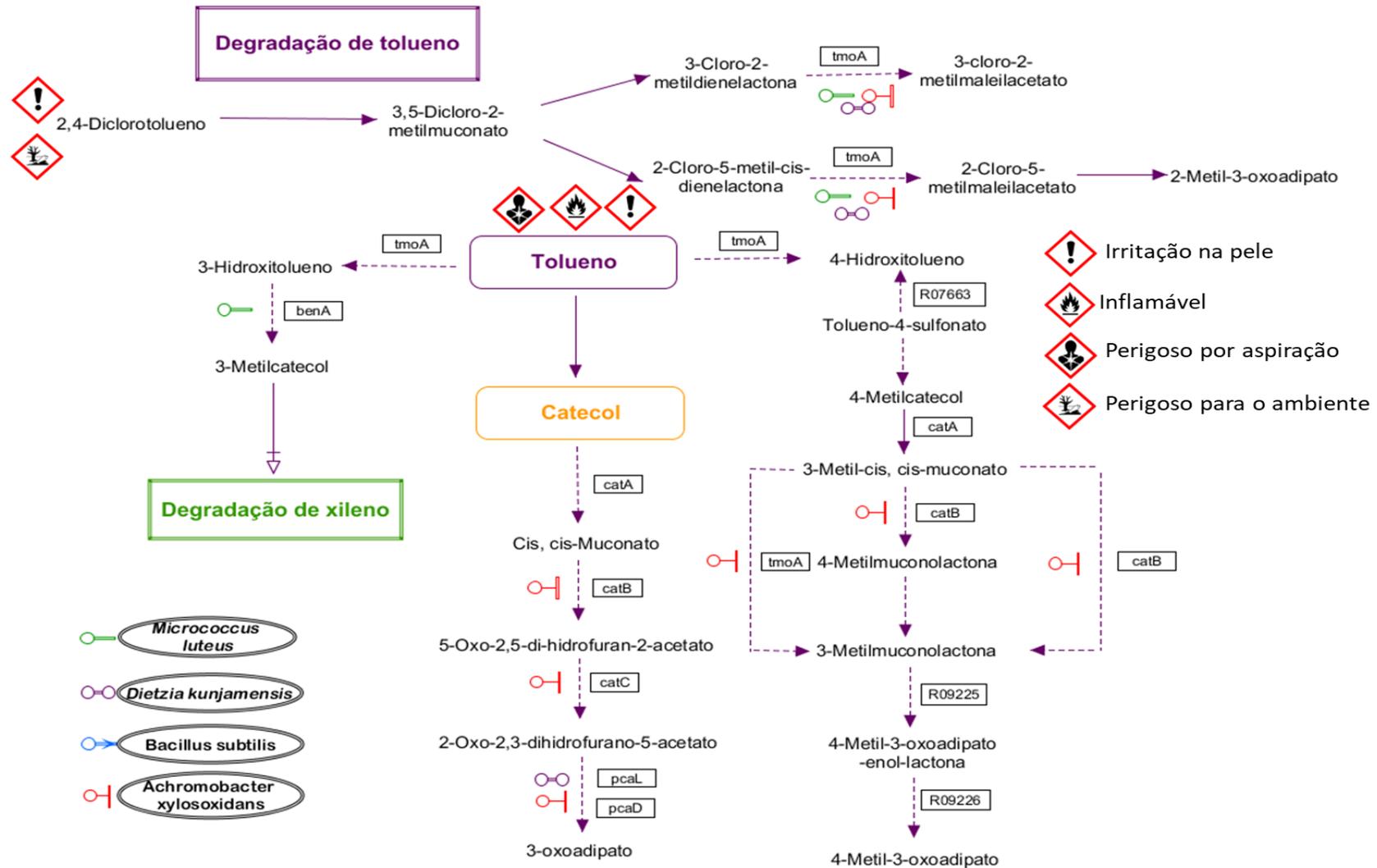


**Anexo 9.7:** Via de degradação do xileno junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.

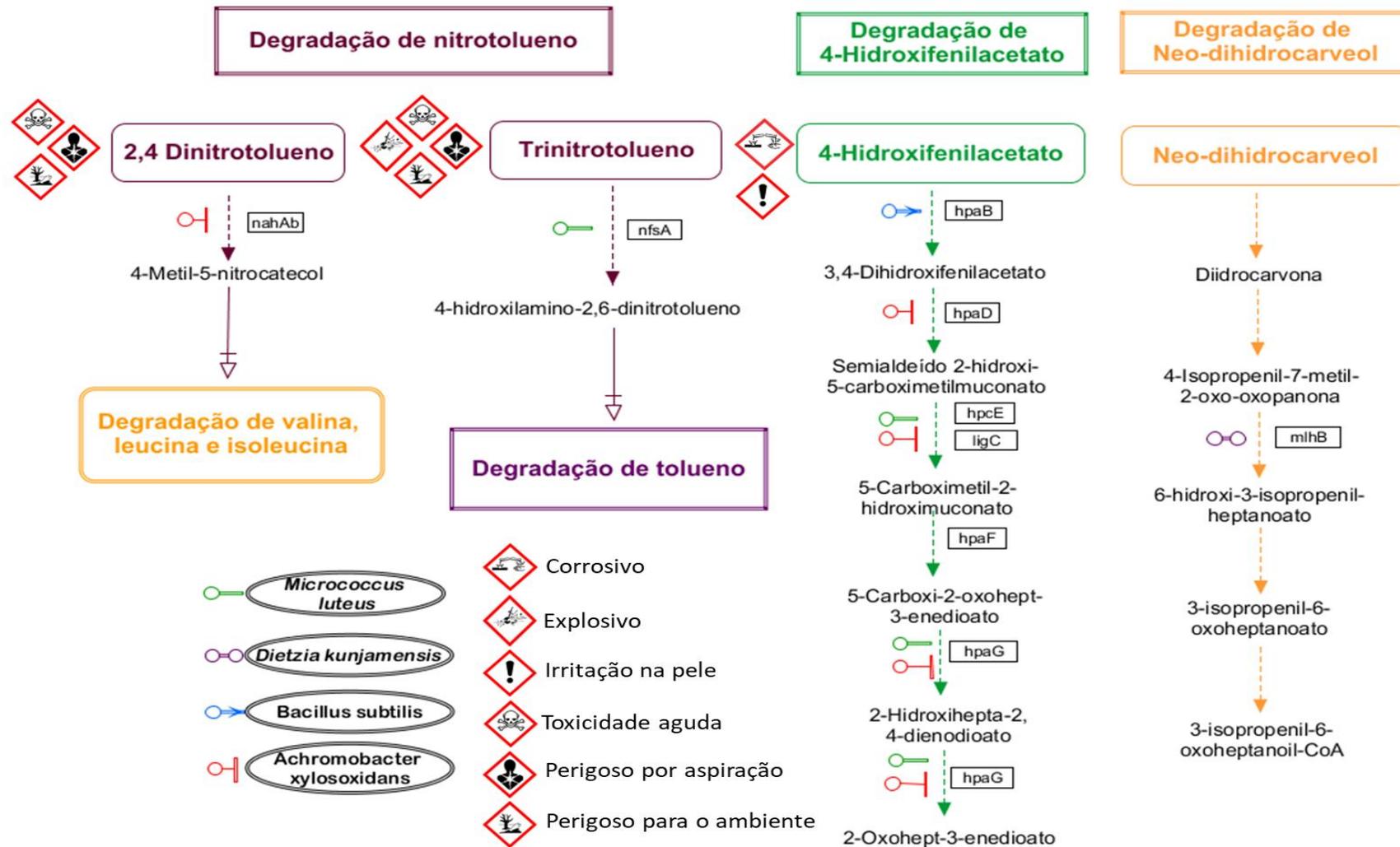
Title: Degradação de xileno



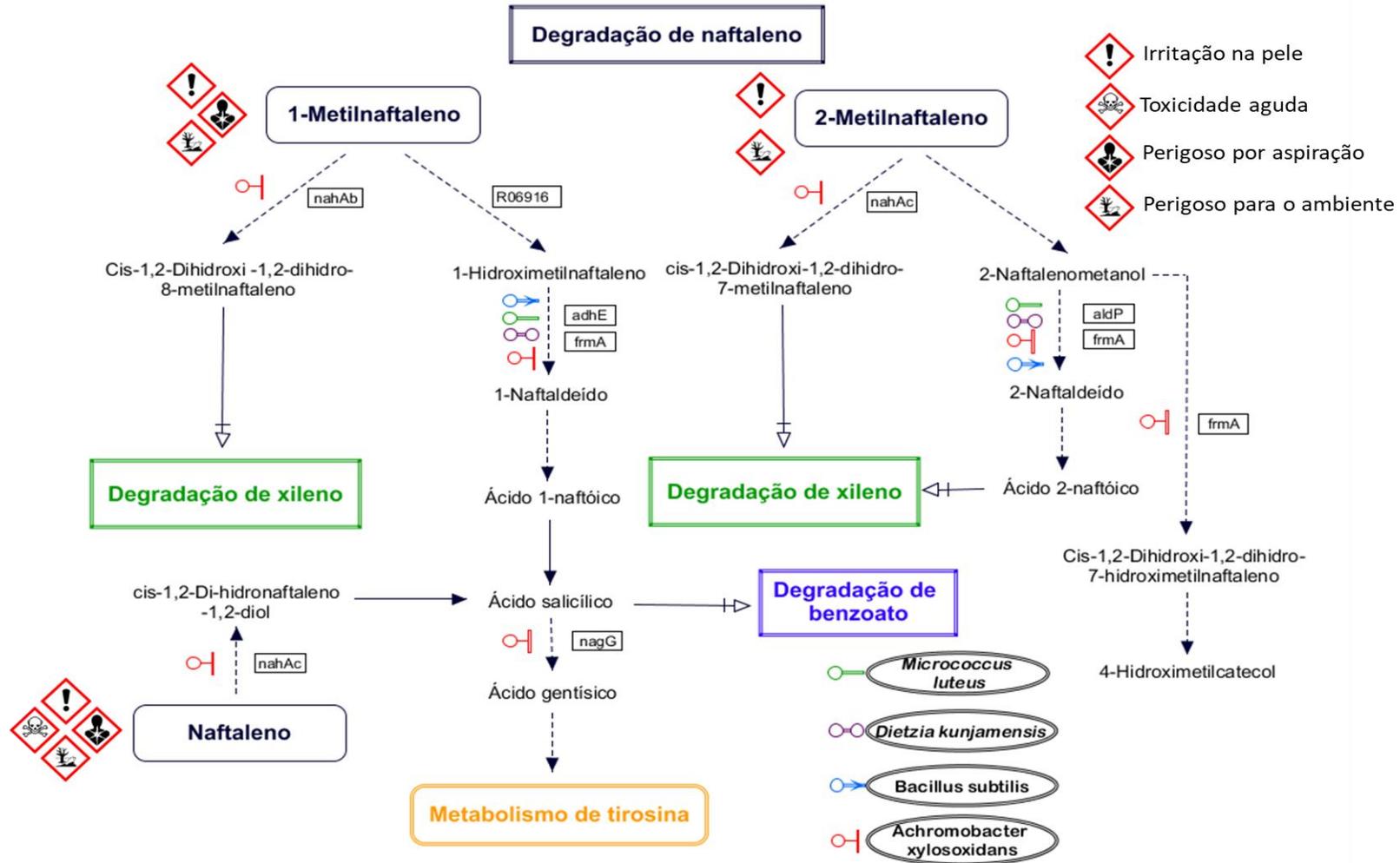
Anexo 9.8: Via de degradação do tolueno junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.



**Anexo 9.9:** Via de degradação do nitrotolueno, 4-hidroxifenilacetato e neo-dihidrocarveol junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.

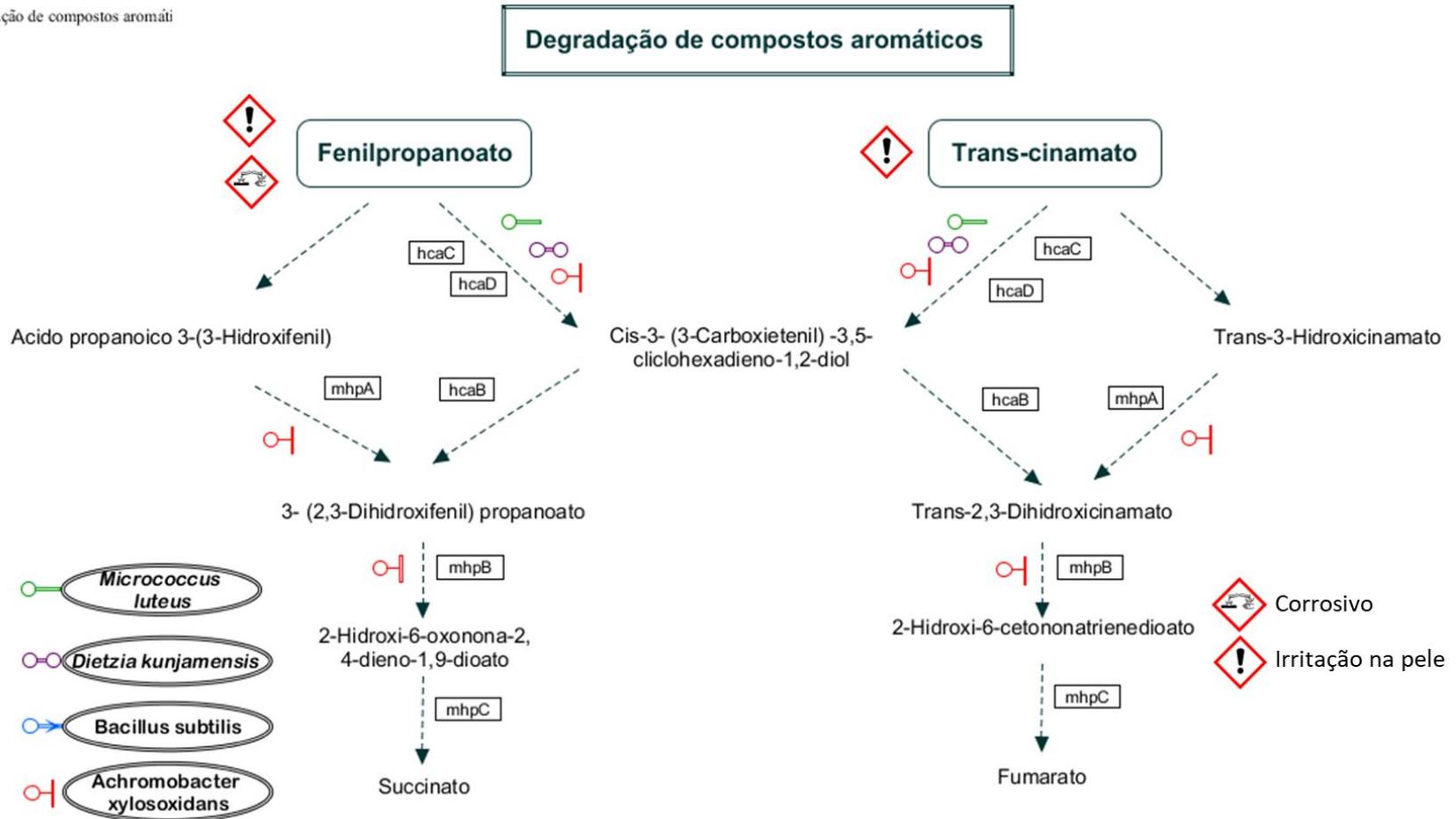


**Anexo 9.10:** Via de degradação do naftaleno junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.



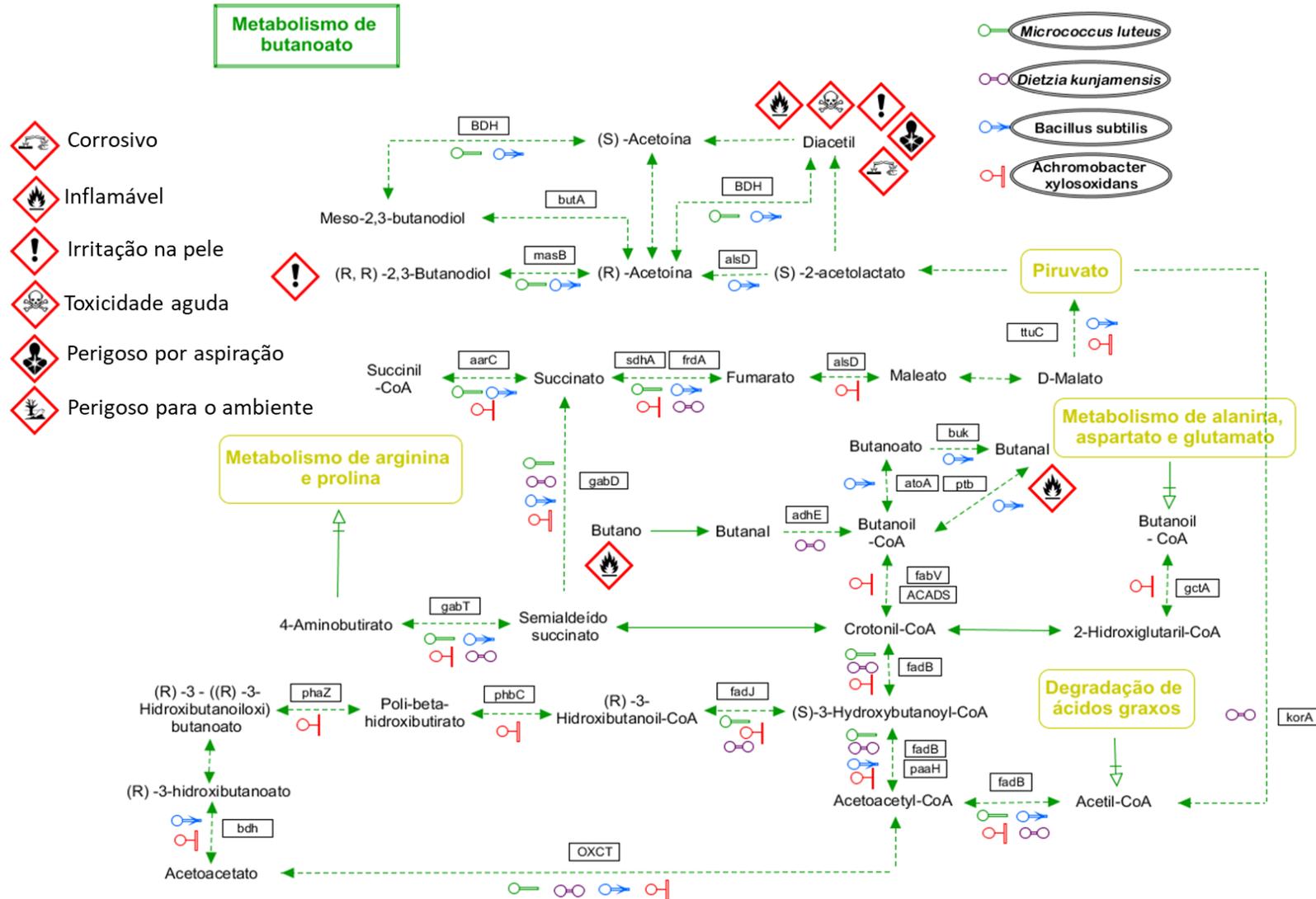
**Anexo 9.11:** Via de degradação de compostos aromáticos junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.

**Title:** Degradação de compostos aromáticos

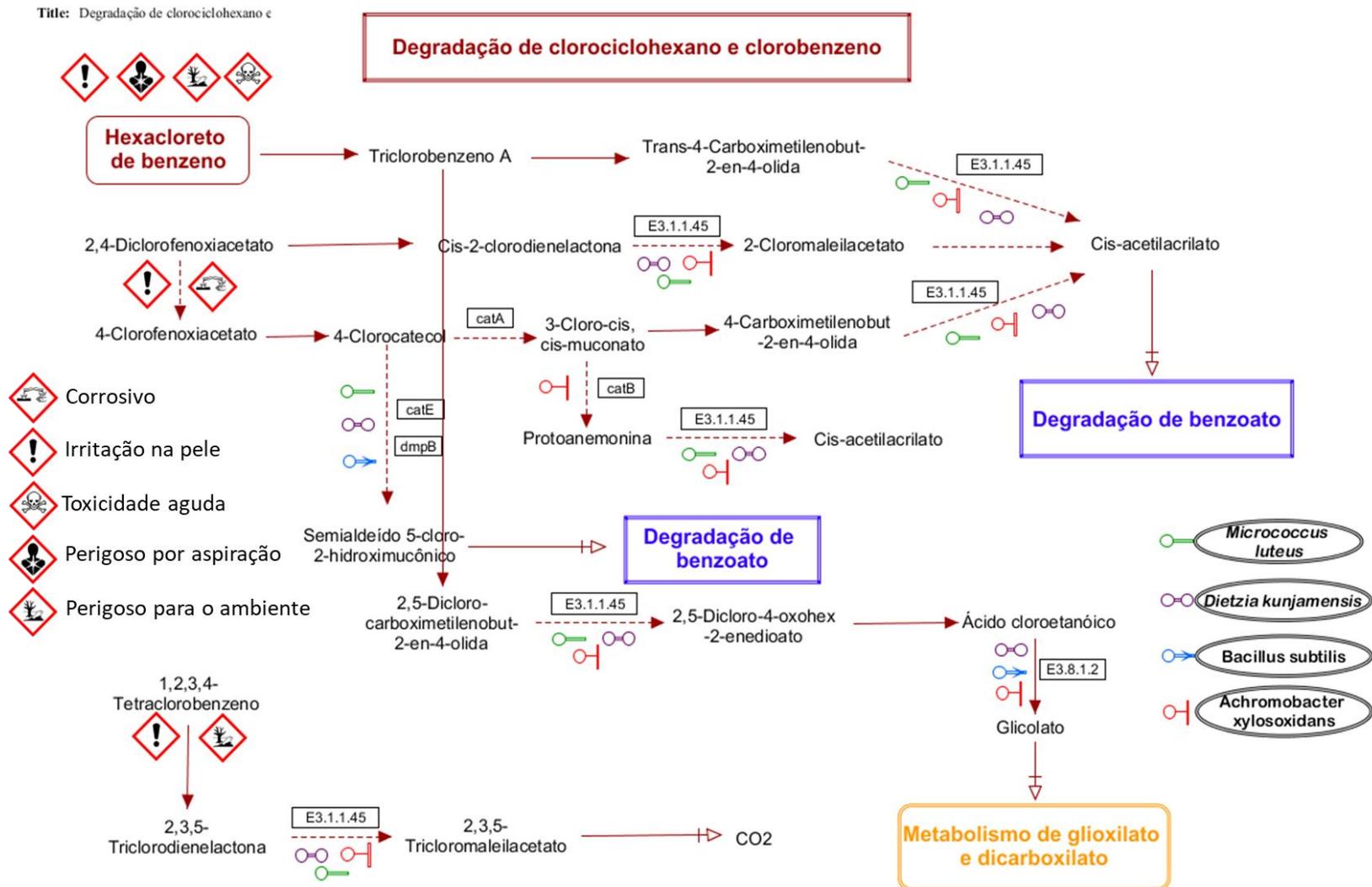




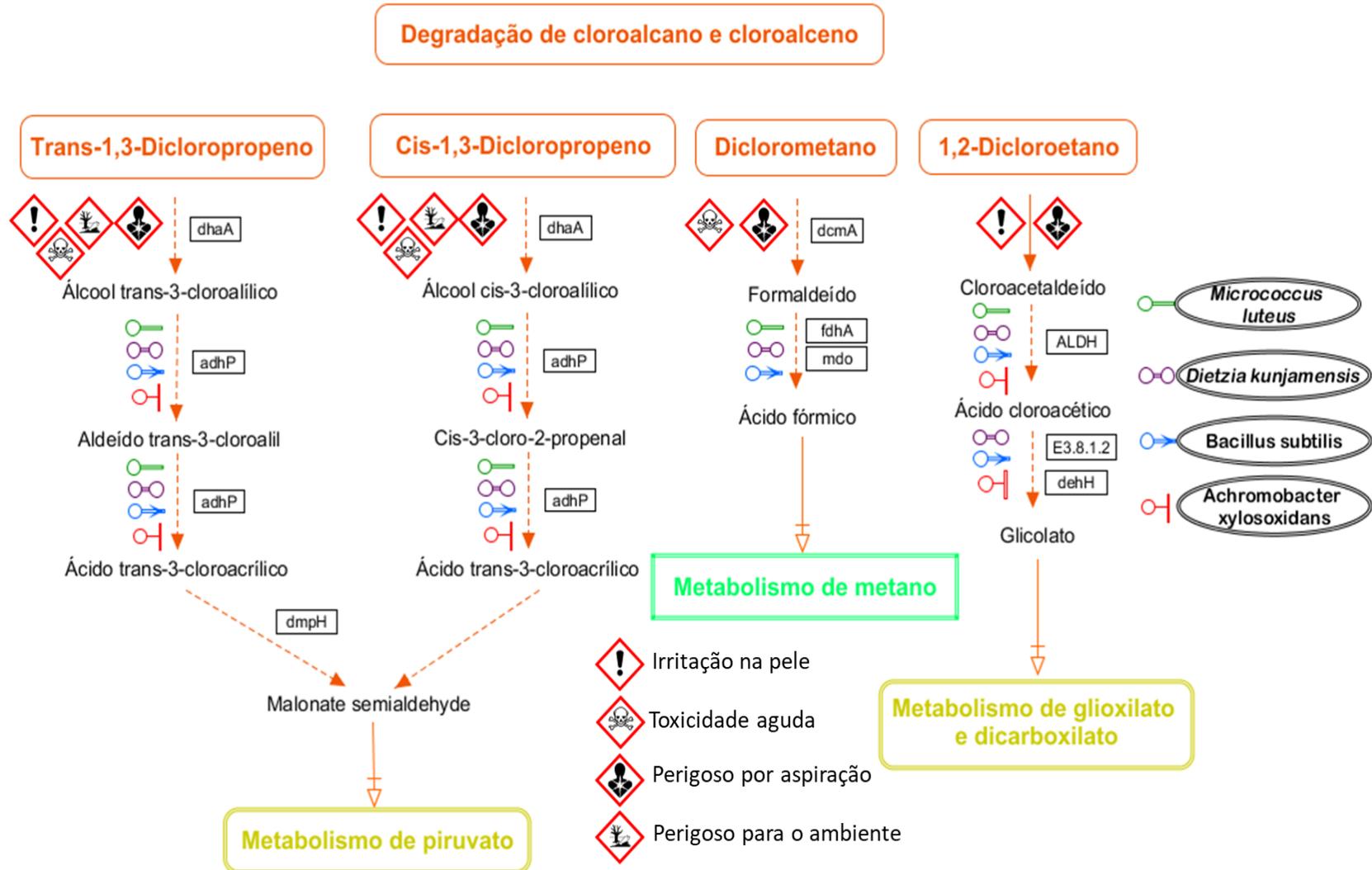
Anexo 9.13: Via do metabolismo de utanoato junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.



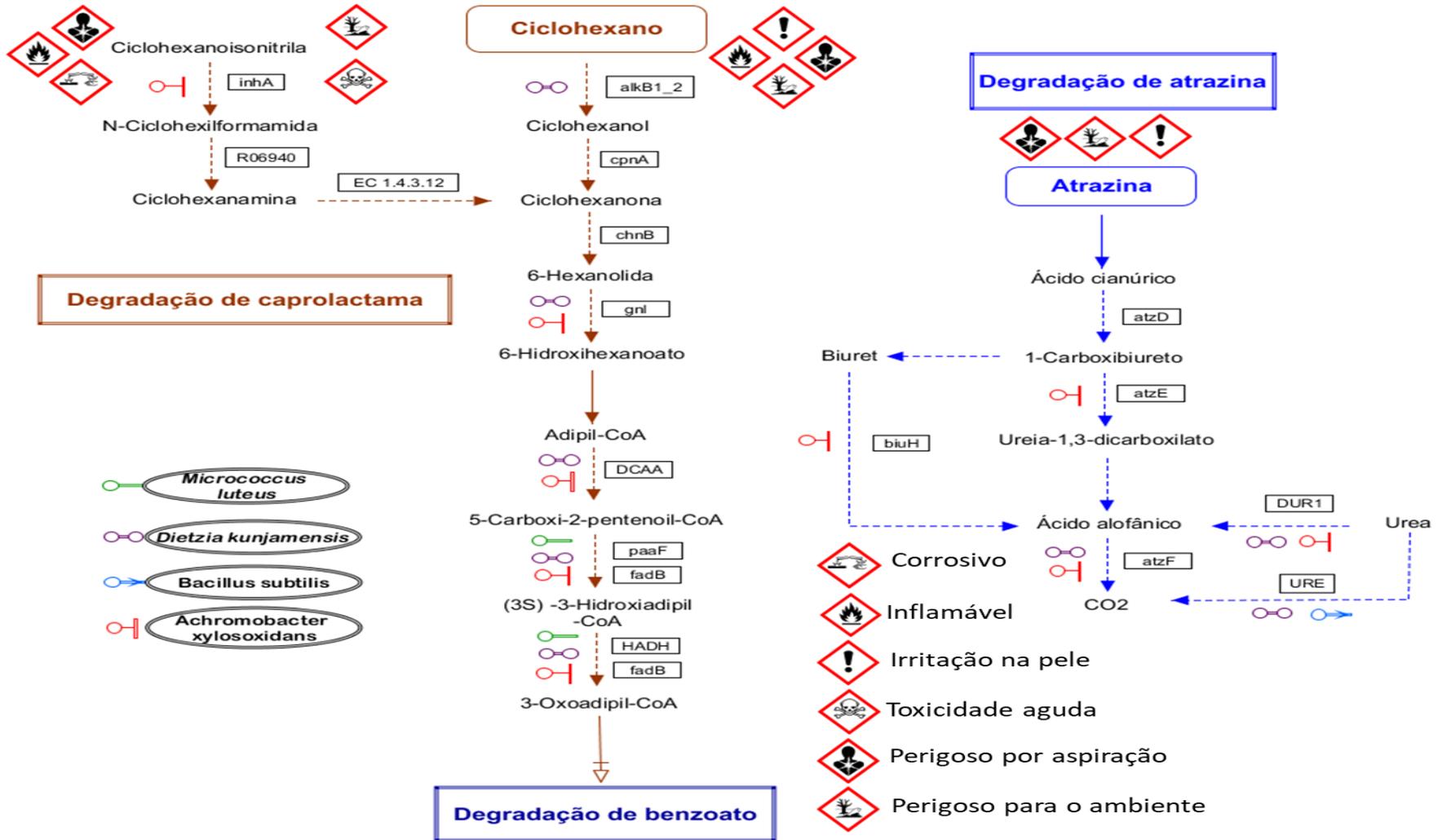
**Anexo 9.14:** Via de degradação do clorociclohexano e clorobenzeno junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.



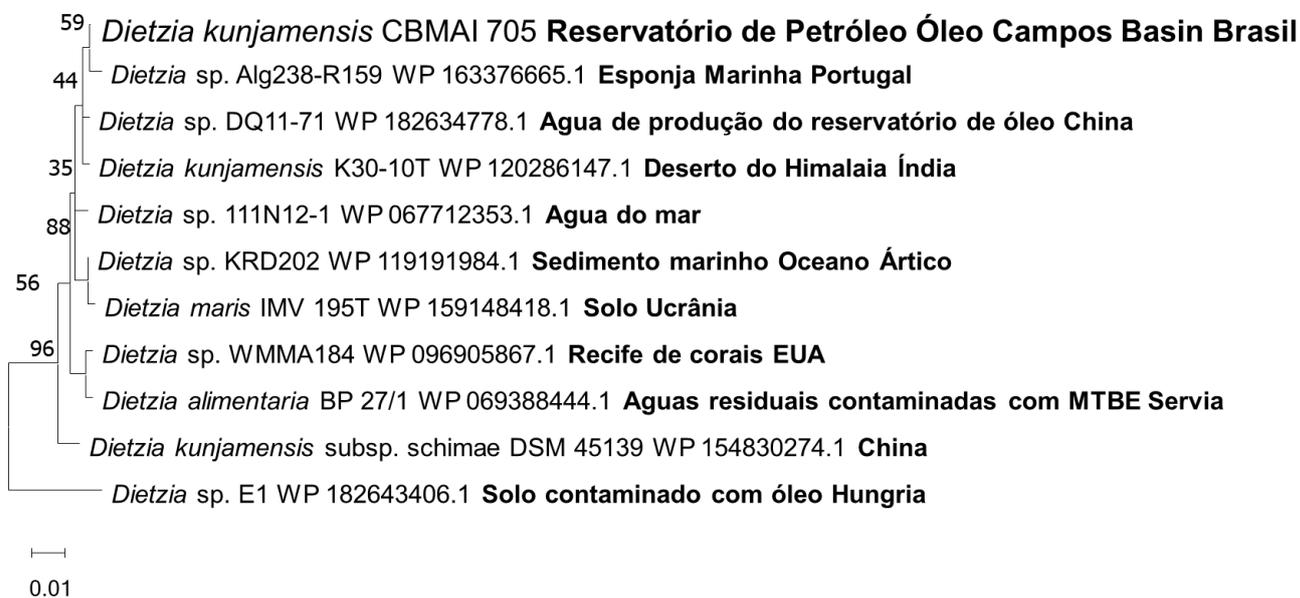
**Anexo 9.15:** Via de degradação de cloroalcano e cloroalceno junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.



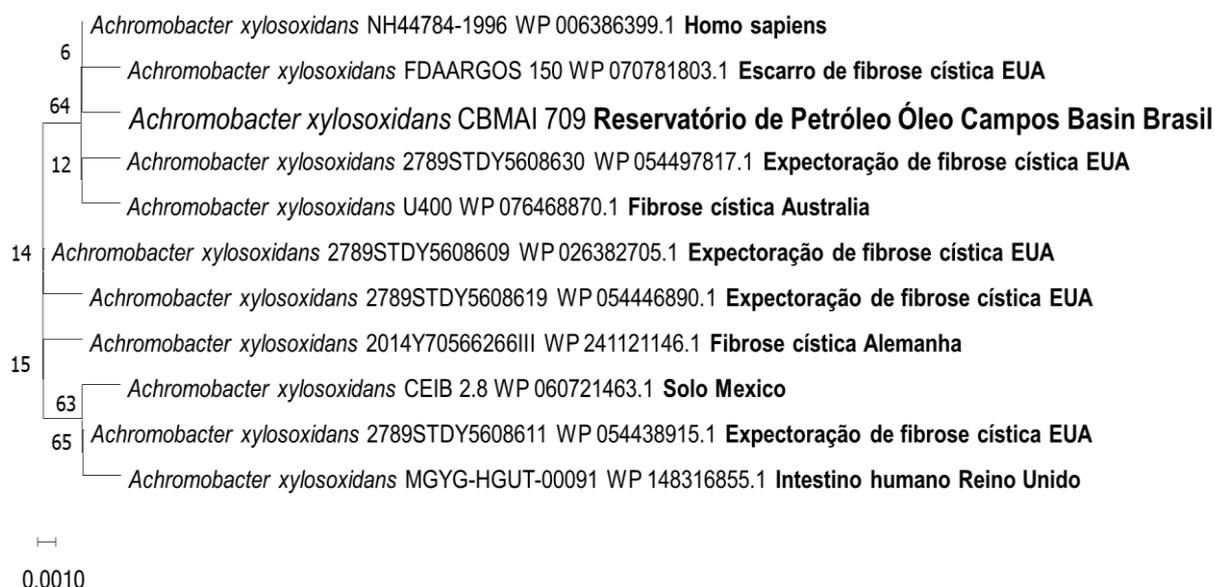
Anexo 9.16: Via de degradação do clohexano junto com a anotação das linhagens avaliadas. A anotação foi feita usando BlastKoala.



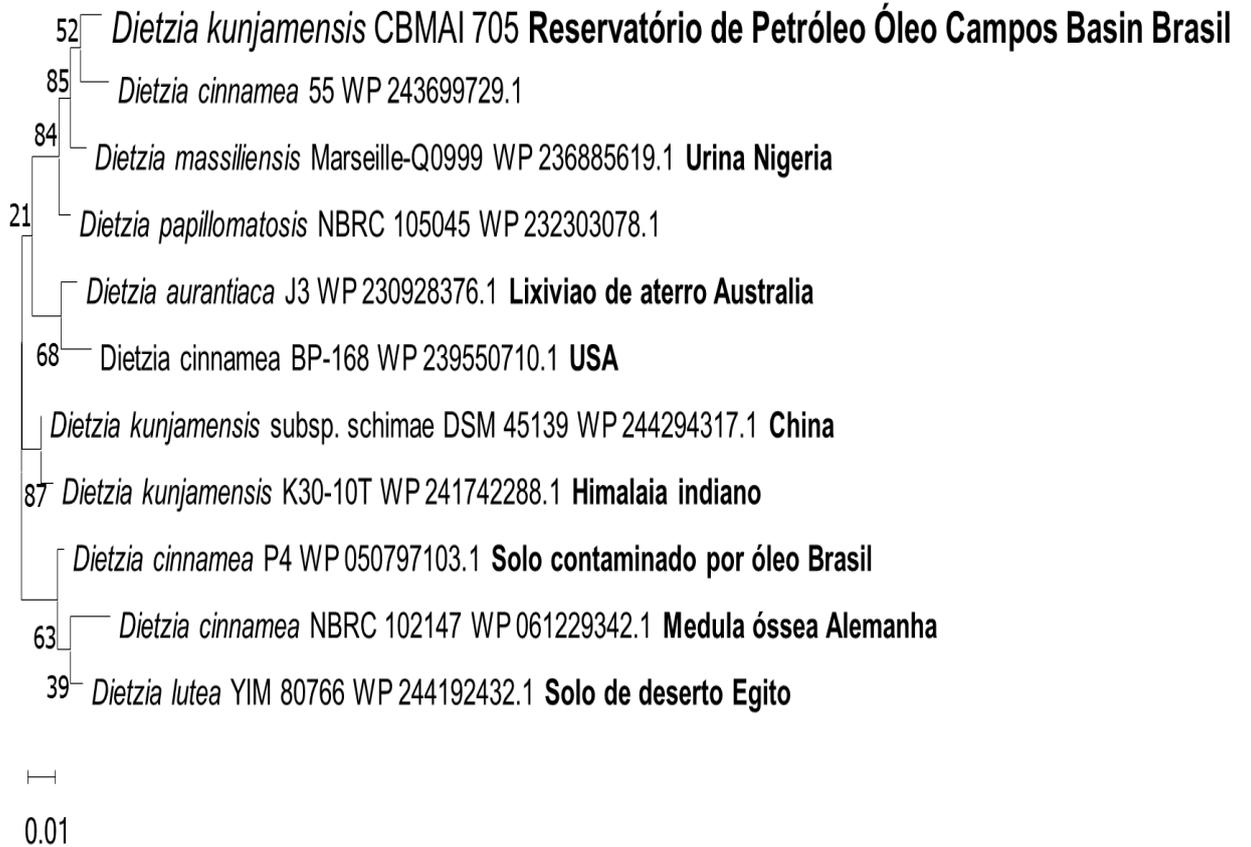
**Anexo 9.17:** Análise filogenética evolutiva do gene K00128 Aldeído desidrogenasa, obtido a partir do genoma de *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo *Jones-Taylor-Thornton*. Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.



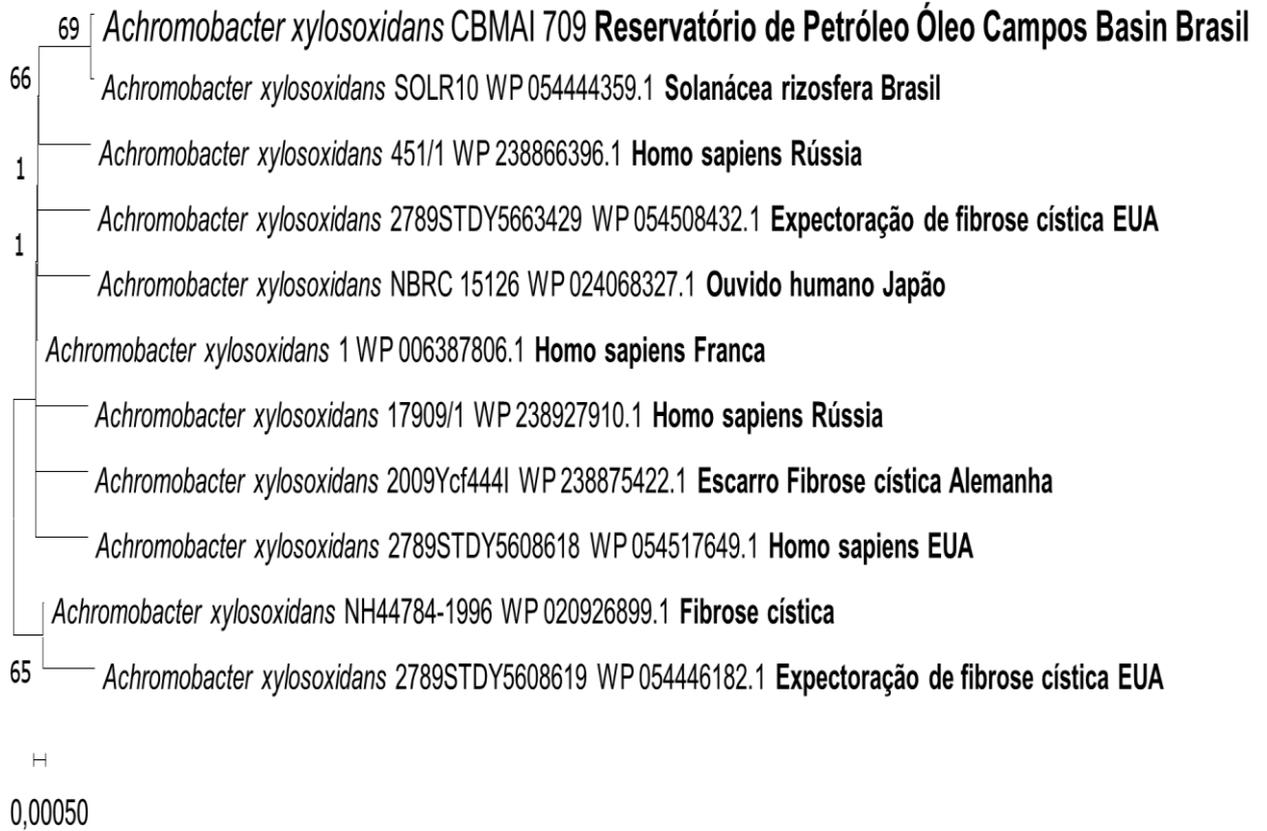
**Anexo 9.18:** Análise filogenética evolutiva do gene K00128 Aldeído desidrogenasa, obtido a partir do genoma de *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo WAG. Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.



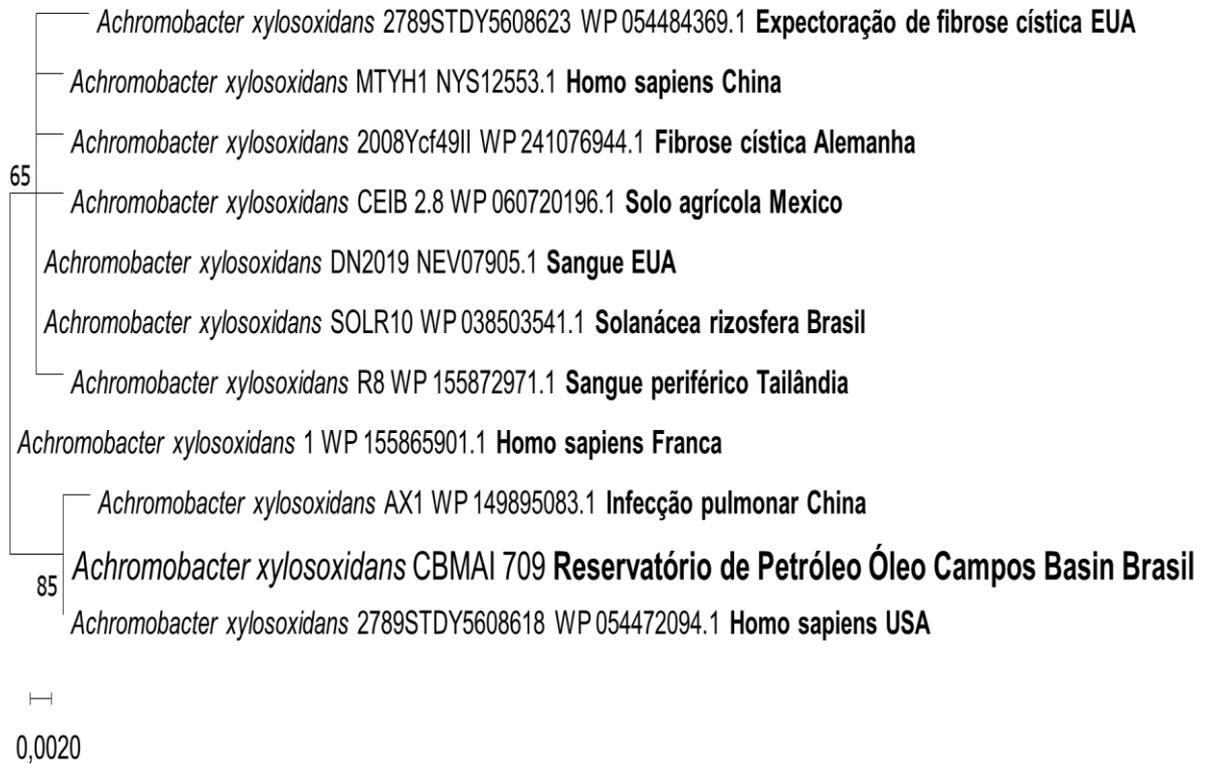
**Anexos 9.19:** Análise filogenética evolutiva do gene K00146 fenilacetaldéido desidrogenase, obtido a partir do genoma de *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo WAG com distribuição Gama. Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.



**Anexo 9.20:** Análise filogenética evolutiva do gene K00146 fenilacetaldéido desidrogenase, obtido a partir do genoma de *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo WAG. Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.



**Anexo 9.21:** Análise filogenética evolutiva do gene K00529 oxidorreductase dependente de FAD, obtido a partir do genoma de *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo WAG. Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.



**Anexos 9.22:** Análise filogenética evolutiva do gene K01512 Acilfosfatase, obtido a partir do genoma de *Dietzia kunjomensis* CBMAI 705, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo *Jones-Taylor-Thornton* com distribuição Gama. Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.



**Anexos 9.23:** Análise filogenética evolutiva do gene K01512 Acilfosfatase, obtido a partir do genoma de *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo *Jones-Taylor-Thornton*. Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.



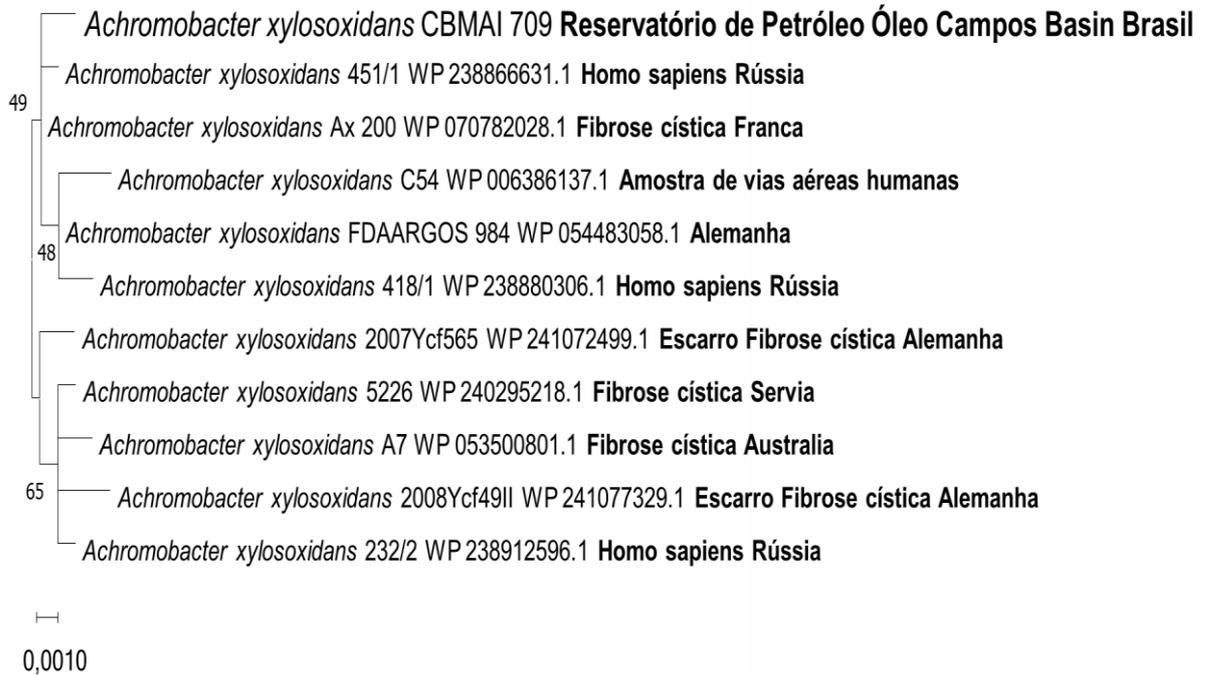
**Anexo 9.24:** Análise filogenética evolutiva do gene K01908 Propionate--CoA ligase, obtido a partir do genoma de *Dietzia kunjamenis* CBMAI 705, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo WAG com distribuição Gama. Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.



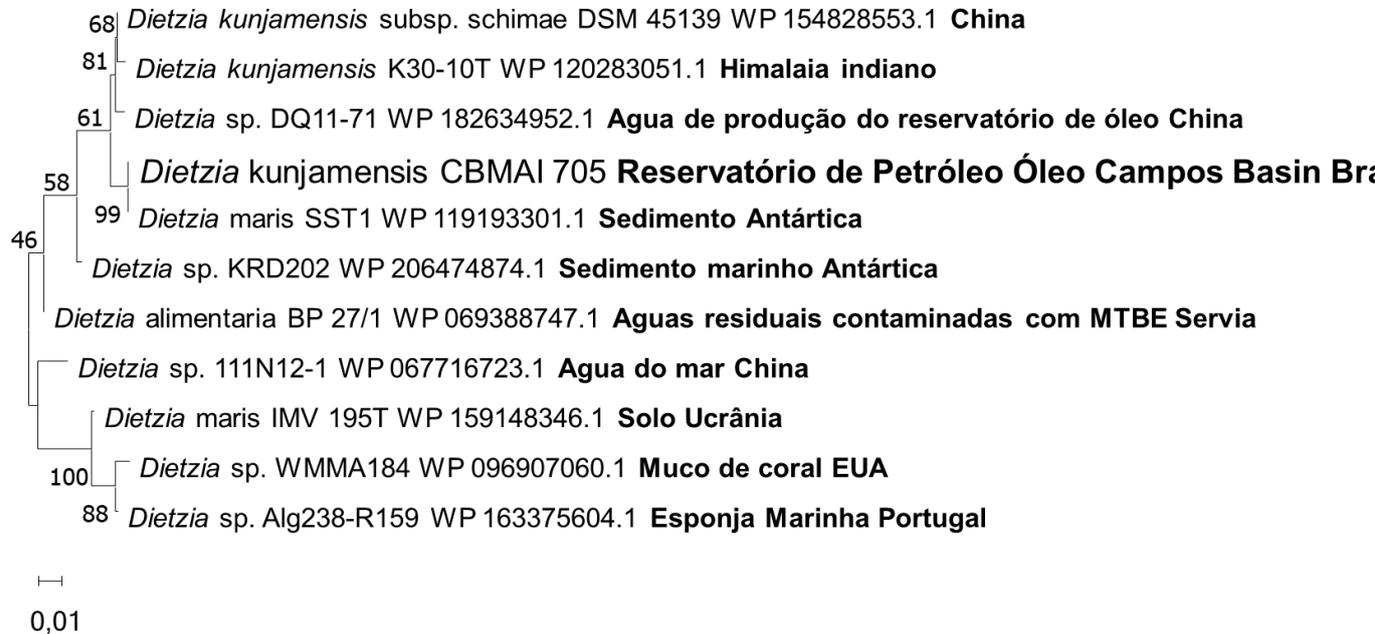
**Anexo 9.25:** Análise filogenética evolutiva do gene K01908 Propionate--CoA ligase, obtido a partir do genoma de *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo WAG. Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.



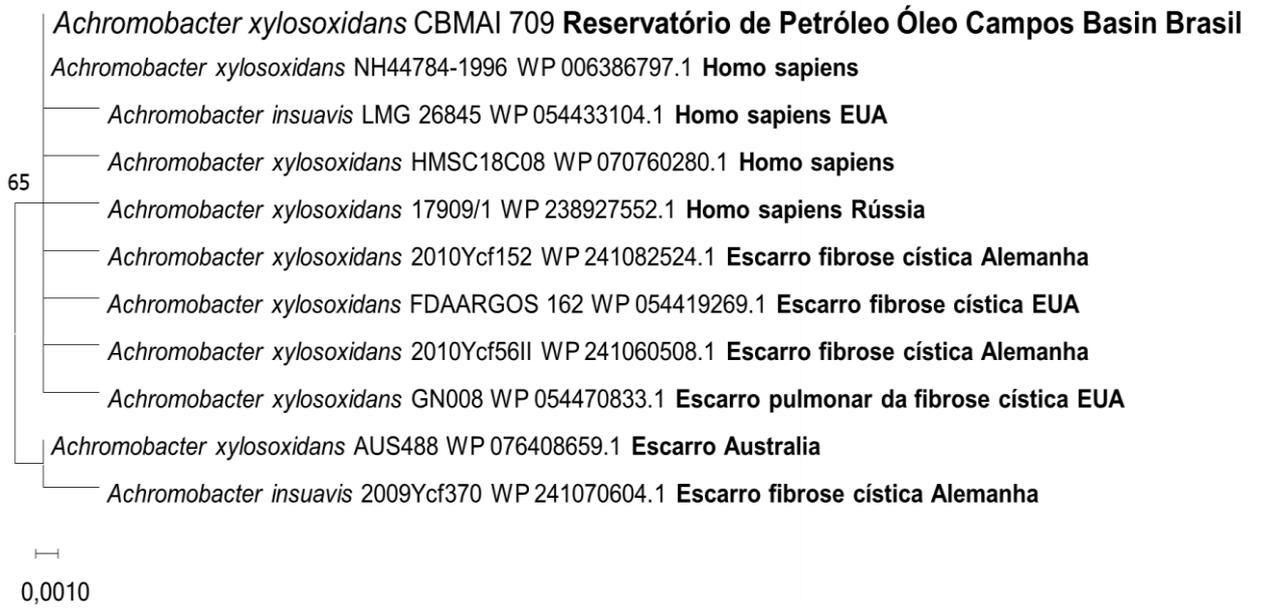
**Anexo 9.26:** Análise filogenética evolutiva do gene K01941 Urea carboxylase, obtido a partir do genoma de *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo WAG. Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.



**Anexo 9.27:** Análise filogenética evolutiva do gene K06446 Acil-CoA desidrogenase, obtido a partir do genoma de *Dietzia kunjamenis* CBMAI 705, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo *Jones-Taylor-Thornton*. Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.



**Anexo 9.28:** Análise filogenética do gene K06446 Acil-CoA desidrogenase, obtido a partir do genoma de *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709, utilizando o método estatístico de máxima verossimilhança e o modelo *Jones-Taylor-Thornton*. Valores de bootstrap (1.000 repetições, mostradas como %) maiores que 70% são mostrados. Os números de acesso do GenBank são mostrados em parênteses após o nome das espécies.



**Anexo 9.29:** Vias e genes de degradação de hidrocarbonetos únicos (sem participar em outras vias metabólicas) que foram encontrados na anotação funcional de *Dietzia kunjamensis* CBMAI 705 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709.

<i>Gene</i>	<i>ID</i>	<i>Nome KEGG</i>	<i>Vias de degradação</i>
K00529	hcaD	Componente ferredoxina redutase de 3-fenilpropionato/trans-cinamato dioxigenase [EC:1.18.1.3]	Degradação de compostos aromáticos
K01055	pcaD	3-Oxoadipato enol-lactonase [EC:3.1.1.24]	Degradação de compostos aromáticos, Degradação de benzoato
K01821	praC, xylH	4-Oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]	Degradação de compostos aromáticos, Degradação de benzoato, Degradação de xileno, Degradação de dioxina
K02554	mhpD	2-ceto-4-pentenoato hidratase [EC:4.2.1.80]	Degradação de compostos aromáticos, Degradação de benzoato, Degradação de xileno, Degradação de dioxina
K13953	K13953	Álcool desidrogenase, preferindo propanol [EC:1.1.1.1]	Degradação de compostos aromáticos, Degradação de cloroalcano e cloroalcano, Degradação de naftaleno, Metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450
K00016	LDH, ldh	L-lactato desidrogenase [EC:1.1.1.27]	Metabolismo de propanoato
K00140	mmsA, iolA, ALDH6A1	Malonato-semialdeído desidrogenase (acetilação) / metilmalonato-semialdeído desidrogenase [EC:1.2.1.18 1.2.1.27]	Metabolismo de propanoato
K00382	DLD, lpd, pdhD	Dihidrolipoamida desidrogenase [EC:1.8.1.4]	Metabolismo de propanoato
K00626	ACAT, atoB	Acetil-CoA C-acetiltransferase [EC:2.3.1.9]	Metabolismo do propanoato, Metabolismo do butanoato, Degradação do benzoato
K00823	puuE	4-Aminobutirato aminotransferase [EC:2.6.1.19]	Metabolismo do propanoato, Metabolismo do butanoato
K00925	ackA	Acetato quinase [EC:2.7.2.1]	Metabolismo de propanoato
K01692	paaF, echA	Enoil-CoA hidratase [EC:4.2.1.17]	Metabolismo do propanoato, Metabolismo do butanoato, Degradação do benzoato,

		Degradação da caprolactama, Degradação do aminobenzoato
<i>K01782</i>	fadJ	3-hidroxiacil-CoA desidrogenase / enoil-CoA hidratase / 3-hidroxi-butiril-CoA epimerase [EC:1.1.1.35 4.2.1.17 5.1.2.3]
		Metabolismo do propanoato, Metabolismo do butanoato, Degradação do benzoato, Degradação da caprolactama
<i>K01895</i>	ACSS1_2, acs	Acetil-CoA sintetase [EC:6.2.1.1]
		Metabolismo de propanoato
<i>K01902</i>	sucD	Subunidade alfa de succinil-CoA sintetase [EC:6.2.1.5]
		Metabolismo de propanoato
<i>K01903</i>	sucC	Subunidade beta de succinil-CoA sintetase [EC:6.2.1.5]
		Metabolismo de propanoato
<i>K01908</i>	ACSS3, prpE	Propionil-CoA sintetase [EC:6.2.1.17]
		Metabolismo de propanoato
<i>K02160</i>	accB, bccP	Proteína transportadora de acetil-CoA carboxilase biotina carboxila
		Metabolismo de propanoato
<i>K00074</i>	paaH, hbd, fadB, mmgB	3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase [EC:1.1.1.157]
		Metabolismo de butanoato, Degradação de benzoato
<i>K00135</i>	gabD	Succinato-semialdeído desidrogenase / glutamato-semialdeído desidrogenase [EC:1.2.1.16 1.2.1.79 1.2.1.20]
		Metabolismo de butanoato
<i>K00239</i>	sdhA, frdA	Succinato desidrogenase/fumarato redutase, subunidade flavoproteína [EC:1.3.5.1 1.3.5.4]
		Metabolismo de butanoato
<i>K00240</i>	sdhB, frdB	Succinato desidrogenase/fumarato redutase, subunidade ferro-enxofre [EC:1.3.5.1 1.3.5.4]
		Metabolismo de butanoato
<i>K00241</i>	sdhC, frdC	Succinato desidrogenase / fumarato redutase, subunidade citocromo B
		Metabolismo de butanoato
<i>K00242</i>	sdhD, frdD	Succinato desidrogenase / fumarato redutase, subunidade de âncora de membrana
		Metabolismo de butanoato

<i>K01028</i>	E2.8.3.5A, scoA	3-Oxoácido CoA-transferase subunidade A [EC:2.8.3.5]	Metabolismo de butanoato
<i>K01029</i>	E2.8.3.5B, scoB	3-Oxoácido CoA-transferase subunidade B [EC:2.8.3.5]	Metabolismo de butanoato
<i>K01652</i>	E2.2.1.6L, ilvB, ilvG, ilvI	Subunidade grande de acetolactato sintase I/II/III [EC:2.2.1.6]	Metabolismo de butanoato
<i>K01653</i>	E2.2.1.6S, ilvH, ilvN	Subunidade pequena de acetolactato sintase I/III [EC:2.2.1.6]	Metabolismo de butanoato
<i>K18118</i>	aarC, catI	Succinil-CoA:acetato CoA- transferase [EC:2.8.3.18]	Metabolismo de butanoato
<i>K00632</i>	fadA, fadI	Acetil-CoA aciltransferase [EC:2.3.1.16]	Degradação de benzoato, Degradação de etilbenzeno
<i>K01426</i>	E3.5.1.4, amiE	Amidase [EC:3.5.1.4]	Degradação de aminobenzoato, Degradação de estireno
<i>K01512</i>	acyP	Acil fosfatase [EC:3.6.1.7]	Degradação de aminobenzoato
<i>K01061</i>	E3.1.1.45	Carboximetilenobutenolidase [EC:3.1.1.45]	Degradação de fluorobenzoato, degradação de clorociclohexano e clorobenzeno, degradação de tolueno
<i>K00128</i>	ALDH	Aldeído desidrogenase (NAD <sup>+</sup> ) [EC:1.2.1.3]	Degradação de cloroalcano e cloroalceno
<i>K01560</i>	E3.8.1.2	2-Haloácido dehalogenase [EC:3.8.1.2]	Degradação de cloroalcano e cloroalceno, Degradação de clorociclohexano e clorobenzeno
<i>K00146</i>	feaB	Fenilacetaldeído desidrogenase [EC:1.2.1.39]	Degradação de estireno
<i>K01457</i>	atzF	Alofanato hidrolase [EC:3.5.1.54]	Degradação de atrazina
<i>K01941</i>	E6.3.4.6	Ureia carboxilase [EC:6.3.4.6]	Degradação de atrazina
<i>K06446</i>	DCAA	Acil-CoA desidrogenase [EC:1.3.99.-]	Degradação da caprolactama

**Anexo 9.30:** Vias, genes de degradação de Hidrocarbonetos de Carbono e porcentagem de similaridade que foram encontrados na anotação funcional de *Dietzia kunjamenis* CBMAI 705 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709 usando Blastx.

	<i>Linhagens para CBMAI 705</i>	<i>Porcentagem de similaridade</i>	<i>Linhagens para CBMAI 709</i>	<i>Porcentagem de similaridade</i>
K00529	Dietzia sp. UCD-THP	95,19	Achromobacter xylosoxidans SOLR10	99,26
	Dietzia MeA6-2017	87,59	Achromobacter ruhlandii LMG 3328	96,07
	Dietzia kunjamenis subsp. schimae DSM 45139	87,34	Achromobacter dolens LMG 26841	94,84
	Hoyosella subflava DQS3-9A1	81,61	Achromobacter pulmonis LMG 26788	93,15
	Gordonia sp. YC-JH1	80,99	Achromobacter marplatensis B2	76,53
	Antrihabitans sp. YC3-6	80,92	Achromobacter anxifer LMG 26857	75,49
	Nocardia africana NBRC 100379	80,86	Achromobacter spanius LMG 5911	74,57
	Mycobacterium immunogenum CCUG 47286T	79,49	Achromobacter aegrifaciens LMG 26854	74,26
	Tomitella biformata DSM 45403	78,95	Achromobacter pestifer LMG 3431	73,9
	Rhodococcus fascians D188	78,7	Achromobacter kerstersii ATCC 31444	67,1
K01908	Dietzia maris IMV 195T	99,22	Achromobacter xylosoxidans GAD3	99,52
	Dietzia kunjamenis subsp. schimae DSM 45139	98,12	Achromobacter dolens LMG 26841	98,41
	Dietzia lutea YIM 80766	91,5	Achromobacter ruhlandii LMG 1866	98,41
	Dietzia cinnamea NBRC 102147	90,72	Achromobacter insuavis LMG 26846	98,25

K18118	Dietzia cercidiphylli YIM 65002T	90,71	Achromobacter pulmonis LMG 26788	96,66
	Dietzia psychralcaliphila ILA-1	90,45	Achromobacter deleyi LMG 3458	96,18
	Dietzia alimentaria 72	89,83	Achromobacter pestifer LMG 3431	94,75
	Dietzia natronolimnaea S-XJ-1	88,36	Achromobacter kerstersii LMG 3441	94,44
	Dietzia aerolata Sj14aT	86,5	Achromobacter marplatensis LMG 26219	94,44
	Dietzia timorensis ID05-A0528	86,01	Achromobacter spanius LMG 5911	94,28
	Dietzia maris SST1	100	Dietzia maris SST1	100
	Dietzia kunjamensis subsp. schimae DSM 45139	99,03	Dietzia kunjamensis subsp. schimae DSM 45139	99,03
	Dietzia alimentaria 72	86,82	Dietzia alimentaria 72	86,82
	Dietzia cinnamea NBRC 102147	84,66	Dietzia cinnamea NBRC 102147	84,66
	Dietzia aerolata Sj14aT	83,04	Dietzia aerolata Sj14aT	83,04
	Rhodococcus spelaei C9-5	73,25	Rhodococcus spelaei C9-5	73,25
	Gordonia paraffinivorans 3012STDY6756503	73,15	Gordonia paraffinivorans 3012STDY6756503	73,15
	Rhodococcus agglutinans CCTCC AB2014297	72,04	Rhodococcus agglutinans CCTCC AB2014297	72,04
	Rhodococcus globerulus NBRC 14531	71,98	Rhodococcus globerulus NBRC 14531	71,98
	Rhodococcus erythropolis R138	71,98	Rhodococcus erythropolis R138	71,98

K01512	Dietzia kunjamenis subsp. schimae YIM 65001T	95,83	Achromobacter xylooxidans NH44784-1996	100
	Dietzia maris IMV 195T	95,83	Achromobacter dolens LMG 26840	98,94
	Dietzia lutea YIM 80766	87,5	Achromobacter ruhlandii LMG 1866	97,87
	Dietzia sp. Marseille- Q0999	86,46	Achromobacter insuavis LMG 26845	97,87
	Dietzia aerolata Sj14aT	83,72	Achromobacter pulmonis LMG 26788	95,74
	Dietzia alimentaria 72	82,29	Achromobacter deleyi LMG 3458	93,48
	Dietzia psychralcaliphila ILA-1	81,11	Achromobacter mucicolens LMG 3415	89,13
	Dietzia sp. B19	80,68	Achromobacter animicus LMG 26690	89,13
	Nocardia camponoti CGMCC 4.7278	80	Achromobacter arsenitoxydans SY8	89,13
	Dietzia natronolimnaea S-XJ-1	79,17	Achromobacter denitrificans NBRC 15125	88,04
K00128	Dietzia maris IMV 195	99,69	Achromobacter xylooxidans GN050	99,8
	Dietzia maris IMV 195T	99,6	Achromobacter ruhlandii LMG 3328	99,4
	Dietzia kunjamenis subsp. schimae DSM 45139	98,8	Achromobacter ruhlandii LMG 1866	99,2
	Dietzia kunjamenis DSM 45139	98,14	Achromobacter insuavis LMG 26845	98,8
	Dietzia lutea YIM 80766	92,8	Achromobacter pulmonis LMG 26788	97,6
	Dietzia natronolimnaea S-XJ-1	90,37	Achromobacter deleyi LMG 3458	96,6

	Dietzia sp. Cai40	89,13	Achromobacter mucicolens LMG 3415	95,8
	Dietzia psychralcaliphila ILA-1	88,82	Achromobacter animicus LMG 26691	95,6
	Dietzia lutea YIM 80766	88,2	Achromobacter denitrificans NBRC 15125	95,4
	Dietzia aerolata Sj14aT	87,58	Achromobacter agilis LMG 3411	95,2
K01941	Dietzia kunjamensis subsp. schimae DSM 45139	97,42	Achromobacter xylooxidans HMSC056C09	99,83
	Dietzia cinnamea NBRC 102147	92,27	Achromobacter ruhlandii LMG 3328	97,85
	Dietzia cercidiphylli YIM 65002T	92,12	Achromobacter dolens LMG 26841	97,69
	Dietzia psychralcaliphila ILA-1	91,82	Achromobacter insuavis LMG 26846	97,27
	Dietzia lutea YIM 80766]	91,67	Achromobacter pulmonis LMG 26788	96,2
	Dietzia natronolimnaea S-XJ-1	91,21	Achromobacter deleyi LMG 3458	92,48
	Mycobacterium fortunisiensis TNTM28	69,6	Achromobacter marplatensis LMG 26219	91,91
	Mycolicibacterium alvei JCM 12272	69,15	Achromobacter kerstersii ATCC 31444	91,59
	Mycolicibacterium setense Manresensis	69,04	Achromobacter pestifer LMG 3431	91,43
	Tsukamurella asaccharolytica HKU71	69,04	Achromobacter animicus LMG 26691	91,07
K06446	Dietzia natronolimnaea S-XJ-1	85,79	Achromobacter xylooxidans NH44784-1996	100
	Dietzia sp. CQ4	85,68	Achromobacter insuavis LMG 26845	99,74

Dietzia kunjamensis subsp. schimae DSM 45139	85,1	Achromobacter pulmonis LMG 26696	98,95
[Dietzia lutea YIM 80766	85,06	Achromobacter anxifer LMG 26858	96,34
Dietzia psychralcaliphila ILA-1	84,79	Achromobacter spanius LMG 5911	96,34
Dietzia cinnamea NBRC 102147	84,74	Achromobacter deleyi LMG 3458	96,33
Amycolatopsis dendrobii DR6-1	84,74	Achromobacter agilis LMG 3411	96,07
Dietzia aerolata Sjl14aT	84,74	Achromobacter aegrifaciens LMG 26854	96,07
Dietzia maris SST1	83,41	Achromobacter mucicolens LMG 26684	95,81
Amycolatopsis benzoatilytica AK 16/65	82,16	Achromobacter animicus LMG 26691	95,29

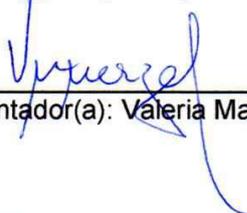
**Anexo 9.31: Declaração de Bioética e Biossegurança**

COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
Universidade Estadual de Campinas  
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil  
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br

**DECLARAÇÃO**

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "**GENÔMICA FUNCIONAL DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO**", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura:   
Nome do(a) aluno(a): Angie Alejandra Calderon Fajardo

Assinatura:   
Nome do(a) orientador(a): Valeria Maia Merzel

Data: 24/11/2022

**Anexo 9.32: Declaração direitos autorais****Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **GENÔMICA FUNCIONAL DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 25 de novembro de 2022

Assinatura : \_\_\_\_\_

Nome do(a) autor(a): **Angie Alejandra Calderon Fajardo**  
RG n.º F152256-K

Assinatura : \_\_\_\_\_

Nome do(a) orientador(a): **Valeria Maia Merzel**  
RG n.º 12573419-0