

6º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS



TÍTULO DO TRABALHO:

Estratégia para detecção e avaliação microbiana com potencial para degradar Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP's)

AUTORES:

*Bruno G. de Sousa, #Ciáxares M. Carvalho, ¹Paulo S. M. Lucio, ²Umberto L. Fulco, ¹Carlos A. G. Blaha

INSTITUIÇÃO:

1LBMP-DBG/UFRN, 2DBF-CB/UFRN, *PPg-CB/UFRN, #PPg-CEP/UFRN
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN – Brasil

Este Trabalho foi preparado para apresentação no 6º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás- 6º PDPETRO, realizado pela Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás-ABPG, no período de 09 a 13 de outubro de 2011, em Florianópolis-SC. Esse Trabalho foi selecionado pelo Comitê Científico do evento para apresentação, seguindo as informações contidas no documento submetido pelo(s) autor(es). O conteúdo do Trabalho, como apresentado, não foi revisado pela ABPG. Os organizadores não irão traduzir ou corrigir os textos recebidos. O material conforme, apresentado, não necessariamente reflete as opiniões da Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás. O(s) autor(es) tem conhecimento e aprovação de que este Trabalho seja publicado nos Anais do 6ºPDPETRO.

Estratégia para detecção e avaliação microbiana com potencial para degradar Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP's)

Abstract

Knowledge of the native prokaryotes in hazardous locations favors the application of biotechnology for bioremediation. Independent strategies for cultivation and metagenomics contribute to further microbiological knowledge, enabling studies with non-cultivable about the "native microbiological status" and its potential role in bioremediation, for example, of polycyclic aromatic hydrocarbons (HPA's). Considering the biome mangrove interface fragile and critical bordering the ocean, this study characterizes the native microbiota mangrove potential biodegradability of HPA's using a biomarker for molecular detection and assessment of bacterial diversity by PCR in areas under the influence of oil companies in the Basin Petroleum Geology Potiguar (BPP). We chose PcaF, a metabolic enzyme, to be the molecular biomarker in a PCR detection of prokaryotes that degrade HPA's. The PCR fingerprints obtained from Paracuru-CE, Fortim-CE and Areia Branca-RN samples revealed the occurrence of fluctuations of microbial communities according to the sampling periods and in response to the impact of oil. In the analysis of microbial communities interference of the oil industry, in Areia Branca-RN and Paracuru-CE was observed that oil is a determinant of microbial diversity. Fortim-CE probably has no direct influence with the oil activity.

Introdução

O petróleo é composto basicamente por hidrocarbonetos (97%), e elementos como nitrogênio, enxofre e oxigênio (Yender *et al.*, 2002; National Research Council, 1985 apud National Research Council, 2003). Os hidrocarbonetos podem ser classificados em dois grandes grupos: alifáticos e aromáticos. Os hidrocarbonetos aromáticos são formados por pelo menos um anel aromático e podem ser separados em dois grupos: os compostos monoaromáticos e os poliaromáticos também chamados de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP's). Embora os HAP's correspondam à menor fração presente no petróleo, destacam-se por serem estáveis, persistentes no meio ambiente e por apresentarem efeitos tóxicos nos organismos aquáticos e terrestres. Os HAP's são compostos constituídos unicamente de átomos de carbono e de hidrogênio, estruturados para formar dois ou mais anéis aromáticos sendo mais de 100 HAP's os reconhecidos pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) e dentre estes, somente 16 são considerados relevantes em função das informações químico-físicas, toxicológicas, industriais e ambientais existentes. São eles: acenaftaleno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, naftaleno e pireno (Peng *et al.*, 2008). A degradação dos HAP's no ambiente pode ocorrer através de processos químicos e físicos que são lentos e/ou incompletos, sendo que a biodegradação é a principal via de eliminação dos HAP's no solo (Prince e Drake, 1999). Os microrganismos degradadores destes compostos encontram-se em pequeno número no solo, porém com populações maiores em ambientes contaminados. Têm sido descritos procariotos dos grupos α - β - e γ -*Proteobacteria* e *Actinobacteria*, sendo os gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium*, *Paracoccus*, *Gordonia* os mais frequentes (Mutnuri *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2008). A taxa de degradação de um poluente no ambiente pode ser resultado do reduzido número de microrganismos nativos com habilidade de degradação do composto. Nestes casos, estratégias de biorremediação por bioestimulação e bioaugmentação microbiana são apropriados para a degradação dos contaminantes e inclusive nos últimos anos tem sido dada a utilização de consórcios microbianos para aumentar as

taxas de mineralização dos HAP's (Bamforth e Singleton, 2005; Peng *et al.*, 2008). A grande diversidade e complexidade molecular dos HAP's é uma importante motivação para os pesquisadores em descobrir quais rotas metabólicas são responsáveis pela sua degradação. Pérez-Pantoja *et al.*, (2008) propõe a reconstrução metabólica das diferentes rotas de biodegradação de HAP's que ocorrem em diferentes procariotos, destacando que muitas delas confluem em acetil-CoA, de modo que os HAP's através de diversas vias metabólicas de degradação podem ser utilizados como fonte de carbono e/ou energia. A abordagem metagenômica para bioprospecção da diversidade microbiana nativa relacionada com petróleo é pouco conhecida no Brasil. Entre os poucos trabalhos sobre ocorrência de diversos tipos de microrganismos nativos com potencial biodegradador de hidrocarbonetos em biomas, caatinga e mangue, foram reportados por Blaha *et al.*, (2008). A diversidade microbiana nativa da Bacia Petrolífera Potiguar, foi avaliada metagenomicamente por Santos, (2006); Pereira, (2007); Silva *et al.*, (2007); Carvalho *et al.*, (2007, 2008).

A prospecção metagenômica de biocatalisadores microbianos em diversos ambientes naturais vem sendo uma abordagem que demonstra um grande interesse pela indústria petroquímica, assim como também pelos órgãos governamentais de controle ambiental. Portanto, os estudos metagenômicos dos microrganismos associados às atividades da indústria petrolífera fornecerão dados e informações que visam contribuir para o conhecimento acerca do “status microbiológico nativo” e seu potencial papel na biodegradação de HAP's em ambientes de risco de contaminação, como o semiárido e os manguezais localizados em áreas de influência da indústria de Petróleo e Gás no RN.

Metodologia

- Amostragem de solos e construção de microcosmos

Foram realizadas coletas de sedimentos de Manguezal em cidades que compõem a BPP-RN: Fortim-CE, Paracuru-CE e Areia Branca-RN. Os sedimentos foram armazenados e amostrados com as mãos protegidas por luvas de látex previamente irradiadas por UV durante 20 minutos. Uma pá previamente flambada foi utilizada para escavação numa profundidade aproximada de 20 cm de profundidade em dois pontos de coleta longe de ações antropogênicas. Embalagens do tipo Zip Ploc também foram esterilizadas pelo mesmo processo de radiação e utilizadas para o armazenamento e transporte dos sedimentos.

As duplas amostragens de sedimento de mangue foram homogeneizadas num Zip Ploc esterilizado a fim de se obter uma amostra única para cada localidade. Foram pesados 420g de cada sedimento homogeneizado e separados em dois recipientes (massa final 210g para cada microcosmo), um sem contaminação com petróleo (controle) e outro contaminado com 3% de petróleo pasteurizado. No total, seis experimentos em microcosmos com 200g de sedimento foram construídos.

Os microcosmos foram acondicionados no laboratório num ambiente com temperatura média de 28°C e sem contato direto com a luz solar. A manutenção do potencial hídrico do solo foi realizada repondo água retirada no local da coleta autoclavada. A reposição hídrica e a homogeneização das amostras ocorreram a cada 30 dias.

As amostras de sedimentos de mangue dos microcosmos foram realizadas nos tempos de amostragem: 0, 3, 7, 14, 28, 60, 63, 67, 74, 88 e 120 dias. No tempo 0 foram amostrados 10g dos sedimentos puro e contaminado de cada solo para análises complementares. A partir do tempo 3 foram removidos de cada microcosmo 3g de sedimento em cada tempo e condicionados em microtubos novos autoclavados. No total, 66 amostras foram coletadas dos microcosmos puros e contaminados com petróleo e foram conservadas a -20°C.

- Isolamento de DNA metagenômico (mDNA) dos microcosmos

O DNA metagenômico das amostras foi extraído utilizando um procedimento otimizado seguindo as recomendações do fabricante, através do kit FastDNA® SPIN (BIO101, Carlsbad, CA, USA). O DNA extraído com o kit foi quantificado por espectrofotometria observando-se a OD260nm

(*Nanodrop*) e posteriormente padronizado para as reações da PCR. Todos os DNAs metagenômicos foram diluídos para uma concentração final de $\sim 30\text{ng}/\mu\text{l}$.

- Construção de uma base de dados sobre o processo de degradação dos compostos aromáticos utilizando dados do NCBI, KEGG e UM-BBD

Foram verificados nos bancos de dados online todos os principais gêneros envolvidos na degradação de HAP's utilizando como ferramenta o BLAST/NCBI. Os *genes* em questão, (*query*) envolvidos na rota metabólica de degradação de HAP's foram escolhidos partindo da análise dos estudos de Pérez-Pantoja *et al.*, (2008).

- Desenhos de primers para PCR

Primers para a detecção de procariotos degradadores de HAP's foram desenhados e avaliados computacionalmente com auxílio dos softwares: *Primer BLAST/NCBI* e *Vector NTI Advance™ 11.0*. Os *Primers* PCAF foram desenvolvidos.

- Obtenção dos perfis da PCR

Para os primers PCAF sem grampo, as reações da PCR foram realizadas no termociclador contendo as seguintes concentrações finais: 1,5mM de MgCl_2 , 45mM KCl, 5% de DMSO, 0,2mM de DNTP's, 1,5ng/ μl de DNA molde, 2pmol/ μl de cada Primer, 1,0U de Taq DNA Polimerase (TaqGen Biosystems) e Tampão de Enzima 1x, para um volume final de 20 μl . O programa utilizado para as ampliações do DNA metagenômico consiste em: 94°C por 3min, 35 ciclos a 94°C por 1min, 64°C por 1min, 72°C por 1min e uma extensão final de 72°C por 10min.

Os *amplicons* gerados nas reações da PCR com os oligonucleotídeos desenvolvidos para detecção do *gene* metabólico *pcaF* foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 10% durante 2 horas a 100V e 100mA corado com prata para verificação da especificidade e tamanho molecular dos *amplicons*. As fotografias foram analisadas com o programa *LabImage 1D 2006*.

Resultados e Discussão

- Extração do DNA metagenômico

O DNA metagenômico foi extraído de todas as 66 amostras (puras e contaminadas) através do kit FastDNA® SPIN (BIO101, Carlsbad, CA, USA) e posteriormente quantificado. A eficiência da extração do mDNA foi maior nas amostras de Areia Branca-RN e Fortim-CE (Figura 1). Provavelmente o tipo de sedimento, a granulometria, e as características físico-químicas gerais não favoreceram a ação do kit de extração. A extração do mDNA não foi proporcional à quantidade de microrganismos antes quantificado. Para aumentar a concentração das amostras, foi realizada uma segunda extração e o produto desta adicionado ao da primeira. Todas as amostras foram normalizadas para uma concentração final de $\sim 30\text{ng}/\mu\text{l}$ mantendo-se um estoque concentrado devidamente guardado a -20°C .

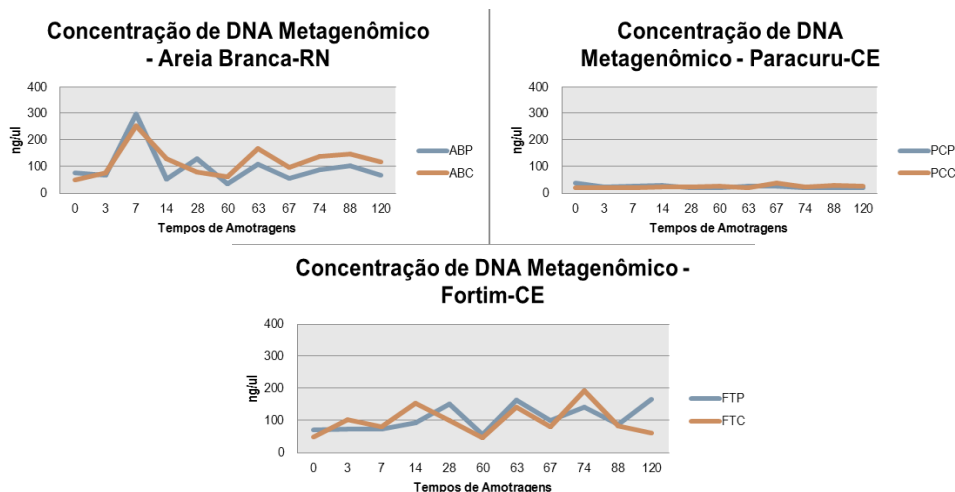


Figura 1. Gráficos das concentrações de mDNA extraído dos microcosmos ao longo do tempo.

A princípio, ao comparar a estimativa de unidades formadoras de colônias com a concentração de DNA metagenômico extraído, numa primária e ínfima análise, seria esperada uma relação diretamente proporcional (caso não observado em algumas amostras). Mas por se tratar de uma diversidade microbiológica desconhecida e com inter/intrarrelações complexas associadas a questões multifatoriais, essa relação de proporcionalidade pode não ter sido mantida. O meio de cultura utilizado, meio LB, na quantificação possibilitou o crescimento de determinadas espécies bacterianas que possuem por sua vez velocidade de crescimento distinto, inviabilizando uma comparação direta da quantificação com concentração de mDNA extraído das amostras de solo.

- Definição de um biomarcador molecular

Os dados preliminares nas análises realizadas no NCBI revelam a ocorrência de 1014 organismos distribuídos em 169 gêneros bacterianos, com uma parcela importante relacionada com degradação de hidrocarbonetos. Dados preliminares de análises de sequências proteicas do *gene pcaF* utilizando o GenBank do NCBI revelam a ocorrência de mais de 1000 hits no resultado do BLASTp, no entanto somente 267 sequências correspondem à enzima beta-cetoadipil-CoA tiolase, com um E-value que varia de 0,0 a $4e-78$. Estes dados sugerem que o *gene pcaF* está presente em outros diversos microrganismos, entre uma a cinco cópias, na sua maioria com duas cópias e/ou também outras proteínas com domínios conservados similares ao domínio tiolase que está presente em PcaF. Após análises preliminares com Primer BLAST do NCBI, foi escolhido para análise *in silico* o *gene pcaF*, codificante para enzima tiolase, responsável por uma das etapas críticas na degradação de compostos aromáticos, descrito em *Cupriavidus necator* JMP134, (também denominada *Ralstonia eutropha* JMP134) procarioto modelo para estudos de biodegradação de HAP's (Pérez-Pantoja *et al.*, 2008).

- Screening do *gene pcaF* em microrganismos isolados de microcosmos contaminados por petróleo através da PCR

Utilizando os isolados de microcosmo nas reações da PCR com os primers PCAF, verificaram-se fortes evidências da presença de microrganismos com potencialidades na degradação de HAP's, as intensidades dos *amplicons* divergem refletindo a biomassa, podendo possuir o *gene pcaF* ou mesmo *genes* relacionados. Ao se tratar de amostras bacterianas ambientais, podem ser encontrados microrganismos com várias cópias de *genes pcaF*. Na análise por eletroforese em gel de poliacrilamida foi verificada a presença de um segundo amplicon ~100pb abaixo do tamanho esperado de ~400pb com grampo, como já verificado nos testes de otimização (tópico anterior), podendo estar relacionado com o domínio Tiolase estudado. Este dado só será elucidado após o seu isolamento e sequenciamento, podendo contribuir e ser adicionado posteriormente ao trabalho. Iremos descartar a sua presença tendo em vista que não afeta o comprometimento e a continuidade deste trabalho. Para análise de representatividade, com o uso dos primers desenvolvidos PCAF, foram realizados PCR's com o mDNA extraído de todas as amostras de solos (Paracuru-CE, Fortim-CE e Areia Branca-RN) coletadas em todos os tempos de amostragens: 0, 3, 7, 14, 28, 60, 63, 67, 74, 88 e 120 dias, puros e contaminados com petróleo a fim de se obter *Screening* do *gene pcaF* (Figura 2).

Através do *screening* do *gene pcaF* nos isolados mDNA do solo de Paracuru-CE com auxílio do software LabImage 1D 2006 foi observado que nos tempos iniciais: 0, 3 e 7 dias, os *amplicons* visualizados no PAGE estavam em maior intensidade (maior biomassa) partindo do primeiro momento do contaminado, PCC0 ao contaminado PCC7 e ressurgindo no PCC60 com menor intensidade (menor biomassa) diminuindo gradativamente até PCC120 sendo indetectável nos tempos 14 e 28 dias. Houve também a detecção de *amplicons* nas amostras puras nos tempos 3, 7 e 63 dias. Uma explicação provável para o aparecimento de *amplicons* nos isolados mDNA puros de Paracuru-CE seria que os procariotos em resposta à situação de estresse ocasionada, por exemplo, pela redução dos nutrientes ao longo do tempo, com acúmulo de metabólitos, de alguma forma favoreceu o crescimento de bactérias que possuíam o *gene* específico *pcaF* e que não necessariamente estaria sendo expressado.

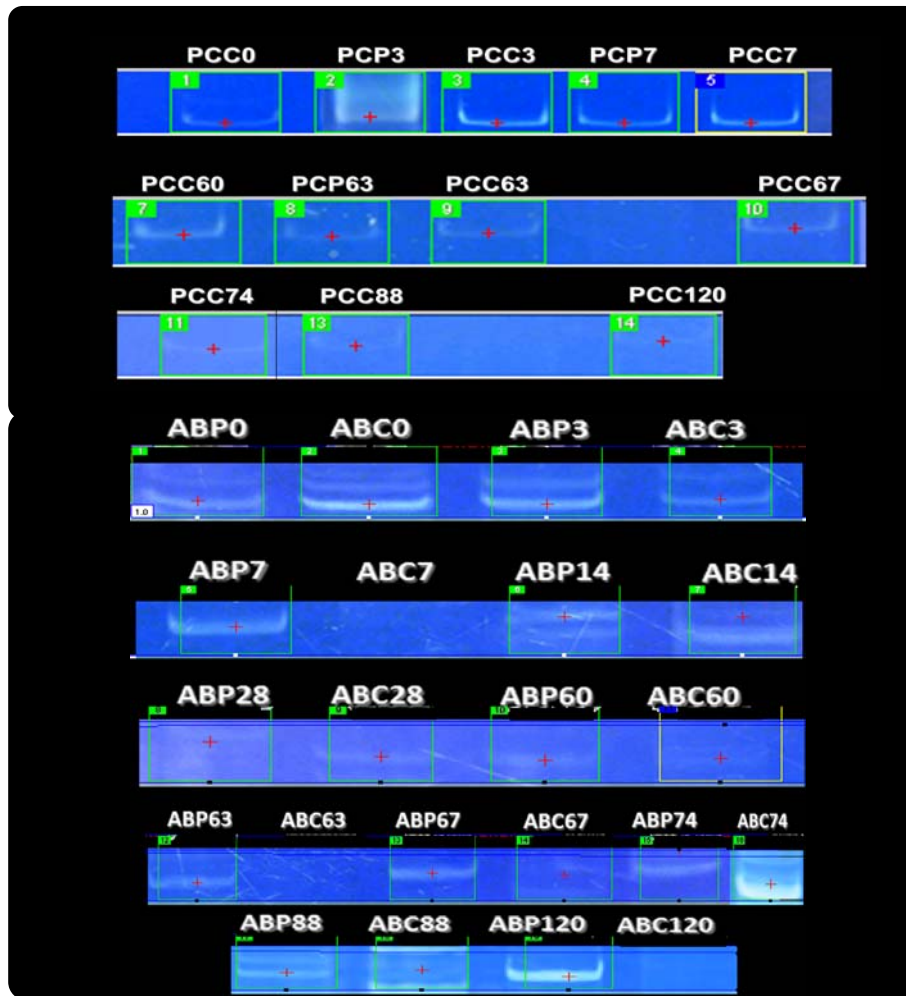


Figura 2. *Screen do gene pcaF* - PCR – Análise Digital. *Screening* de amplicons por intensidade e diferenciação de pixels. Em destaque (cruz vermelha) amplicons detectados pelo software LabImage 1D 2006.

É importante ressaltar que a maioria dos isolados contaminados com petróleo foi positivo para a presença do *gene pcaF* e que em muitos dos isolados puros usados como controle foram negativos para presença do *gene pcaF*, exceto os mencionados. Nas amostras de Areia Branca-RN, o *screening* do *gene pcaF* nos isolados mDNA revelaram a presença de amplicons na maioria das amostras puras e contaminadas. Potencialmente os sedimentos de manguezais - Areia Branca-RN possuem procariotos degradadores de HAP's em quantidade expressiva quando comparado aos outros locais deste estudo. O fato de procariotos degradadores de HAP's estarem presentes tanto no solo puro quanto no contaminado na maioria dos tempos de amostragem em Areia Branca-RN pode está relacionado com a presença do contaminante no solo puro (sem contaminação experimental), considerando que o local está nas proximidades de intensa atividade petrolífera.

Ao considerar que Paracuru-CE e Areia Branca-RN estão inseridos numa região com atividades petrolíferas e que provavelmente o ambiente de mangue está sujeito a contaminação por petroderivados, como HAP's, é esperado que a diversidade da microbiota local seja restrita a organismos adaptados/tolerantes a este estresse. Os resultados obtidos com o *screening* do *gene pcaF*, indicam a presença de procariotos em amostras contaminadas por petróleo e portanto potencialmente envolvidos na degradação de HAP's. Este resultado pode ser explicado pelo esperado fluxo "contínuo" de HAP's ao longo do tempo nos sedimentos do bioma de mangue, oriundos da atividade petrolífera próxima, que pode promover um favorecimento de procariotos tolerantes e/ou capazes de degradar estes compostos (corroborando a hipótese do aparecimento em amostras "puras" de amplicons para o *gene pcaF* em Areia Branca-RN).

Na análise dos mDNA do solo, Fortim-CE resultou em negativo para a presença do *gene pcaF* para a maioria dos tempos de amostragem, porém houve detecção na amostra contaminada por petróleo FTC63. A presença deste ténue amplicon sugere a ocorrência de procarioto(s) com potencial em degradar HAP's embora em pouca quantidade. O estresse gerado pela competição por nutrientes, concomitantemente à liberação de metabólitos no meio, podem estar interferindo no desenvolvimento destes procariotos com potencial em degradar HAP's ou até mesmo procariotos específicos podem estar competindo direta ou indiretamente desfavorecendo o seu crescimento. A detecção de procariotos no tempo de 63 dias no solo contaminado pode estar intimamente relacionado com a redução dos microrganismos que estavam anteriormente de alguma forma, impedindo o seu desenvolvimento.

Em Fortim-CE, onde não há atividade petrolífera direta, é esperado uma diversidade diferenciada de microrganismos em relação aos outros locais avaliados neste estudo, diminuindo a possibilidade de encontrar procariotos com potencial em degradar HAP's, ou seja, redução de procarioto com o *gene pcaF*, resultado sustentado pelos dados obtidos na triagem do *gene pcaF* nos mDNA.

O *Screen PCAF* no mDNA de sedimentos do bioma manguezal revelou que Paracuru-CE e Areia Branca-RN, áreas próximas de indústrias petrolíferas, possuem em sua microbiota nativa possíveis procariotos com potencial em degradar HAP's. Areia Branca-RN poderá estar sob contaminação contínua de HAP's. Teoricamente, em caso de contaminação ambiental por petróleo, provavelmente Paracuru-CE estará mais apto para processo de biodegradação de HAP's, caso oposto ao de Fortim-CE, que apesar de não estar sob influência direta das indústrias petrolíferas, o seu bioma manguezal está numa zona de risco.

Evidências de microrganismos com potencial em degradar compostos presentes no petróleo em solos de mangue e de caatinga foram reportados. Estudos com mDNA, bioprospectado com um marcador molecular para o *gene 16S DNAr* específico para um grupo seletivo de procariotos degradadores de hidrocarbonetos, revelaram a presença destes em amostras de solos e sedimentos de mangue oriundos Diogo Lopes-RN, Estrada do Óleo-RN e, inclusive, em locais externos a qualquer atividade petrolífera, como a reserva da Mata Atlântica em Dois Irmãos-PE (Santos *et al.*, 2006; Blaha *et al.*, 2007; 2008). Foram encontrados procariotos com potencial em degradar alcanos em biomas sem influência direta de indústrias petrolíferas após o contato com petróleo em ensaios com microcosmos (Pereira *et al.*, 2007). A prospecção utilizando *genes* metabólicos específicos de grupos bacterianos, por exemplo *gene alkB* (Pereira *et al.*, 2007); *gene dsrB* (Carvalho *et al.*, 2007, 2008) e *gene mtrB* (Silva *et al.*, 2007, 2009) e agora neste trabalho, utilizando o *gene pcaF*, visando a detecção e monitoramento de procariotos degradadores de HAP's. A diversidade microbiana nativa da Bacia Petrolífera Potiguar – RN também foi avaliada metagenomicamente, não somente utilizando *genes* universais, mas também através da utilização de *genes* metabólicos específicos de grupos bacterianos, por exemplo *gene alkB* envolvido na degradação de alcanos (Pereira *et al.*, 2007); *gene dsrB* envolvido em processos de biocorrosão (Carvalho *et al.*, 2007, 2008); *gene mtrB* característico de microrganismos oxido-redutores de metais (Silva *et al.*, 2007).

Conclusões

Através dos estudos *in silico* com dados obtidos do GenBank/NCBI de *genes* isolados ou de genomas de espécies bacterianas envolvidas em biodegradação de HAP's foi definido um biomarcador molecular metabólico baseado em sequências do *gene pcaF* para bioprospecção metagenômica. Em experimentos de microcosmos o impacto inicial da contaminação com petróleo nos sedimentos de mangue verificou-se que não é igual nos locais estudados. As concentrações de mDNA extraídos das amostras de sedimentos de mangue puras e contaminadas por petróleo em ensaios com microcosmos de Paracuru-CE, Fortim-CE e Areia Branca-RN apresentaram variações expressivas. Esses dados sugerem intrínsecas relações entre a dinâmica microbiana normal com o tempo de exposição ao

contaminante petróleo. Os *amplicons* obtidos por PCR utilizando o biomarcador molecular *pcaF* revelaram que dos locais estudados, o sedimento de Fortim-CE foi o que menos evidenciou a ocorrência comunidades microbianas nativas com potencial para degradar HAP's consequentemente o efeito da contaminação por petróleo seria mais prejudicial.

Esta metodologia direta e simples permite uma rápida avaliação da resposta das comunidades microbianas nativas com potencial para degradar HAP's ao impacto do petróleo e por tanto relevantes para o sucesso de ações de SMS no âmbito da indústria petrolífera.

Agradecimentos

Ao CNPq e a CAPES pelo auxílio financeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPgCB/UFRN).

Referências Bibliográficas

Bamforth, S.; Singleton, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v.80, n.7, Apr,p. 723-736. 2005.

Blaha, C. A. G. ; Carvalho, C. M. ; Silva, A. L. S. ; Santos, I. L. V. D. ; *et al.* Bioremediation in tropical mangrove and semi-arid soils from petroliferous basin: metagenomic evaluation of responsive indigenous microbial communities. In: 4th European Bioremediation Conference, Chania, Grecia, 2008.

Carvalho, C.M. Ecogenômica de Archaea e monitoramento de comunidades de procaríotos redutores de sulfato em metagenomas: aplicações na indústria de petróleo e gás. Dissertação de Mestrado PPg-GBM, UFRN, 2008

Carvalho, C. M. ; Lima, Lucymara Fassarella Agnez ; Medeiros, Silvia R Batistuzzo de ; Blaha, C. A. G. . Detection of sulfate-reducing prokaryotes (srps) in environmental samples from the mangrove of Diogo Lopes, Petroliferous Basin Potiguar (BPP). In: 4 Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás, Campinas-SP, 2007.

Mutnuri, S. *et al.* Degradation of anthracene and pyrene supplied by microcrystals and non-aqueous-phase liquids. Applied Microbiology and Biotechnology, New York, v.67, n.4, p.569-576, 2005.

Peng, R. H., A. S. Xiong, *et al.* Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. FEMS Microbiol Rev, v.32, n.6, Nov, p.927-55. 2008.

Perez-Pantoja, D., R. De La Iglesia, *et al.* Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. FEMS Microbiol Rev, v.32, n.5, Aug, p.736-94. 2008.

Pereira, M.S. Estudos in silico da proteína AlkB e prospecção de bactérias alcanotróficas em solos da Bacia Petrolífera Potiguar. Dissertação de Mestrado PPg-GBM, UFRN, 2007.

Prince, R.C. and Drake, E.N. Transformation and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. In: ADRIANO, D.C. *et al.* (Ed.) Bioremediation of contaminated soils. Madison: ASA/CSSA/SSSA, p.89-110, 1999.

Santos, I.L.V. de L. Estudo de populações microbianas em solos contaminados por petróleo. Dissertação de Mestrado PPg-GBM, UFRN, pp63, 2006

Silva, A. L. S.; Silva, C. L. V.; Lima, Lucymara Fassarella Agnez ; Medeiros, Silvia R Batistuzzo de; Galindo Blaha, C.A. . Detection of Fe (III) reducing bacteria in mangrove of potiguar petroliferous basin with petroleum biodegrading potential. In: 4 Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás, Campinas-SP, 2007.

Yender, R., J. Michel, and C. Lord. Managing Seafood after an Oil Spill. Seattle, Washington: National Oceanic and Atmospheric Administration, Office of Response and Restoration. 65pp, 2002.