



UNICAMP

LEANDRO COSTA LIMA VERDE

Avaliação da diversidade filogenética e funcional da microbiota envolvida na biodegradação de hidrocarbonetos em amostras de petróleo de reservatórios brasileiros

Evaluation of the phylogenetic and functional diversity of the microbiota involved in hydrocarbon biodegradation in petroleum samples from Brazilian reservoirs

Campinas

2014

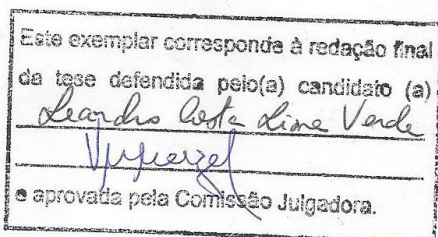


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LEANDRO COSTA LIMA VERDE

**Avaliação da diversidade filogenética e funcional da
microbiota envolvida na biodegradação de hidrocarbonetos
em amostras de petróleo de reservatórios brasileiros**

**Evaluation of the phylogenetic and functional diversity of the
microbiota involved in hydrocarbon biodegradation in
petroleum samples from Brazilian reservoirs**



*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP, para a
obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular
na área de Genética de Micro-organismos.*

*Thesis submitted to the Institute of Biology at UNICAMP, to
obtain the title of Doctor in Genetics and Molecular Biology in the
area of Genetics of Microorganisms.*

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Maia Merzel

Campinas, 2014

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

V583a Verde, Leandro Costa Lima, 1979-
Avaliação da diversidade filogenética e funcional da microbiota envolvida na biodegradação de hidrocarbonetos em amostras de petróleo de reservatórios brasileiros / Leandro Costa Lima Verde. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

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

1. Ecologia microbiana. 2. Petróleo - Microbiologia. 3. Biodegradação. 4. Biblioteca gênica. 5. Metagenoma. I. Oliveira, Valéria Maia de, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of the phylogenetic and functional diversity of the microbiota involved in hydrocarbon biodegradation in petroleum samples from Brazilian reservoirs

Palavras-chave em inglês:

Microbial ecology

Petroleum - Microbiology

Biodegradation

Gene library

Metagenomic

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Valéria Maia Merzel [Orientador]

Suzete Aparecida Lanza Destéfano

Cynthia Canêdo da Silva

Fabiana Fantinatti Garboggini

Lara Durães Sette

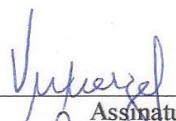
Data de defesa: 23-05-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

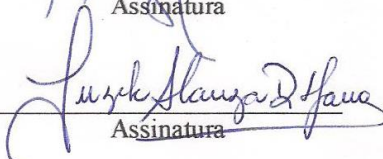
Campinas, 23 de maio de 2014

BANCA EXAMINADORA

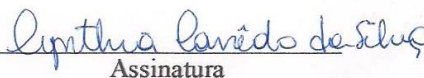
Dra. Valéria Maia Merzel (orientadora)


Assinatura

Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano


Assinatura

Profª. Dra. Cynthia Canêdo da Silva


Assinatura

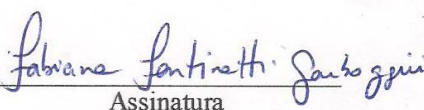
Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo

Assinatura

Dra. Virgínia Medeiros de Siqueira

Assinatura

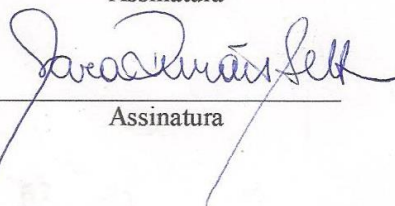
Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini


Assinatura

Dr. Itamar Soares de Melo

Assinatura

Dra. Lara Durães Sette


Assinatura

RESUMO

O processo de biodegradação do petróleo em reservatórios pode resultar em mudanças na composição e propriedades físico-químicas de óleos brutos e gases naturais, as quais levam à diminuição do teor de hidrocarbonetos saturados, produzindo óleos mais pesados e com baixo valor econômico. O uso combinado de técnicas dependentes e independentes de cultivo pode nos permitir um melhor entendimento acerca da comunidade de micro-organismos que habita os reservatórios de petróleo, incluindo aqueles responsáveis por esta biodegradação. O conhecimento sobre a composição microbiana, suas funções e interações com outros micro-organismos e com o ambiente pode levar à definição de estratégias de monitoramento e/ou controle da biodegradação em reservatórios. Este estudo teve como finalidade avaliar a diversidade de micro-organismos e genes envolvidos na degradação de hidrocarbonetos presentes em amostras de petróleo provenientes de dois poços terrestres da Bacia Potiguar (RN), identificados como GMR75 (poço biodegradado) e PTS1 (poço não-biodegradado), através da construção de bibliotecas de genes catabólicos (alcano monooxigenases - *alk*, dioxigenases que hidroxilam anéis aromáticos – ARHDs e 6-oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA hidroxilase - *bamA*) e sequenciamento em larga escala de metagenoma e metatranscriptoma de enriquecimentos microbianos aeróbios. Os resultados observados mostraram uma distribuição diferencial dos genes catabólicos entre os reservatórios, sendo o óleo biodegradado mais diverso para os genes *alk* e *bamA*. As sequências foram semelhantes aos genes *alkB* dos gêneros *Geobacillus*, *Acinetobacter* e *Streptomyces*, aos genes ARHD dos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia*, e aos genes *bamA* do gênero *Syntrophus*. A análise quantitativa dos genes catabólicos de degradação de hidrocarbonetos presentes e expressos nos enriquecimentos microbianos em diferentes etapas da biodegradação do óleo, através de PCR Tempo Real, demonstrou maior atividade do gene que codifica a enzima dioxigenase nas comunidades microbianas enriquecidas, e os resultados obtidos pela técnica de microarray sugeriram a existência de novas sequências dos genes *alk* e ARHD provindas do reservatório de petróleo. As análises das sequências obtidas a partir do metagenoma e metatranscriptoma mostraram que a comunidade bacteriana recuperada no enriquecimento aeróbio é bastante diversa, com predominância do Filo Actinobacteria, seguido de Proteobacteria. As sequências com maior abundância e níveis de expressão foram relacionadas aos genes que codificam as proteínas ligase CoA de ácido graxo de cadeia longa, envolvida na degradação de

compostos aromáticos; descarboxilase, envolvida com o ciclo do glioxilato, e o fator sigma da RNA polimerase, envolvida com a regulação da resposta ao estresse oxidativo, sugerindo uma adaptação da comunidade microbiana às condições do enriquecimento e um processo inicial de biodegradação dos hidrocarbonetos. Os resultados obtidos neste trabalho fornecem dados inéditos sobre a diversidade de genes catabólicos e de membros da comunidade microbiana potencialmente envolvidos com a degradação do óleo em reservatórios de petróleo.

ABSTRACT

The process of oil biodegradation in reservoirs may result in changes in the composition and physico-chemical properties of crude oils and natural gases, which lead to the decrease of the content of saturated hydrocarbons, producing heavy oils and with low economic value. The combined use of both dependent and independent cultivation techniques may allow us to better understand the microbial community inhabiting oil reservoirs, including those microorganisms responsible for oil degradation. The knowledge about the microorganisms, their functions and interactions with other microorganisms and the environment may lead to the definition of monitoring and/or control strategies of biodegradation in oil reservoirs. This study aimed at evaluating the diversity of microorganisms and genes involved in the degradation of hydrocarbons present in oil samples from two onshore reservoirs at Potiguar Basin (RN), identified as GMR75 (biodegraded) and PTS1 (non-biodegraded), through the construction of catabolic gene libraries (alkane monooxygenases - *alk*, aromatic ring hydroxylating dioxygenases - ARHD and 6-oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA hydroxylase - *bamA*) and high-throughput sequencing of metagenome and metatranscriptome from aerobic microbial enrichments. Results observed showed a differential distribution of catabolic genes between the reservoirs, being the biodegraded oil more diverse for the *alk* and *bamA* genes. The sequences were similar to *alkB* genes from *Geobacillus*, *Acinetobacter* and *Streptomyces* genera, to the ARHD genes from *Pseudomonas* and *Burkholderia* genera, and to the *bamA* genes from *Syntrophus* genus. Quantitative analysis of the hydrocarbon degradation genes present and expressed in the microbial enrichments during the different phases of oil biodegradation by Real-Time PCR showed that there was a higher activity of dioxygenase enzymes in the enriched microbial communities and results from microarray assays suggested the existence of new *alk* and ARHD gene sequences originated from the oil reservoir. Metagenomic and metatranscriptomic analyses showed a highly diverse bacterial community, dominated by the Phylum Actinobacteria, followed by Proteobacteria. The most abundant and active sequences were affiliated to the *Long-chain-fatty-acid-CoA ligase* protein, involved in the degradation of aromatic compounds; decarboxylase, which is involved with the glyoxylate cycle, and RNA polymerase sigma factor, which is involved in regulating the oxidative stress response, suggesting an adaptation of the microbial community to the enrichment conditions and an initial process of biodegradation of hydrocarbon compounds. The results obtained in this work bring innovative data on the

diversity of catabolic genes and microbial community members potentially involved with oil degradation in petroleum reservoirs.

SUMÁRIO	
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
DEDICATORIA	xv
AGRADECIMENTOS	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Petróleo	3
2.2. Microbiologia do Petróleo	5
2.3. Genes Envolvidos no Processo de Biodegradação Aeróbio e Anaeróbio	7
2.3.1. Alcano Monoxigenases – <i>alk</i>	8
2.3.2. Dioxigenases que Hidroxilam Anéis Aromáticos (ARHDs)	13
2.3.3. 6-oxociclohex-1-eno-1-carbonil-CoA Hidroxilase – <i>bamA</i>	16
2.4. Métodos moleculares no estudo da diversidade de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos	19
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivos gerais	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. APRESENTAÇÃO DA TESE	24
CAPÍTULO 1 - Diversity of hydrocarbon-related catabolic genes in oil samples from Potiguar Basin (RN, Brazil).	25
CAPÍTULO 2 - Quantificação dos genes catabólicos e sua expressão em um enriquecimento microbiano aeróbio utilizando a técnica de PCR em Tempo Real.	33

2.1. INTRODUÇÃO	34
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.2.1 Amostras	35
2.2.2 Enriquecimento da microbiota aeróbia de petróleo	36
2.2.3 Análise da degradação do óleo nos enriquecimentos através de CG-EM	38
2.2.4 Extração de RNA e DNA dos cultivos enriquecidos	39
2.2.5 Quantificação dos genes catabólicos <i>alk</i> e ARHD nos enriquecimentos por PCR em tempo real (qPCR)	41
2.2.6 Quantificação da expressão dos genes catabólicos <i>alk</i> e ARHD nos enriquecimentos por PCR em tempo real (qRT-PCR)	42
2.2.7 Avaliação dos genes catabólicos no enriquecimento aeróbio por <i>microarrays</i>	43
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
2.4. CONCLUSÕES	57
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
CAPÍTULO 3 - Análise Integrada de Metagenômica e Metatranscriptômica do Enriquecimento Aeróbio de um Reservatório de Petróleo no Nordeste do Brasil.	61
3.1 RESUMO	62
3.2 INTRODUÇÃO	63
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	65
3.3.1 Amostragem	65
3.3.2 Enriquecimentos bacterianos aeróbios	65
3.3.3 Extração de Ácidos nucléicos e Síntese de cDNA	66
3.3.4 Construção e sequenciamento de bibliotecas de DNA e cDNA	66

3.3.5 Análises de bioinformática	67
3.3.6 Classificação da expressão gênica global	68
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
3.4.1 Perfil filogenético do metagenoma e metatranscriptoma	68
3.4.2 Análise funcional do metagenoma e metatranscriptoma	73
3.4.2.1 Metabolismo de compostos aromáticos	78
3.5 CONCLUSÕES	82
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
5. DISCUSSÃO GERAL	89
6. CONCLUSÕES GERAIS	100
7. PERSPECTIVAS	102
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	103
ANEXO 1	114

Dedico esta Tese com muito carinho: à minha amada esposa Clarice e filha Cecília por estarem ao meu lado em todos os momentos dando-me forças e me apoiando para finalizar o doutorado. À minha mãe Ana Lúcia pelo apoio irrestrito e aos meus pais (sogra e sogra) Ronald e Conceição que sempre me ajudaram e me incentivaram para completar essa jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por sempre me proteger e guiar meus caminhos, tornando-os mais fáceis e agradáveis;

À minha esposa Clarice junto com nossa filha Cecília por terem me ajudado e apoiado com muito amor, carinho e dedicação em todos os momentos de dificuldades e de alegrias desta jornada e sem elas eu não teria chegado aqui.

Aos meus pais, Ana Lúcia (mãe) por sempre estar ao meu lado me ajudando e me apoiando com todo amor e dedicação, Ronald e Conceição (sogro e sogra) pelo apoio e ajuda com toda a dedicação para eu terminar esta jornada.

Aos meus irmãos Esio, Leonardo, Ângela, Ronald Filho e Bartira pelo apoio.

Aos meus primos de Campinas, em especial à Salette pela sua hospitalidade, ajuda, carinho, disponibilidade e incansável otimismo.

Aos meus amigos Luzinete, Misael, Gustavo, Cátia, Igor e Andréa pela ajuda, amizade e apoio.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) em especial ao Instituto de Biologia (IB) e ao Departamento de Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade e execução deste trabalho;

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Valéria Maia de Oliveira, pelo apoio, amizade e confiança no transcórre deste trabalho, contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado;

À PETROBRAS pelo apoio financeiro ao meu projeto de pesquisa, e em especial ao Dr. Eugênio V. dos Santos Neto pela facilitação no envio das amostras de petróleo, pelo apoio técnico incondicional e pela contribuição científica ao trabalho;

Aos funcionários do Instituto de Biologia (IB), pelo apoio e colaboração.

Às secretárias de pós-graduação de Genética e Biologia Molecular Maria de Lourdes e Silvia, pela paciência e disposição na parte burocrática;

Aos funcionários do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, pelo apoio e colaboração;

Às pesquisadoras da Divisão de Recursos Microbianos, Lara Durães Sette e Fabiana Fantinatti-Garboggini;

A todos os colegas da Divisão de Recursos Microbianos, que farei um esforço para citar todos: Bruna, Michel, Fernando, Alysson, Milena, João, Karen, Suzan, Gisele, Mariana, Patrícia, Samantha, Rafaella, Maria Raphaella, Barbara, Natália, Cláudia, Viviane, Daniela, Júlia, Gileno, Cynthia, Tiaguinho, Tiagão e pela amizade, companheirismo e agradáveis momentos de convivência e incentivo;

Ao National Research Council of Canada (Montrel, Canadá) e seus integrantes, em especial ao Charles Greer, Terry, Daiane, Sylvie e Etienne, pela hospitalidade, paciência, orientação, disponibilização do laboratório e equipamento;

À Profa. Anita Marsaioli do laboratório de Química Orgânica, do Instituto de Química da UNICAMP e ao seu aluno Célio Fernando Figueiredo Angolini.

À Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari do laboratório do Instituto de oceanografia da USP e seu integrantes, em especial ao Rubens Duarte e Emanuele Kuhn pela hospitalidade, orientação e disponibilização do laboratório e equipamento.

Ao Prof. Dr. Itamar Soares de Melo, da Embrapa – Jaguariuna, e sua equipe, em especial ao Rodrigo Taketani pela hospitalidade e disponibilização do laboratório e equipamentos.

Enfim, meu muito obrigado a todos que colaboraram direta ou indiretamente para execução deste trabalho,

Leandro

1. INTRODUÇÃO

A maioria dos recursos de petróleo da Terra está parcialmente biodegradado, limitando a exploração econômica de suas reservas e levando a problemas durante a sua produção e refino (RÖLING et al., 2003). Os efeitos da biodegradação realizada por microrganismos na composição e propriedades físico-químicas de óleos brutos e gases naturais são bem conhecidos, e levam à diminuição do teor de hidrocarbonetos saturados e do grau API (*American Petroleum Institute*, índice que determina o valor econômico do petróleo) e, ainda, ao aumento da densidade dos óleos, conteúdo de enxofre, acidez, viscosidade e conteúdo de metais, os quais influenciam a produção de óleo, através da redução da velocidade de vazão e operações de refino (WHITE et al., 2003).

A expansão da exploração do petróleo em novas fronteiras, como águas profundas no mar e ambientes árticos, e os derrames aparentemente inevitáveis que ocorrem durante operações de rotina e como consequência de acidentes graves, têm mantido um alto interesse da pesquisa neste campo (ATLAS, 1981). O conhecimento dos micro-organismos presentes em reservatórios de petróleo, e de suas propriedades fisiológicas e bioquímicas para o potencial de degradação de hidrocarbonetos, pode nos trazer benefícios na exploração de petróleo.

A diversidade dos micro-organismos encontrados em amostras de petróleo compreende grupos de bactérias e arqueias aeróbias, anaeróbias e microaerófilas, sugerindo que muitos desses micro-organismos podem ter sido introduzidos nos reservatórios de petróleo por meio de infiltração de águas superficiais, decorrente de características geológicas locais ou dos sistemas de injeção de água para exploração (MAGOT et al., 2000).

O catabolismo de hidrocarbonetos foi considerado por muito tempo como um processo estritamente dependente de oxigênio (HEIDER et al., 1999). Contudo, como demonstrado nas últimas décadas de pesquisa em microbiologia, determinados micro-organismos são capazes de metabolizar hidrocarbonetos sob condições anaeróbicas. Na ausência de oxigênio como acceptor final de elétron, a conservação de energia pode ser realizada pela respiração anaeróbica com nitrato, íon férrico ou sulfato. Sendo assim, toda linhagem anaeróbica degradadora de hidrocarboneto é desnitrificante, redutora de íon férrico ou redutora de sulfato (VAN HAMME et al., 2003).

Com a rápida expansão no campo da biologia molecular, métodos independentes de isolamento e cultivo passaram a ser utilizados para avaliar o perfil da comunidade de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos, representando uma ferramenta importante para caracterização da diversidade microbiana associada a reservatórios de petróleo, e permitiram obter informações detalhadas sobre a composição dessas comunidades e seu envolvimento nos processos de biodegradação deste óleo (AN et al., 2013).

Estudos dessa natureza podem levar à identificação de novos micro-organismos ou novas vias metabólicas com papel relevante na biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo, contribuindo para o melhor conhecimento dos processos biogeoquímicos envolvidos com a deterioração do óleo *in situ* e oferecendo potencial para o delineamento de estratégias de recuperação de óleos degradados ou biorremediação de sítios contaminados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Petróleo*

Aproximadamente 80-90% da produção de energia global é representada pelos combustíveis fósseis (óleo e gás) (GRAUS et al., 2011). A utilização do petróleo tem aumentado devido à grande demanda de energia causada pelo crescimento populacional no mundo, maturidade dos reservatórios de petróleo e a dificuldade em encontrar novos campos de petróleo (LI et al., 2012).

O petróleo é uma combinação complexa de hidrocarbonetos, composta na sua maioria de hidrocarbonetos alifáticos, alicíclicos e aromáticos, podendo conter também alguns constituintes como níquel e vanádio (VAN HAMME et al., 2003). Hidrocarbonetos são compostos formados por carbono e hidrogênio e podem ser classificados quanto à sua estrutura em cíclicos ou alifáticos (alcanos, alcenos, alcinos) e aromáticos (benzênicos e policíclicos) (HEIDER et al., 1999). Os hidrocarbonetos aromáticos são constituídos por um anel benzênico como parte de sua estrutura molecular. Os dois principais grupos de hidrocarbonetos aromáticos são os compostos monocíclicos (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), tais como naftaleno, antraceno, fenantreno, pireno e benzopireno (HOLLIGER; ZEHNDERT, 1996).

A composição do petróleo também é descrita em termos da proporção de (1) hidrocarbonetos saturados, como os alcanos (compostos de carbono e hidrogênio unidos por ligações simples), os isoalcanos e cicloalcanos, (2) hidrocarbonetos aromáticos e (3) compostos não hidrocarbonetos contendo oxigênio, nitrogênio, e enxofre (MAGOT, 2005). Os n-alcanos com menos de 5 átomos de carbono são gasosos em condições de temperatura e pressão normais, enquanto aqueles que possuem de 5 a 15 átomos são líquidos e os com mais de 15 átomos variam de líquidos a sólidos. Os hidrocarbonetos

aromáticos são compostos que apresentam o anel aromático (benzeno), aqueles com mais de um anel são chamados de HPAs, como o naftaleno (2 anéis), o fenantreno (3 anéis), o pireno (4 anéis) e o benzopireno (5 anéis). O tolueno, com apenas um núcleo benzênico, é o composto aromático mais comum no petróleo, seguido pelo xileno e benzeno. Finalmente, os não hidrocarbonetos são compostos que possuem outros elementos além do carbono e hidrogênio, denominados heteroátomos. As resinas e asfaltenos são exemplos deste grupo, apresentam alto peso molecular e são pouco solúveis em solventes orgânicos (Petroleum Geoscience Technology - www.pgt.com.br).

O petróleo rico em hidrocarbonetos saturados e com menor proporção de compostos polares é considerado “leve” e possui maior valor econômico. Os óleos pesados, que resultam da biodegradação do óleo bruto em reservatórios de petróleo, possuem uma quantidade muito menor de hidrocarbonetos saturados e aromáticos, e uma maior proporção das substâncias químicas mais polares, as resinas e asfaltenos (HEAD et al., 2006). Além disso, são mais densos e viscosos, o que interfere nas operações de extração e refino, resultando em grandes perdas econômicas para a indústria de petróleo (CONNAN et al., 1984).

No Brasil, a Bacia Potiguar está localizada na região nordeste entre os estados do Rio Grande do Norte e Ceará (Figura 1), com uma área de aproximadamente 70.000 km², sendo que 30% de sua superfície estão localizados na porção terrestre e o restante se estende para o mar, alcançando uma profundidade maior que 2000 m (BEHAR et al., 2006). A bacia produziu em 2013 em torno de 62.000 barris de petróleo por dia, constituindo a terceira maior produtora brasileira de petróleo (Boletim da Produção de Petróleo e Gás Natural, Março 2013, SDP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis).



Figura 1. Área dos poços da Bacia Potiguar (RN). A área mais clara da figura representa a região de localização dos campos petrolíferos terrestres.

2.2. Microbiologia do Petróleo

Bastin (1926) foi o primeiro pesquisador a estudar bactérias oriundas de águas de produção de um reservatório de petróleo, isolando bactérias sulfato redutoras. Desde então, uma ampla gama de bactérias tem sido isolada deste ambiente considerado inóspito, com condições extremas como alta temperatura, pressão, salinidade e anóxia. Contudo, existe uma controvérsia na comunidade acadêmica sobre o isolamento de bactérias nativas e contaminantes dos reservatórios de petróleo, sustentada pela difícil amostragem em condições totais de assepsia nos reservatórios profundos (MAGOT, 2005). Neste contexto, bactérias isoladas nos reservatórios de petróleo poderiam ser contaminantes introduzidos nas operações de perfuração para a recuperação das amostras, bactérias de biofilmes das tubulações ou pela prática de injeção de águas superficiais, realizada para manter a pressão do reservatório, o que poderia levar à identificação equivocada de espécies nativas dos reservatórios (FOGHT, 2010).

Pesquisas realizadas sobre a microbiologia de reservatórios de petróleo têm evidenciado que parte da comunidade microbiana associada a este tipo de ambiente é representada por bactérias e arqueias com uma distribuição geográfica bastante ampla,

com uma grande variedade de micro-organismos isolados e/ou identificados, incluindo alguns grupos aeróbios, como, por exemplo, os gêneros *Bacillus*, *Halomonas* e *Acinetobacter* (SETTE et al., 2007; ORPHAN et al., 2000), anaeróbios facultativos dos gêneros *Deferribacter* e *Flexistipes* (GREENE et al., 1997), redutores de sulfato do gênero *Desulfovibrio* e *Desulfobacter* (KLEIKEMPER et al., 2002), metanogênicos, como os gêneros *Methanothermococcus* e *Methanocalculus* (TAKAI et al., 2002; YOSHIDA et al., 2003) e fermentativos.

Contudo, apesar do grande número de trabalhos realizados visando isolar e identificar essa ampla variedade de micro-organismos, as funções desempenhadas pelos membros desta comunidade nos reservatórios de petróleo ainda são pouco compreendidas. Os micro-organismos presentes neste ambiente podem representar um impacto ambiental que pode ser tanto positivo quanto negativo no processo de extração do petróleo. Dentre os impactos negativos estão o aumento da densidade dos óleos, conteúdo de enxofre, acidez, viscosidade e conteúdo de metais, além da formação de biofilmes, os quais influenciam negativamente a produção de óleo, através da redução da velocidade de vazão e operações de refino (OLLIVER; MAGOT, 2005; WHITE et al., 2003). Por outro lado, o impacto positivo desta comunidade pode residir na utilização de micro-organismos biodegradadores em processos de bioremediação, bioconversão e na recuperação do petróleo (MEOR - *Microbial Enhancement Oil Recovery*) (YOUSSEF et al. 2009). Claramente, existe a necessidade de mais informações sobre as atividades *in situ* desempenhadas por esses micro-organismos a fim de entender e melhor aproveitar os processos envolvidos na biodegradação do petróleo.

O processo de biodegradação pode ocorrer tanto sob condições aeróbias como anaeróbias. O processo de biodegradação aeróbio foi, por muito tempo, considerado o único mecanismo de biodegradação nos reservatórios de petróleo, com o metabolismo

aeróbio usando o oxigênio transportado pelas águas meteóricas como acceptor final de elétrons. O processo aeróbio de biodegradação de hidrocarbonetos é geralmente rápido o suficiente para ser observado em um curto período de tempo (HEAD et al., 2006). Contudo, um grupo de pesquisadores isolou e identificou vários micro-organismos em reservatórios de petróleo, e identificou mecanismos anaeróbios de biodegradação de hidrocarbonetos, sugerindo que estes micro-organismos anaeróbios poderiam ser os responsáveis pela biodegradação (AITKEN et al., 2004). Os micro-organismos na ausência de oxigênio poderiam utilizar uma grande variedade de compostos como aceptores finais de elétrons e mecanismos de respiração, incluindo a redução de ferro, de sulfato, de nitrato, fermentação e metanogênese (HEIDER et al., 1999).

Entre os micro-organismos anaeróbios envolvidos com a degradação de hidrocarbonetos existem dois grupos principais: os anaeróbios facultativos (redutores de ferro, manganês e nitrogênio) e os anaeróbios estritos (redutores de sulfato e metanogênicos). As bactérias redutoras de sulfato (SRB) são geralmente encontradas em ambientes contaminados com hidrocarbonetos (tolueno, benzeno, xileno e alcanos) e utilizam ácidos orgânicos como fonte de carbono (KLEIKEMPER et al., 2002).

2.3. Genes Envolvidos no Processo de Biodegradação Aeróbio e Anaeróbio

Micro-organismos com capacidade de degradar alcanos estão amplamente distribuídos no ambiente e têm sido isolados de locais contaminados ou não com hidrocarbonetos (MARCHANT et al., 2006). Os organismos superiores podem oxidar parcialmente alguns hidrocarbonetos, ao passo que micro-organismos podem degradar completamente hidrocarbonetos da maioria das classes, incluindo alcanos, alcenos, alcinos e aromáticos. Tal degradação pode ocorrer aerobicamente com oxigênio, ou

anaerobicamente com nitrato, íon férrico, sulfato ou outros aceptores de elétrons (WIDDEL; MUSAT, 2010).

Os mecanismos enzimáticos envolvidos na degradação aeróbia de hidrocarbonetos por bactérias têm sido extensivamente estudados por várias décadas (BOLL; HEIDER, 2010). Os genes que codificam as enzimas de degradação estão relativamente bem compreendidos para organismos aeróbios e cultiváveis, principalmente para os isolados de *Pseudomonas putida* GPo1, *Acinetobacter* sp. ADP1 e *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (VAN BEILEN; FUNHOOFF, 2007; WENTZEL et al., 2007). Muitos organismos que não são usualmente considerados como bactérias degradadoras de hidrocarbonetos possuem genes homólogos aos genes alcano monoxigenases (HEAD et al., 2006). van Beilen et al. (2003) verificaram que *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia fungorum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium avium* e *Silicibacter pomeroyi* contêm genes homólogos a alcano monoxigenases, sendo que, em muitas destas espécies, a proteína codificada é uma enzima funcional.

2.3.1. Alcano Monoxigenases - alk

Em organismos aeróbicos, o ataque inicial de hidrocarbonetos sempre requer a molécula de oxigênio como um co-substrato (HEIDER et al., 1999; ROJO, 2009). Na maioria das vias de degradação descritas, o substrato n-alcano é oxidado ao correspondente álcool por uma enzima monoxigenase terminal, em seguida, o álcool é oxidado ao aldeído correspondente, e transformado em um ácido graxo (VAN HAMME et al., 2003). Os ácidos graxos são conjugados à CoA e posteriormente processados pela β -oxidação para gerar Acetil-CoA (WENTZEL et al., 2007).

O sistema alceno hidroxilase consiste de três componentes: a alceno hidroxilase (monoxigenase), rubredoxina e rubredoxina redutase. A alceno hidroxilase está localizada na membrana citoplasmática e tem como função a transferência de um átomo de oxigênio da molécula de oxigênio para o substrato alceno. A rubredoxina redutase transfere elétrons de NADH para a rubredoxina, a qual por sua vez, transfere os elétrons para o componente catalítico, alceno hidroxilase (VAN HAMME et al., 2003).

A via de degradação de n-alcenos de cadeia média (C₆ a C₁₂) é extensivamente caracterizada para a bactéria gram-negativa *Pseudomonas putida* Gpo1. Esta linhagem carrega o plasmídeo OCT, o qual possui dois *operons*. O operon *alkBFGHJKL* codifica dois componentes do sistema alceno hidroxilase e enzimas envolvidas na via metabólica. Os produtos destes genes *alk* incluem uma alceno hidroxilase (AlkB), rubredoxinas (AlkF e AlkG), aldeído desidrogenase (AlkH), álcool desidrogenase (AlkJ), acil-CoA sintase (AlkK), e uma proteína de membrana externa provavelmente envolvida na captação do hidrocarboneto (AlkL). O outro operon *alkST* codifica um terceiro componente do sistema alceno hidroxilase, a rubredoxina redutase (AlkT), e um regulador positivo da expressão do operon *alkBFGHJKL* (AlkS) (CANOSA et al., 1999; VAN BEILEN et al., 2001), como mostrado na Figura 2.

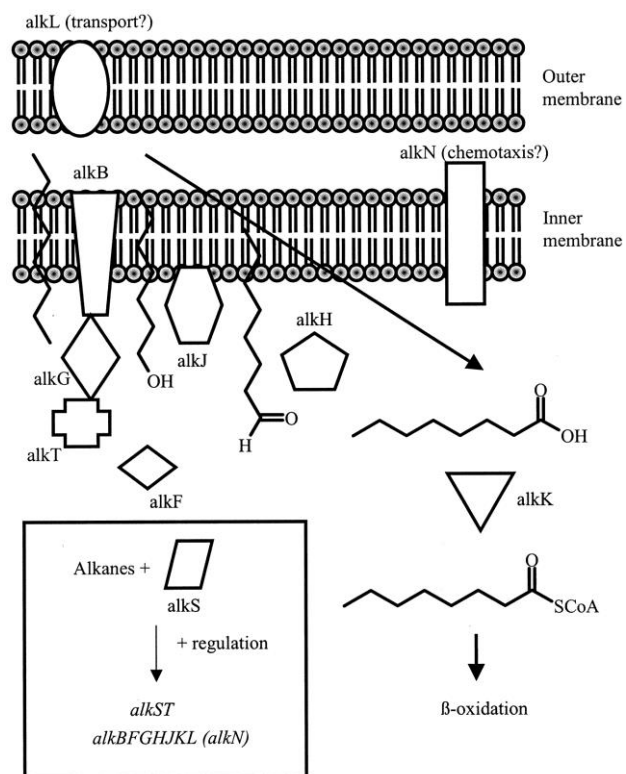


Figura 2. Via de degradação de n-alcanos de cadeia média, mostrando a localização e funções dos genes envolvidos no sistema alcano hidroxilase. Fonte: VAN HAMME et al. (2003).

A proteína reguladora, AlkS, na presença de alcano, ativa o promotor *PalkB* do operon *alkBFGHIKL*. Uma vantagem do mecanismo de *feedback* positivo na via *alk* é que ele promove uma rápida indução, assim como o rápido desligamento, quando os alcanos são consumidos (CANOSA et al., 2000). Sendo assim, *Pseudomonas putida* necessita de baixo nível de expressão do gene *alkS* para induzir a via para a degradação de alcanos. A expressão do sistema alcano hidroxilase é regulada em função da fonte de carbono, já que mesmo quando presente em alto nível, AlkS é incapaz de ativar a transcrição na ausência de um indutor apropriado, inibindo em nível transcricional a expressão dos genes envolvidos na degradação de alcanos (STAIJEN et al., 1999; CANOSA et al., 1999;

DINAMARCA et al., 2003). O plasmídeo OCT permite a *P. putida* utilizar alcanos como única fonte de energia e carbono (VAN BEILEN et al., 2001).

A organização dos genes envolvidos na oxidação de alcanos varia entre diferentes bactérias degradadoras, sendo que quase todas pertencem às classes α -, β -, γ -Proteobacteria e Actinobacteria (VAN BEILEN et al., 2003; COLEMAN et al., 2006). Foram descobertos como degradadores de alcanos isolados de *Bacillus*, *Geobacillus* (filo Firmicutes) e *Thermus* (filo Deinococcus-Thermus) (MARCHANT et al., 2006; MEINTANIS et al., 2006), e Flavobacteria e Sphingobacteria (filo Bacteroidetes-Chlorobi) foram encontrados em ambientes contaminados com óleo (BRAKSTAD; LODENG, 2005). Entre os eucariotos, muitos fungos e leveduras, e algumas algas, são conhecidos por degradarem estes hidrocarbonetos (VAN BEILEN et al., 2003).

Genes que estão estritamente relacionados ao gene alcano hidroxilase (*alkB*) de *P. putida* GPo1 têm sido detectados em grande parte da comunidade microbiana (VAN BEILEN et al., 2003, VAN BEILEN; FUNHOFF, 2005). Os genes *alkB* foram encontrados em várias bactérias que habitam ambientes diversos, incluindo sedimentos no Alasca (SOTSKY et al., 1994), solos contaminados (KNAEBEL; CRAWFORD, 1995), locais contaminados com óleo (GUO et al., 1997), aquíferos superficiais (STAPLETON; SAYLER, 1998) e solos do Ártico e da Antártica (WHYTE et al., 2002; KUHN et al., 2009; YERGEAU et al., 2009; PANICKER et al., 2010; BELL et al., 2013).

A organização dos genes *alk* em *Acinetobacter* sp. ADP1 é completamente diferente. Eles não estão contidos em um grande operon e nem agrupados ou localizados em um plasmídeo, mas ocorrem em uma aparente desordem no cromossomo de *Acinetobacter* (GRALTON et al., 1997). *Acinetobacter* sp. ADP1 é capaz de usar alcanos de cadeia longa com pelo menos 12 átomos de carbono como única fonte de carbono e energia. Isto requer pelo menos 5 genes essenciais: *rubAB*, que codifica rubredoxina e

rubredoxina redutase; *alkM*, que codifica a alcano hidroxilase; *alkR*, que codifica uma proteína com similaridade a um regulador transcricional e *xcpR*, o qual é parte da via geral de secreção (RATAJCZAK et al., 1998).

As alcano monoxigenases já tiveram seu sistema genético decifrado em uma grande variedade de bactérias, incluindo bactérias gram positivas e negativas como: *Rhodococcus erythropolis* NRRL B-16531, *Rhodococcus* sp. Q15, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Pseudomonas putida* GPo1, *Acinetobacter* sp. ADP1 e *Acinetobacter* sp. M-1 (WATKINSON; MORGAN, 1990; VAN BEILEN et al., 2002).

Ishige et al. (2000) encontraram uma proteína aldeído desidrogenase de cadeia longa na fração solúvel de células de *Acinetobacter* linhagem M-1 crescidas em n-alcano. Esta proteína é codificada pelo gene cromossomal *ald1*. Os autores mostraram, através de análises genéticas e bioquímicas, que essa proteína desempenha um papel significativo tanto no crescimento destas bactérias em n-alcanos, quanto na formação de ésteres em *Acinetobacter* sp. linhagem M-1.

Foram descobertos em *Geobacillus* sp. isolado de reservatório de petróleo dois sistemas de degradação de alcanos de cadeia longa utilizando uma monoxigenase solúvel (*soluble monooxygenase* - LadA) (FENG et al., 2007; ROJO, 2009), e uma monoxigenase ligada à flavina (*flavin-binding monooxygenase* - AlmA) em *Acinetobacter venetianus* isolado de uma cultura mista com capacidade de crescer em alcanos de cadeia longa (THRONE-HOLST et al., 2006; AMOURIC et al., 2009). Os estudos indicam que novas alcano hidroxilases ainda não foram identificadas e que poderiam incluir novas funções que ainda são desconhecidas, mas que são importantes para o metabolismo microbiano (ROJO, 2009).

Adicionalmente ao sistema AlkB, duas classes de enzimas de oxidação de n-alcanos não relacionadas com as alcano hidroxilases têm sido reportadas em bactérias. A

primeira classe é constituída pelas enzimas relacionadas à citocromo P450 (como CYP153), e a segunda corresponde a uma classe de alcano hidroxilases particuladas (pAHs). Esta última permite a um amplo grupo de Proteobacteria e Actinomycetales crescer em alcanos de C5 a C16 (HEISS-BLANQUET et al., 2005; VAN BEILEN; FUNHOLFF, 2007).

2.3.2 Dioxigenases que Hidroxilam Anéis Aromáticos (ARHDs)

Os hidrocarbonetos aromáticos, assim como os alifáticos, são utilizados como fonte de carbono e energia por diversos micro-organismos que, ao longo da evolução, adaptaram suas habilidades de crescimento nesses substratos. O metabolismo bacteriano de hidrocarbonetos aromáticos abrange uma grande variedade de vias periféricas que ativam substratos estruturalmente diversos em um número limitado de intermediários comuns sendo, em seguida, clivados e processados por poucas vias centrais ao metabolismo da célula (CARMONA et al., 2009). O processo de degradação de compostos aromáticos resulta na produção de succinato, acetil-CoA, ácido pirúvico, ácido acético e aldeídos, todos eles utilizados por micro-organismos na síntese de constituintes celulares e energia, e com os subprodutos dessas reações sendo CO₂ e água (MISHRA et al., 2001). O mecanismo que permite às bactérias degradar membros específicos da grande diversidade de compostos aromáticos tem sido estudado em vários isolados bacterianos pertencentes aos filos Proteobacteria e Actinobacteria (BRENNEROVA et al., 2009).

A degradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias, sob condições aeróbicas, começa com a adição da molécula de oxigênio ao anel aromático pela enzima dioxigenase (Figura 3). Estas enzimas pertencem a uma grande família conhecida como dioxigenases que hidroxilam anéis aromáticos (*Aromatic Ring Hydroxylating Dioxigenases*

- ARHD). Todos os membros dessa família possuem uma ou duas proteínas transportadoras de elétron, dependendo do substrato e da origem da enzima (GIBSON; PARALES, 2000). ARHD como benzoato, naftaleno, bifenilo, tolueno e benzeno dioxigenases são complexos enzimáticos formados por três ou quatro subunidades protéicas. Estes complexos catalisam uma reação redox na qual dois oxigênios moleculares são incorporados ao anel aromático do substrato à custa da oxidação de NADH (GIBSON; PARALES, 2000).

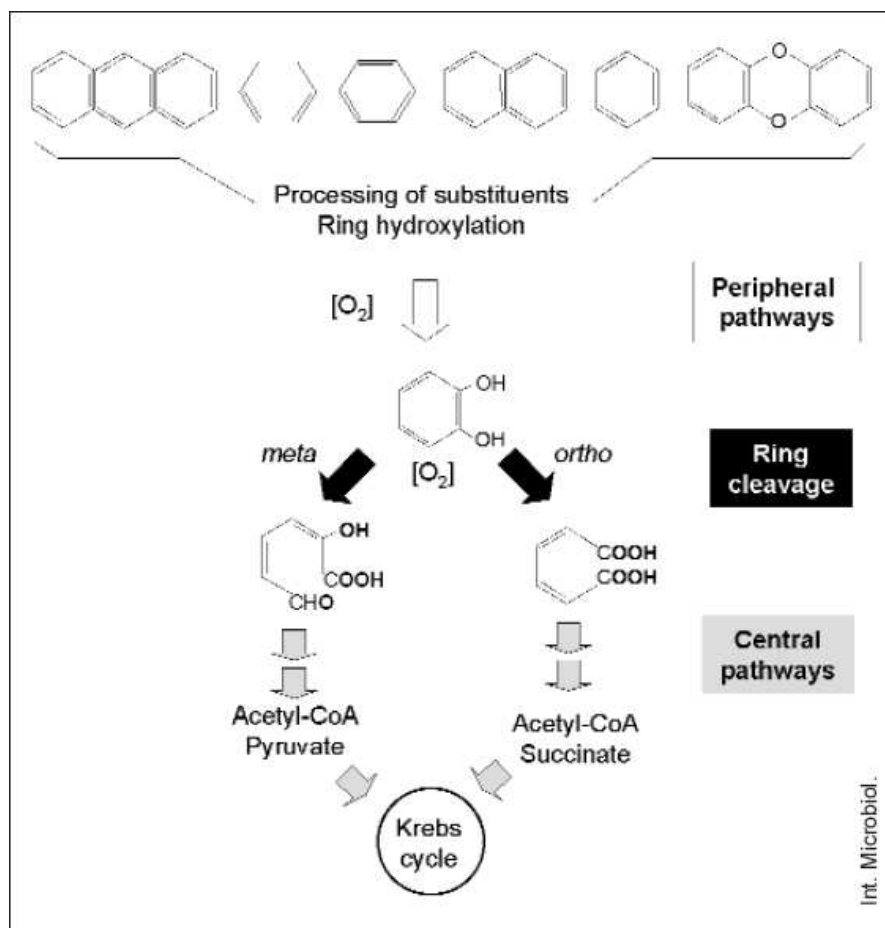


Figura 3. Via genérica de degradação aeróbia de hidrocarbonetos aromáticos pela enzima dioxigenase. Fonte: DÍAZ et al. (2004).

Até 2001, as dioxigenases multicomponentes foram classificadas de acordo com o Sistema de Classificação de Batie em 3 diferentes grupos, levando-se em consideração o

número de constituintes do complexo enzimático e a natureza dos centros catalíticos de óxi-redução (BATIE et al., 1991). Esse método de classificação foi baseado nas dioxigenases que possuíam o centro catalítico Rieske e um ferro mononuclear. Porém, a classificação através do transporte de elétrons não se mostrou eficaz para a organização dos novos grupos de oxigenases caracterizados e identificados. Desse modo, Nam et al. (2001) propuseram um novo sistema de classificação baseado na homologia das sequências de aminoácidos do componente terminal das oxigenases, que é a região que apresenta a atividade enzimática da proteína e reflete uma relação filogenética entre as enzimas. Na nova classificação, os autores encontraram 4 grupos distintos dentre as 54 dioxigenases analisadas, sendo o grupo I composto por oxigenases que possuem apenas uma subunidade α , enquanto que os grupos II, III e IV são formados por oxigenases com duas subunidades, α e β . As dioxigenases do grupo II são as benzoato e toluato dioxigenases, as do grupo III são a naftaleno e as HPAs dioxigenases e as do grupo IV são dioxigenases que degradam moléculas de benzeno, tolueno e bifenilo (NAM et al., 2001).

Enzimas que pertencem à mesma família de dioxigenase evoluíram de um único ancestral comum para adquirir uma nova função catabólica através de vários eventos genéticos, como transferência gênica horizontal, dada por plasmídeos conjugativos, plasmídeos integrativos e transposons, recombinação, duplicação, mutação pontual múltipla, deleção e integração gênica (HARTNETT et al., 1990; HARAYAMA et al., 1991; NOJIRI et al., 2004; SPRINGAEL; TOP, 2004). Na natureza, a aquisição de genes pela transferência gênica horizontal é uma das principais formas de evolução constante dos micro-organismos para a degradação de diversos substratos através de novas vias metabólicas.

Chadhain et al. (2006) avaliaram a degradação de hidrocarbonetos aromáticos, como naftaleno, fenantreno e pireno, em uma série de experimentos de enriquecimentos. Para tal, os autores desenvolveram *primers* tendo como alvo o conservado centro Rieske da dioxigenase que oxida os HPAs estudados. Os resultados sugerem que ambientes contaminados podem abrigar uma ampla diversidade do perfil de genes funcionais durante a biodegradação de uma variedade de HPAs.

Flocco et al. (2009) analisaram a ocorrência e a diversidade do gene naftaleno dioxigenase no solo da Antártica. Os genes foram amplificados pela técnica de nested-PCR, analisados por DGGE e quantificados por PCR em tempo real. Uma análise filogenética das sequências mostrou uma grande homologia com o gene naftaleno dioxigenase de *Pseudomonas (nahAc)* e com elementos genéticos móveis relacionados. Os resultados sugerem que existe uma microdiversidade de genes relacionados com o *nahAc* na comunidade microbiana dos solos da Antártica e que a sua relativa abundância aumentou em resposta a fontes antropogênicas de poluição.

Recentemente, genes que codificam dioxigenases foram encontrados em várias bactérias que habitam ambientes diversos, incluindo reservatórios de petróleo (VERDE et al., 2013), solos de praia e sedimentos profundos contaminados com óleo (LAMENDELLA et al., 2014; MASON et al., 2012), detritos em canos de petróleo (JOSHI et al., 2014), lodos ativados (FANG et al., 2013; SILVA et al., 2013) e solos do Ártico (YERGEAU et al., 2012).

2.3.3. 6-oxociclohex-1-eno-1-carbonil-CoA Hidroxilase – *bamA*

Como demonstrado nas últimas décadas de pesquisa em microbiologia do petróleo, determinados micro-organismos são capazes de metabolizar hidrocarbonetos sob condições anaeróbicas. Os hidrocarbonetos que podem ser degradados anaerobicamente incluem alcanos e alcenos alifáticos com cadeias de tamanho de 6 a 20

átomos de carbono, alcilbenzenos monocíclicos, tais como tolueno, etilbenzeno, propilbenzeno, isômeros de xileno e etiltolueno, assim como benzeno e naftaleno (HEIDER et al., 1999). Na ausência de oxigênio como aceptor final de elétron, a conservação de energia pode ser realizada pela respiração anaeróbica com nitrato, íon férrico ou sulfato. Sendo assim, toda linhagem anaeróbica degradadora de hidrocarboneto é desnitrificante, redutora de íon férrico ou redutora de sulfato (HEIDER et al., 1999; VAN HAMME et al., 2003).

O crescimento dos micro-organismos anaeróbios e a taxa de biodegradação é significativamente mais baixa em comparação com bactérias degradadores aeróbias (WENTZEL et al., 2007). As bactérias anaeróbias mais intensamente estudadas, por seu considerável rápido crescimento e rendimento no laboratório, são as espécies desnitrificantes *Thauera aromática* K172 e *Aromatoleum aromaticum* EbN1. O novo gênero proposto por Wöhlbrand et al. (2007), "*Aromatoleum*", compreende desnitrificantes de vida livre com notáveis capacidades de degradação, distintos dos gêneros relacionados *Thauera* e *Azoarcus* (HEIDER; RABUS, 2008).

O tolueno tem sido o hidrocarboneto mais estudado com respeito à caracterização genética e enzimática das bactérias desnitrificantes *Azoarcus* sp. linhagem T, *Thauera aromática* linhagem K172 e *Thauera* sp. linhagem T1 (ACHONG et al., 2001; BELLER et al., 1999; COSCHIGANO et al., 2000; HERMUTH et al., 2002; LEUTHNER et al., 1998). Na via proposta, a adição do fumarato ao tolueno para a formação de benzilsuccinato é mediada pela enzima benzilsuccinato sintase. Uma série de reações de β -oxidação ocorre para converter o benzilsuccinato para benzil-CoA, o qual é o intermediário central na degradação anaeróbica de compostos aromáticos (BELLER; SPORMANN, 1998).

O gene que codifica a 6-oxociclohex-1-eno-1-carbonil CoA hidrolase (*bamA*) tem sido utilizado para a detecção de uma ampla gama de micro-organismos anaeróbios que

degradam hidrocarbonetos (KUNTZE et al., 2008). A 6-oxociclohex-1-eno-1-carbonil-CoA hidroxilase faz parte da via de degradação benzoil-CoA, pela qual a maioria dos substratos aromáticos (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno, Xileno - BTEX e também outros compostos aromáticos) é degradada (STAATS et al., 2011) (Figura 4). Kuntze e colegas (2008) analisaram sequências do gene *bamA* e desenharam *primers* degenerados para a amplificação deste gene. Os autores observaram que esse gene é altamente conservado em todas as bactérias anaeróbias estudadas que usam substratos aromáticos para o seu crescimento.

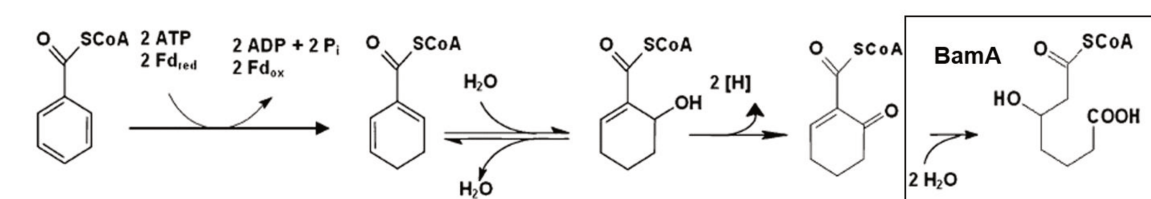


Figura 4. Via Benzoil-CoA de degradação anaeróbia de compostos aromáticos. A reação evidenciada pelo quadrado é catalisada pela enzima 6-oxociclohex-1-eno-1-carbonil-CoA hidroxilase. Fonte: KUNTZE et al. (2008).

Staats e colaboradores (2011) estudaram a diversidade e distribuição de bactérias anaeróbias que degradam hidrocarbonetos em aquíferos no período de 1999 e 2004 utilizando a técnica de PCR com os *primers* para os genes *bssA* e *bamA*. Os autores encontraram o gene *bssA* em números de cópias 10 vezes menor, dos quais somente uma pequena fração foi relacionada aos genes da bactéria redutora de ferro *Georgfuchsia toluolica*, que cresce apenas na presença de monoaromáticos como o tolueno e o etilbenzeno. Já com relação ao gene *bamA*, as sequências relacionadas à família *Geobacteraceae* foram dominantes. Os autores sugerem que *Georgfuchsia* spp. possuem um papel fundamental na degradação de alquilbenzenos, enquanto as bactérias da família

Geobacteraceae estão envolvidas na degradação de compostos aromáticos diferentes que o tolueno e o xileno.

2.4. Métodos moleculares no estudo da diversidade de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos

Visando o entendimento das vias aeróbia e anaeróbia de degradação em bactérias que utilizam os hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia, técnicas tradicionais de microbiologia têm sido amplamente adotadas, como métodos baseados em cultivo e análises das características morfológicas, metabólicas e fisiológicas.

Embora as técnicas de cultivo tenham sido aprimoradas e tenham permitido a recuperação *in vitro* de um número crescente de micro-organismos ainda não cultivados (LEADBETTER, 2003), o conhecimento sobre sua ecologia permanece insuficiente para cultivar a maioria deles. Sabe-se que apenas uma pequena fração da diversidade microbiana na natureza, em torno de 1 a 10%, pode ser hoje cultivada em laboratório (AMANN et al., 1995; HUGENHOLTZ et al., 1998). Além disso, uma só espécie de micro-organismo não é capaz de degradar uma variedade de hidrocarbonetos presentes no petróleo, sendo necessária a atuação de um grupo de microbianos que possua uma ampla diversidade enzimática capaz de agir sobre os hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (OKERENTUNGBA; EZERONYE, 2003; KANALY; HARAYAMA, 2000). Neste contexto, tornam-se evidentes as limitações impostas pelo uso isolado de culturas puras nos estudos de biodegradação.

Com a rápida expansão no campo da biologia molecular, métodos para avaliar o perfil da comunidade de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos passaram a ser utilizados, como as técnicas de bibliotecas de genes RNAr 16S, ARDRA (*Amplified ribosomal DNA restriction analysis*), RISA (*Ribosomal intergenic spacer analysis*), DGGE

(*Denaturing gradient gel electrophoresis*), TGGE (*temperature gradient gel electrophoresis*), T-RFLP (*Terminal-restriction fragment length polymorphism*), FISH (*Fluorescent in situ hybridization*), PCR Multiplex e em tempo real, SIP (*Stable Isotope Probing*), e DNA *microarray* (BELLER et al., 2002; BALDWIN et al., 2003; BONCH-OSMOLOVSKAYA et al., 2003; RHEE et al., 2004; SETTE et al., 2007; MALIK et al., 2008; BELL et al., 2011). A utilização destas metodologias vem permitindo uma avaliação mais ampla e precisa da diversidade microbiana no ambiente e a descoberta de novos grupos de organismos, nunca antes cultivados (GIOVANNONI et al., 1990; AMANN et al., 1995; HUGENHOLTZ et al., 1998a).

A utilização de plataformas de sequenciamento de segunda geração, como o pirosequenciamento – 454 GS FLX (Roche) ou *Genome Analyser* (Illumina) tem atraído a atenção por ser uma poderosa ferramenta de investigação em nível taxonômico e funcional, gerando um grande número de sequências a custo relativamente baixo e permitindo a detecção e quantificação de milhares de genes, mesmo em baixa abundância (DEGNAN; OCHMAN, 2012).

Os genomas da comunidade microbiana total, chamados coletivamente de *metagenoma* (HANDELSMAN et al., 1998), possuem muito mais informação genética do que aquela observada na diversidade microbiana cultivada. O estudo dos microorganismos, suas funções e interações entre si e com o ambiente, através das informações obtidas a partir de seus genomas é chamado de Genômica Ambiental ou Metagenômica. Esta área de pesquisa relativamente nova permite o estudo genômico e acesso ao potencial metabólico de organismos ainda não cultivados no laboratório.

As técnicas desenvolvidas para a análise de ácidos nucleicos, DNA e RNA, extraídos de populações microbianas mistas e usados em diferentes estratégias moleculares a fim de determinar a complexidade da comunidade, quantificar e identificar

membros na população nos permite estudar a diversidade microbiana em um nível diferente, o nível genético. A análise do DNA fornece informação sobre a composição de espécies de comunidades microbianas, e a análise do RNA pode revelar a atividade metabólica ou “função” de populações microbianas particulares (MALIK et al., 2008). No caso de comunidades microbianas biodegradadoras, a abordagem metagenômica constitui-se como uma excelente ferramenta para a descoberta de novas vias catabólicas, principalmente de micro-organismos fastidiosos ou ainda não-cultivados, ou mesmo daqueles que vivem em consórcios e não podem ser recuperados isoladamente.

Muitos pesquisadores vêm utilizando o metagenoma para estudar a comunidade microbiana em muitos ambientes, incluindo solo contaminado com diesel (YERGEAU et al., 2012), refinarias de petróleo (SILVA et al., 2013), água marinha (GILBERT et al., 2008), solo (URICH et al., 2008), intestino (QIN et al., 2010) e cavidade oral (LAZAREVIC et al., 2009) de humanos, campos de petróleo (AN et al., 2013), entre outros. O acesso aos genes dos micro-organismos ainda não cultivados representa um grande potencial para a descoberta de novos produtos gênicos, como metabólitos secundários com atividade biológica ou vias de degradação de xenobióticos.

Dada a enorme quantidade de dados de sequências geradas, a abordagem metagenômica tem representado um desafio metodológico e computacional (LI, 2009). Assim vários métodos e recursos têm sido desenvolvidos para responder a esta demanda, através de conjuntos de dados simulados como IMG/M (MARKOWITZ et al., 2008), CAMERA (SESHADRI et al., 2007), MG-RAST (AZIZ et al., 2008), ferramentas taxonômicas como MEGAN (HUSON et al., 2007), comparações estatísticas (RODRIGUEZ-BRITO et al., 2006), análises de diversidade funcional (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2008), entre outros (LI, 2009).

O uso combinado de técnicas de enriquecimento e a metagenômica pode constituir uma ferramenta valiosa na avaliação microbiológica de amostras de petróleo, permitindo o acesso a novas sequências, genes, rotas metabólicas completas e seus produtos (HARDEMAN; SJÖLING, 2007). Isto permitirá obter informações detalhadas sobre a composição dessas comunidades e sobre seu envolvimento potencial nos processos de biodegradação do petróleo, ampliando o conhecimento sobre a diversidade das vias de degradação utilizadas por micro-organismos nestes ambientes, que permanece ainda recente e escasso.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar a diversidade de genes de degradação de hidrocarbonetos diretamente a partir de amostras de óleo biodegradado e não biodegradado de reservatórios da Bacia potiguar (RN), utilizando metodologias independentes de cultivo. Além disto, foi realizada a análise filogenética e funcional da microbiota recuperada em enriquecimentos microbianos, além da quantificação dos genes expressos, durante a biodegradação do óleo, a fim de investigar as vias catabólicas envolvidas nas diferentes fases de degradação do óleo.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliação da diversidade de genes de degradação aeróbia e anaeróbia de hidrocarbonetos (alcano monoxigenases - *alk*, dioxigenases que hidroxilam anéis aromáticos – ARHDs, e 6-oxociclohex-1-eno-1-carbonil-CoA hidroxilase - *bamA*) presentes em poços de petróleo biodegradado e não-biodegradado, utilizando métodos independentes de cultivo;
- Detecção e quantificação dos genes catabólicos de degradação de hidrocarbonetos presentes e expressos nos enriquecimentos microbianos em diferentes etapas da biodegradação do óleo através de *Microarray* e PCR Tempo Real;
- Análise da diversidade filogenética e funcional de enriquecimentos microbianos aeróbios obtidos a partir de amostras de petróleo biodegradado utilizando a plataforma de sequenciamento Illumina.

4. APRESENTAÇÃO DA TESE

Esta tese foi dividida em três capítulos. O **Capítulo 1** é constituído do artigo publicado no periódico *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology* intitulado “*Diversity of hydrocarbon-related catabolic genes in oil samples from Potiguar Basin (RN, Brazil)*”. Neste artigo estão descritas as metodologias de extração de DNA diretamente a partir de amostras de petróleo provenientes do poço de petróleo biodegradado GMR 75 e não biodegradado PTS01 da Bacia Potiguar, a construção de bibliotecas de genes *alk*, *ARHD* e *bamA* de degradação aeróbia e anaeróbia, e as análises de diversidade filogenética.

O **Capítulo 2** abrange as atividades de enriquecimentos microbianos aeróbios, a partir de amostras de petróleo provenientes do poço GMR 75 da Bacia Potiguar, as etapas de extração de DNA e RNA, e a quantificação dos genes e seus transcritos através da técnica de PCR Tempo Real e DNA *Microarray*.

O **Capítulo 3** é constituído do artigo submetido ao periódico internacional PLoS ONE intitulado “*Integrated Metagenomic and Metatranscriptomic Analysis of Aerobic Enrichments from a Petroleum Reservoir in Northeast Brazil*”. Neste artigo estão descritas a realização de enriquecimentos microbianos aeróbios, a partir de amostras de petróleo provenientes do poço GMR 75 da Bacia Potiguar, as etapas de extração de DNA e RNA, o sequenciamento em larga escala do DNA e cDNA utilizando a plataforma Illumina e as análises da diversidade filogenética e funcional dos enriquecimentos.

CAPÍTULO 1 - Diversity of hydrocarbon-related catabolic genes in oil samples from Potiguar Basin (RN, Brazil). Leandro C. L. Verde; Tiago R. Silva; Bruna M. Dellagnezze; Eugênio V. dos Santos Neto; Valéria M. Oliveira. Publicado no *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*.



Diversity of Hydrocarbon-Related Catabolic Genes in Oil Samples from Potiguar Basin (RN, Brazil)

Leandro Costa Lima Verde¹, Tiago Rodrigues e Silva¹, Bruna Martins Dellagnezze¹, Eugênio Vaz dos Santos Neto² and Valéria Maia de Oliveira^{1*}

¹Research Center for Chemistry, Biology and Agriculture (CPQBA), Campinas University - UNICAMP, CP 6171, CEP 13081-970, Campinas, SP, Brazil

²Petrobras R&D Center, Cidade Universitária, Quadra 7, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 21949-900, Brazil

Abstract

Biodegradation may result in physicochemical changes in crude oil and natural gas properties, being responsible for the decrease of saturated hydrocarbons and yielding heavy oil with low economic value. Studies on the diversity of microbial catabolic genes in oil reservoirs are scarce and could help to predict the potential of a petroleum sample to be biodegraded. The aim of this study was to evaluate the diversity of genes involved in hydrocarbon degradation in Brazilian petroleum samples (biodegraded and non-biodegraded) through the construction and analysis of gene libraries (alkane monooxygenase – *alk*, dioxygenase – ARHDs and 6-oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA hydrolase – *bamA*). The results showed a differential distribution of catabolic genes between the sites, being the biodegraded oil more diverse for the *alk* and *bamA* genes. Sequences were similar to the *alkB* genes from *Geobacillus thermoleovorans* and several species of *Acinetobacter*, to ARHD genes from *Pseudomonas* spp. and two species of *Burkholderia*, and to *bamA* genes from deltaproteobacteria. Interestingly, most of the catabolic sequences recovered from both petroleum reservoirs grouped together forming distinct clusters in the phylogenetic tree reconstruction and may correspond to potentially new genes, possibly harbored by yet uncultivated microorganisms. This is the first report on the detection of *alk*, ARHD and *bamA* genes in petroleum reservoir environments, demonstrating the genetic potential of such microbial communities to biodegrade the oil.

Keywords: Petroleum microbiology, Microbial diversity; Oil degradation; Catabolic genes; Biodegradation, Hydrocarbons, *Geobacillus*, Oil

Introduction

Most of the world's oil is biodegraded and while the effects of biodegradation on the molecular composition and physical properties of crude oil and natural gas are relatively well known empirically, the actual processes that occur during the biodegradation of oil in deep reservoirs (below some hundred meters) remain unclear [1]. During biodegradation, the hydrocarbon content is transformed, with a consequent increase in oil density, sulfur content, acidity and viscosity. All these factors interfere with the extraction and refining operations, resulting in significant economic losses [2]. On the other hand, the mechanisms of oil degradation in petroleum reservoirs, as well as the microorganisms involved are still poorly understood.

Oil is a complex mixture of hydrocarbons such as saturated, unsaturated, linear, monoaromatic and polycyclic hydrocarbons [3,4]. Each of these compounds is biodegraded through different routes of several steps. Many studies have already demonstrated the existence of large and diverse populations of microbes with different metabolic activities in petroleum systems [5,6].

Nonetheless, knowledge of the diversity of catabolic genes involved in the processes of degradation of oil is still scarce. Information on community composition of bacteria and genes involved in the biodegradation process can bring light on the understanding of microbial metabolic pathway preferences, as well as a better application of specific microorganisms in biodegradation or bioremediation processes. Techniques able to identify the genes involved in the catabolic degradation of hydrocarbons are valuable tools for elucidating the structure of the microbial community that is truly functional in the environment.

This study examined the diversity of the functional gene involved in the degradation of hydrocarbons, the alkane hydroxylase (*alk*) gene,

a membrane-bound enzyme that catalyzes the terminal or sub terminal oxidation of n-alkanes (C₅-C₁₆) for primary or secondary alcohols, which is the initial step in the aerobic degradation of n-alkanes [7]. Alkane monooxygenase proteins have had their genetics deciphered in a wide variety of bacteria, including Gram positive and negative such as *Rhodococcus erythropolis* NRRL B-16531, *Rhodococcus* sp. Q15, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Pseudomonas putida* GPO1, *Acinetobacter* sp. ADP1 and *Acinetobacter* sp. M-1 [8-11]. Alkane monooxygenases were found in bacteria that inhabit diverse environments, including sediments in Alaska [12], contaminated soils [13,14], cold ecosystems [15,16], shallow aquifer [17] and soils of the Arctic and Antarctica [18-21].

The functional gene involved in the aerobic degradation of aromatic hydrocarbons, the dioxygenase protein coding gene, was also analyzed in this study. The first step in the degradation of aromatic hydrocarbons usually occurs through the incorporation of molecular oxygen in aromatic nucleus by a multicomponent enzyme system, forming cis-dihydrodiol. In this system, the terminal dioxygenase is composed of one large α subunit and one small β subunit [22]. The α -subunit contains two conserved regions: the Rieske center [Fe₂-S₂] and the

*Corresponding author: Valéria Maia de Oliveira, Research Center for Chemistry, Biology and Agriculture (CPQBA), Campinas University - UNICAMP, CP 6171, CEP 13081-970, Campinas, SP, Brazil, Tel. : +55-19-2139 2874; E-mail: vmaia@cpqba.unicamp.br

Received November 26, 2012; Accepted March 07, 2013; Published March 15, 2013

Citation: Verde LCL, e Silva TR, Dellagnezze BM, Santos Neto EV, de Oliveira VM (2013) Diversity of Hydrocarbon-Related Catabolic Genes in Oil Samples from Potiguar Basin (Rn, Brazil). J Pet Environ Biotechnol 4: 138. doi:10.4172/2157-7463.1000138

Copyright: © 2013 Verde LCL, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

catalytic domain containing mononuclear iron [23]. The dioxygenases belong to a large family known as aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases (ARHDs) [24]. These genes are located in chromosomal or plasmid DNA and were identified in bacterial strains belonging to α -Proteobacteria (*Sphingomonas*) [25], β -Proteobacteria (*Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Polaromonas*, *Ralstonia*) [26-28] and γ -Proteobacteria (*Pseudomonas*) [29].

The process of biodegradation in subsurface reservoirs is often anaerobic in nature [2,6]. Most degraded oils contain metabolic markers for the anaerobic degradation, such as specific reduced naphthoic acids, indicating that the anaerobic metabolism of oil is the mechanism by which most biodegraded oil in the world were produced [30].

Therefore, research on the anaerobic degradation of hydrocarbons is also necessary for the understanding of the whole process of oil degradation in reservoirs. In this sense, this study also examined *bamA*, the functional gene involved in the degradation route of benzyl-CoA, by which most aromatic substrates (benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes and also other aromatic compounds) are anaerobically degraded [31]. *bamA* gene encodes the protein 6-oxociclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA hydrolase (6-OCH-CoA) and has been used for the detection of a wide range of anaerobic microorganisms able to degrade hydrocarbons [32]. This functional marker was recently used to detect anaerobic hydrocarbon-degrading micro-organisms in environmental samples [32], as well as to study the microbial community structure of sulfate-reducing enrichment cultures growing on petroleum hydrocarbons, where *Desulfosarcina ovata* was showed to be dominant [33]. *bamA* was also used as a biomarker to investigate the diversity of hydrocarbon-degrading bacteria under iron-reducing conditions in a leachate contaminated aquifer, with *bamA* sequences found to be closely related to the ones from *Geobacter* species and *Georgfuchsia toluolica* [31].

This study aimed at investigating the presence and diversity of catabolic genes involved in the hydrocarbon degradation process in biodegraded and non-biodegraded oil samples from petroleum reservoirs through the construction and analyses of *alk*, ARHD and *bamA* gene libraries. The results allowed us to evaluate the effectiveness of the primer sets used as a tool to analyze the community structure of bacteria that have the genetic potential to degrade hydrocarbons by aerobic and anaerobic pathways.

Materials and Methods

Sampling

Oil samples (naturally mixed with formation water) were collected

in July 2008 from two production wells, named GMR75 and PTS1, at the onshore Potiguar Basin (Northeast, Brazil), with logistic support from CENPES/Petrobras. Sampling details as well as oil characteristics and geological settings are given in Silva et al. [34].

Total DNA extraction and PCR amplification *alk*, ARHD and *bamA* genes

DNA extraction from oil/formation water samples was carried out using the PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, California), according to the manufacturer's instructions. Five tubes from the kit were used to start with the DNA extraction. At the end of the procedure, DNA samples obtained from the five tubes were pooled, concentrated and used for subsequent PCR amplification. Crude oil/formation water samples were not filtered or centrifuged before DNA extraction. The PCR amplifications of the three functional genes were performed independently using the respective set of primers (Table 1) [35]. Twenty five microliter reaction mixtures contained 5 μ l of total DNA, 1 U *Platinum Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 0.2 mM dNTP mix (GE Healthcare), 1.2 μ M of each primer, 1X *Taq* buffer and 1.5 mM MgCl₂. PCR amplifications were done using an Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf Scientific, New York, USA) with the programs shown in table 2. The amplification products were checked by electrophoresis in 1.2% (wt vol⁻¹) Agarose gels. Four replicate PCR reactions were done for each sample with each pair of primers. The corresponding PCR replicates were then pooled and concentrated in a speed vacuum concentrator 5301 Eppendorf, A-2-VC rotor.

Clone library construction and sequencing

The PCR products amplified with functional gene-targeted primer pairs were cloned using the pGEM-T Easy Vector (Promega), according to manufacturer's guidelines, and transformed into *Escherichia coli* JM 109 cells. The functional gene-targeted inserts were amplified from plasmid DNA of selected clones using the universal the M13 forward (5'-CGCCAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3') and reverse (5'-TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC-3') primers. PCR was performed in a 50 μ L-reaction volume, containing 1 μ L of an overnight clone culture, 0.4 μ M each primer, 0.2 mM dNTP mix, 2 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 1X *Taq* buffer, and 1.5 mM MgCl₂. The amplification program consisted of an initial denaturation step at 94°C for 3 min, followed by 30 cycles of 94°C/20 s, 60°C/20 s, and 72°C/90 s. PCR products were purified as previously described for automated sequencing in the MegaBace DNA Analysis System 500 (GE Healthcare) and ABI Prism 377 DNA Sequencer™ (Applied Biosystems). The sequencing was carried out with the corresponding primers used for PCR amplification. The sequencing programs consisted of 30 cycles of

Primer	Gene target	Sequence (5' → 3')	Direction	Expected Amplicon size (bp)	Reference
alkF	<i>alk</i>	GCICAIGARITIRKICAYAA	forward	524	[19]
alkR	<i>alk</i>	GCITGITGICISWRTGICGYTG	reverse		
ARHDf	α -ARHD	TTYRYITGYAIITAYCAYGGITGGG	forward	329	[35]
ARHDr	α -ARHD	AAITKYTCIGCIGSIRMYTTCCA	reverse		
SP9f	<i>bamA</i>	CAGTACAAYTTCTACACVACBG	forward	300	[32]
ASP1r	<i>bamA</i>	CMATGCCGATYTCCTGRC	reverse		

Table 1: Oligonucleotide primers used for PCR assays.

Primer set	Initial denaturation	Cycle number	Denaturation	Annealing	Extension (72°C)	Final extension (72°C)
alkF/alkR	97°C, 3 min	35	94°C, 1 min	48°C, 1 min	1 min	5 min
ARHDf/ARHDr	97°C, 3 min	35	94°C, 1 min	58°C, 1 min	1 min	5 min
SP9f/ASP1r	94°C, 10 min	35	94°C, 30 s	59°C, 45 s	1 min	10 min

Table 2: Polymerase chain reaction programs used in this study.

94°C/20 s, 43°C/20 s, and 72°C/90 s for *alk* gene, 30 cycles of 94°C/20 s, 53°C/20 s, and 72°C/90 s for ARHD gene and 30 cycles of 94°C/20 s, 54°C/20 s, and 72°C/90 s for *bamA* gene.

Phylogenetic analysis

The partial sequences from GMR75 and PTS01 clones were assembled in a *contig* (consensus sequence) using the phred/Phrap/CONSED program [36]. Nucleotide sequences were translated into protein sequences using the translate tool in the ExpAsy (Expert Protein Analysis System) proteomics server of the Swiss Institute of Bioinformatics (<http://us.expasy.org/tools/dna.html>). Deduced protein sequences from each library were grouped into Operational Protein Families (OPFs) using MOTHRUR version 1.14.0 [37]. The cutoff value was selected after initial examination of phylogenetic trees that included all protein sequences generated by neighbor-joining analysis [38] using MEGA5 software [39], with 1,000 bootstrap replicates. Deduced protein sequences were aligned using ClustalX, version 1.83 [40], with related reference sequences identified from BLASTp searches, in addition to other sequences of several representative *alkB*, ARHD and *bamA* sequences identified from the literature.

Diversity indices and statistics

Diversity index calculations (α -diversity measures) were performed individually for each catabolic gene library with the program MOTHRUR [37]. Rarefaction curves were calculated using the OPF cutoff values established based on MOTHRUR analyses in combination with phylogenetic clustering of the catabolic sequences. In addition, the Shannon (H') diversity index, Simpson index [41], and the nonparametric richness estimators ACE (abundance-based coverage estimator) [42] and Chao1 [43] were calculated for each community based on each target gene.

Nucleotide sequences accession numbers

The partial sequences of *alk*, ARHD and *bamA* genes determined in this study for the environmental clones were deposited at the GenBank database under the accession numbers: *alk* - JX171303-JX171314, ARHD - JX512729-JX512738 and *bamA* - JX512739-JX512747. It is worth to note that only one representative sequence of each OPF was deposited at the database.

Results and Discussion

The composition of microbial communities in samples from Brazilian petroleum fields was determined by the construction and analysis of three functional gene libraries: *alk*, ARHDs and *bamA*. In the case of *alk* gene libraries, 63 clones from GMR75 oil sample (biodegraded) and 87 clones from PTS01 oil sample (non-biodegraded) were obtained. For the ARHDs gene libraries, 88 clones from GMR75 sample and 80 clones from PTS01 sample were obtained, and about 90 clones from GMR75 library and 93 clones from PTS01 library were obtained for the *bamA* gene.

Operational Protein Family (OPF) was defined based on cutoff values at 93% dissimilarity level between sequences [44] in the case of *alk* gene, and 96% and 97% for the ARHDs and *bamA* genes, respectively. These cutoff values were selected based on the analysis of the phylogenetic trees of total clones in combination with MOTHRUR analysis. Shannon, ACE and CHAO1 scores indicated that the GMR75 library is more diverse than the PTS01 library for the two functional genes analyzed (Table 3).

In both libraries of the *alk* gene, all 150 sequences showed the

Library (n ^a)	Richness ^b	ACE ^c	Chao1 ^d	Shannon ^e	1/Simpson ^f
<i>alk</i> (cut-off 93%)					
GMR75 (63)	10	14	12	1.69	4.52
PTS01 (87)	5	9.21	6.5	0.80	1.60
ARHD (cut-off 96%)					
GMR75 (88)	4	4	4	1.15	2.90
PTS01 (80)	7	13	9	1.34	3.48
<i>bamA</i> (cut-off 97%)					
GMR75 (90)	7	20	9	1.16	2.66
PTS01 (93)	6	7	6	0.97	1.99

^a Number of gene sequences analyzed.

^b Richness is based on observed unique OTUs.

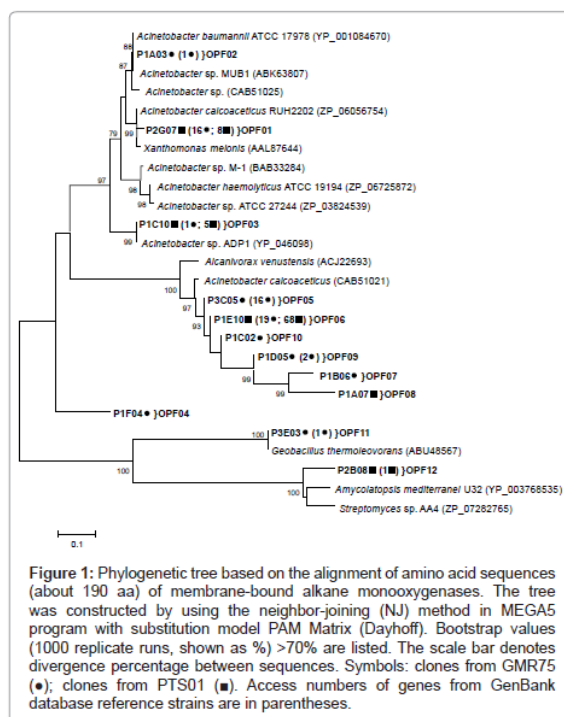
^c Nonparametric statistical prediction of total richness of different OTUs and OPFs based on distribution of abundant (10) and rare (10) OTUs.

^d Nonparametric statistical predictions of total richness of OTUs and OPFs based on distribution of singletons and doubletons.

^e Shannon diversity index. A higher number represents more diversity.

^f Reciprocal of Simpson's diversity index. A higher number represents more diversity.

Table 3: Diversity indices and richness estimators of the functional gene clone libraries.



presence of the two internal conserved regions (motif B, EHXXGHH and motif C, NYXEHYG) [45,46] and matched with *alk* genes from GenBank using the BLASTX program. Seven OPFs in GMR75, 2 OPFs in PTS01 and 3 OPFs composed by sequences from both *alk* gene libraries were found (Figure 1).

One of these OPFs (OPF 11) matched with the *alkB* gene from *Geobacillus thermoleovorans*, which has the ability to grow in oil and its

hydrocarbon degradation capacity was reported in an extensive study of the genus *Geobacillus* [47]. This bacterium has been commonly isolated from petroleum reservoirs, especially high temperature oil fields [48,49]. *Geobacillus* spp. has attracted industrial interest due to their potential applications in biotechnological processes as sources of various thermostable enzymes [50]. Shestakova and co-authors [51] also detected the presence of *Geobacillus*-like organisms in the *alk* gene RNA library and in the 16S rRNA gene library from hydrocarbon-oxidizing aerobic enrichments from a high-temperature petroleum reservoir in China, showing the predominance and functional activity of *geobacilli*.

Three of the *alk* OPFs (01, 02 and 03) matched with genes from *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus* and some strains of *Acinetobacter* spp. *Acinetobacter* spp. are widespread in nature and can be obtained from water, soil and living organisms. They can use various carbon sources for growth [52]. Sette et al. [53] characterized and compared the bacterial community structure of two distinct samples (non-biodegraded and highly biodegraded oils) from a petroleum field in Brazil and showed that the genus *Acinetobacter* was exclusive to and predominant in the biodegraded oil sample. Bacteria belonging to this genus are known to be involved in biodegradation and are considered one of the most efficient oil degraders [9,11,52]. The OPF04 was represented by only one sequence, which was recovered in a clearly separate cluster, not related to any previously identified *alk* sequences present in the public database (Figure 1). This OPF is a great candidate for a putative new *alk* gene from a bacterium indigenous to the oil reservoir. A great number of OPFs (05, 06, 07, 08, 09 and 10) were grouped together and were somewhat distantly related to sequences of organisms represented in the databases. These results indicate the presence of novel putative alkane monooxygenase genes in petroleum reservoirs not previously identified in any other environment or isolate. Kuhn and colleagues [19] found a differential distribution of *alk* genes between two sites of Antarctic marine environments, and the predominant presence of new *alk* genes, mainly in the pristine site. Recently, Miquelto et al. [54] also observed a higher diversity of an alkane hydroxylase gene in petroliferous soil sample in comparison to a non-petroliferous soil. The authors showed that most of the alkane hydroxylase genes corresponded to potentially new genes.

Diversity analyses clearly showed profound differences between GMR75 and PTS01 libraries. ACE and Chao estimators yielded higher richness values of *alk* genes in the GMR75 library (Table 3). Both

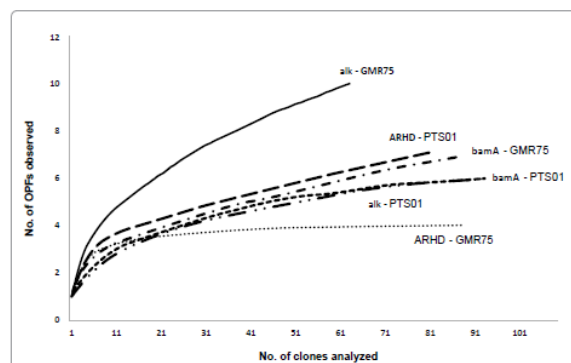


Figure 2: Rarefaction analysis of *alk*, ARHD and *bamA* deduced protein sequences from the GMR75 and PTS01.

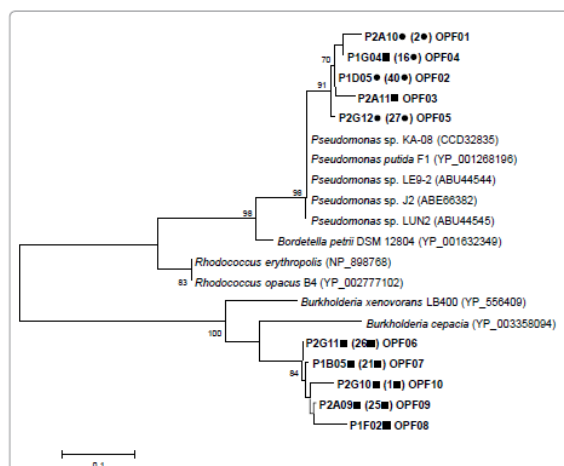
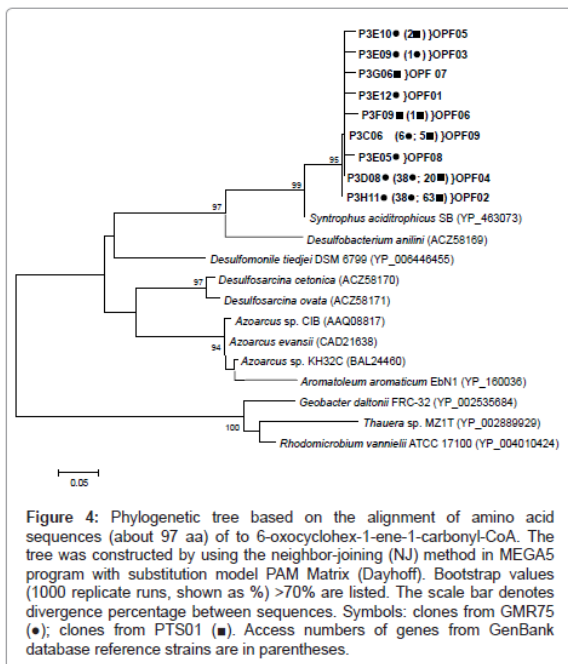


Figure 3: Phylogenetic tree based on the alignment of amino acid sequences (about 86 aa) of aromatic ring hydroxylating dioxygenase. The tree was constructed by using the neighbor-joining (NJ) method in MEGA5 program with substitution model PAM Matrix (Dayhoff). Bootstrap values (1000 replicate runs, shown as %) >70% are listed. The scale bar denotes divergence percentage between sequences. Symbols: clones from GMR75 (●); clones from PTS01 (■). Access numbers of genes from GenBank database reference strains are in parentheses.

Shannon and Simpson diversity indices were consistent with rarefaction analyses, showing higher diversity of *alk* sequences in GMR75 library than in the PTS01 library (Table 3 and Figure 2).

In the ARHD gene libraries, the majority of the sequences from both libraries matched with ARHD genes from GenBank using the BLASTx program. Phylogenetic analysis revealed 3 OPFs exclusive to the GMR75 library, 6 OPFs exclusive to the PTS01 library and 1 OPF composed by sequences from both libraries (Figure 3). Five OPFs (OPFs 01, 02, 03, 04 and 05) were related with dioxygenase genes from several species of *Pseudomonas*. The enzymes for the degradation of aromatic hydrocarbons have been reported to be encoded by genes located on plasmids (e.g., TOL, NAH, SAL, OCT, and CAM) in *Pseudomonas* spp. [55]. A new genetic organization and co-regulation of a cluster of genes involved in the first steps of phenol and benzene catabolic pathways was described in *Pseudomonas* spp. M1 [56]. The authors showed that, differently from the established models for *Pseudomonas* upper pathway, the *Pseudomonas* spp. M1 exhibited exceptional biodegradation ability towards a wide range of toxic and/or recalcitrant compounds. On the other hand, 5 OPFs (OPFs 06, 07, 08, 09 and 10) were related with dioxygenase genes from *Burkholderia cepacia* and *Burkholderia xenovorans*. These two species have been extensively studied in terms of degradation of the low-molecular-weight PAHs naphthalene and phenanthrene [57] and detected in many crude-oil samples [34,58,59].

Cunha et al. [60] isolated bacteria of the genus *Bacillus* from the rock of an oil reservoir in Brazil and detected the presence of catechol dioxygenase genes in 4 *Bacillus* isolates by PCR. Interestingly, in the present study none of the ARHD gene sequences analyzed matched with ARHD genes from *Bacillus* strains represented in the databases. In addition, rarefaction analysis of ARHD genes (Figure 2) yielded plateau-shaped curves, indicating that the ARHD gene diversity in the environment was close to saturation and the sampling effort was satisfactory. These results might suggest that ARHD genes belonging to the genus *Bacillus* are simply not present in Potiguar oil samples,



or that they could not be detected due to extremely low abundance or to bias inherent to the DNA extraction (differential lysis) and/or PCR techniques (preferential amplification).

Phylogenetic analysis of *bamA* gene libraries obtained from samples GMR75 and PTS01 (Figure 4) showed that nine OPFs were grouped together and were somewhat distantly related to sequences of organisms represented in the databases, being *bamA* genes from *Syntrophus aciditrophicus* and *Desulfobacterium anilini* the closest described sequences. *Syntrophus aciditrophicus* is a bacterium that degrades a wide range of organic compounds, including alcohols, fatty acids, and hydrocarbons, including methane, which are degraded syntrophically under anaerobic conditions [61]. *Desulfobacterium anilini* is a sulfate-reducing bacterium known to be involved in phenol degradation [62]. Kuntze et al. [32] observed that the *bamA* gene was highly conserved among organisms studied by the group. In the present study, most of the clone sequences from the oil samples GMR75 and PTS01 were clustered into OPF02 and OPF04 (Figure 4), demonstrating that the gene under study has indeed a conserved region. In addition, all of the 183 sequences obtained from GMR75 and PTS01, showed none or low similarity level to the sequences from reference organisms. This suggests that the sequences corresponding to the *bamA* gene recovered from the petroleum reservoirs are potentially new sequences.

In spite of the higher diversity indices observed for the GMR75 library in the case of *alk* and *bamA* genes, the same was not observed for the ARHD gene. ACE and Chao indices indicated that the GMR75 library contained more distinct OPFs (more richness) than the PTS01 library for both catabolic genes (Table 3). Shannon and Simpson diversity indices also showed higher diversity of *alk* and *bamA* sequences in library GMR75 than in library PTS01. These results suggested that the bacterial communities of the biodegraded and non-biodegraded oil reservoirs are different also on the distribution of such catabolic genes.

A recent paper published by our research team [34] reported the microbial communities present in the same oil samples used in the present work, originated from the biodegraded (GMR75) and non-biodegraded (PTS1) terrestrial reservoirs from Potiguar Basin, by using 16S rRNA gene libraries. The authors demonstrated likewise the presence of the genera *Acinetobacter*, *Geobacillus*, *Pseudomonas* and *Syntrophus* in the microbial community. These results are in agreement with the ones found in the present work, confirming the presence of bacteria bearing catabolic genes involved in the process of biodegradation. However, Silva et al. [34] found the predominance of *Geobacillus* in the microbial community of PTS1 sample, but no representative of this genus was found in the GMR75 sample. These results are in contrast with those found in the present work, since *alk* genes similar to *Geobacillus* alkane monooxygenases were found only in the GMR75 oil. These contrasting results could be explained by the fact that the sampling effort was not sufficient to cover both phylogenetic [34] and functional diversity (Figure 2) present in these oil samples. On the other hand, Silva et al. [34] suggested that anaerobic metabolism is the dominant process for hydrocarbon degradation in GMR75 oil field, corroborating with the result that the biodegraded oil sample was more diverse for the *bamA* gene.

In conclusion, the combined results obtained from the catabolic gene libraries showed that both oil samples contained *alk*, ARHD and *bamA* genes related to genes present in bacterial species known to be hydrocarbon-degraders, such as *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Geobacillus*, *Burkholderia* and deltaproteobacteria. Nonetheless, subsets of the catabolic sequences recovered from both petroleum reservoirs may correspond to new genes endemic to such environments, possibly harbored by yet uncultivated and unidentified microorganisms. Moreover, it is important to point out that this was the first work using degenerate primers to detect the presence of functional genes involved in the degradation of hydrocarbons in petroleum reservoirs, demonstrating the genetic potential of such microbial communities to biodegrade the oil. However, such biodegradation will only occur if the environmental conditions are appropriate for the metabolism of the degrading microorganisms. Curiously, the non-biodegraded oil sample showed to be more diverse in terms of the catabolic genes ARHD, suggesting that the environmental parameters that control biodegradation are playing a major role in differentiating both biodegraded and non-biodegraded oil reservoirs. As previously detailed in Silva et al. [34], the oil sample GMR75 has been classified as moderately biodegraded, produced from a reservoir with an *in situ* temperature of 42.2°C at a depth of 535.5-540.5 m. On the other hand, the PTS1 sample has been classified as non-biodegraded, collected from a deeper and hotter reservoir, with an *in situ* temperature of 48.3°C at a depth of 801-803 m [63]. Both oils were collected in the same basin, but they are related to different petroleum systems, so different source rocks and reservoirs. These discrepancies *in situ* temperature, depth and, possibly, in source rock composition and water salinity might explain the functional differences of the hydrocarbon degrading populations between both reservoirs. It is worth to mention that studies carried out with DNA sequences shows only the bacteria with potential to degrade oil, requiring further studies at the level of gene expression and GC-MS assays for the precise evaluation of the degradation process.

Finally, the results obtained allowed us to confirm the effectiveness of the primer sets used for the analysis of the community structure of bacteria that have the genetic potential to degrade hydrocarbons by aerobic and anaerobic pathways. The application of molecular methods for the rapid detection of specific microorganisms or genes in environmental samples is a valuable tool for studies focusing on

diversity, abundance and distribution of hydrocarbon degradation populations, providing new insights into the diversity of catabolic genes in the oil reservoir environment and allowing a better understanding of the role of microorganisms on the biodegradation process.

Acknowledgements

We thank PETROBRAS for the financial support, donation of samples and authorization to publish this work. L. C. L. Verde was supported by grants from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). The authors are grateful to Rubens T. D. Duarte for technical assistance.

References

- Röling WF, Head IM, Larter SR (2003) The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. *Res Microbiol* 154: 321-328.
- Connan J (1984) Biodegradation of crude oils in reservoirs. *Advances in Petroleum Geochemistry*. Academic Press, London, UK.
- Van Hamme JD, Singh A, Ward OP (2003) Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 503-549.
- Higashioka Y, Kojima H, Sato S, Fukui M (2009) Microbial community analysis at crude oil-contaminated soils targeting the 16S ribosomal RNA, xylM, C23O, and bcr genes. *J Appl Microbiol* 107: 126-135.
- Magot M, Ollivier B, Patel BK (2000) Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie Van Leeuwenhoek* 77: 103-116.
- Aitken CM, Jones DM, Larter SR (2004) Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs. *Nature* 431: 291-294.
- van Beilen JB, Li Z, Duetz WA, Smits THM, Witholt B (2003) Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment. *Oil & Gas Sci Technol – Rev IFF* 58: 427-440.
- Watkinson RJ, Morgan P (1990) Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation* 1: 79-92.
- Smits TH, Balada SB, Witholt B, van Beilen JB (2002) Functional analysis of alkane hydroxylases from gram-negative and gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 184: 1733-1742.
- van Beilen JB, Smits TH, Whyte LG, Schorch S, Röthlisberger M, et al. (2002) Alkane hydroxylase homologues in Gram-positive strains. *Environ Microbiol* 4: 676-682.
- van Beilen JB, Funhoff EG (2007) Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 13-21.
- Sotsky JB, Greer CW, Atlas RM (1994) Frequency of genes in aromatic and aliphatic hydrocarbon biodegradation pathways within bacterial populations from Alaskan sediments. *Can J Microbiol* 40: 981-985.
- Knaebel DB, Crawford RL (1995) Extraction and purification of microbial DNA from petroleum-contaminated soils and detection of low numbers of toluene, octane and pesticide degraders by multiplex polymerase chain reaction and Southern analysis. *Mol Ecol* 4: 579-591.
- Guo C, Sun W, Harsh JB, Ogram A (1997) Hybridization Analysis of Microbial DNA from Fuel Oil-Contaminated and Noncontaminated Soil. *Microb Ecol* 34: 178-187.
- Whyte LG, Greer CW, Inniss WE (1996) Assessment of the biodegradation potential of psychrotrophic microorganisms. *Can J Microbiol* 42: 99-106.
- Yergeau E, Arbour M, Brousseau R, Juck D, Lawrence JR, et al. (2009) Microarray and real-time PCR analyses of the responses of high-arctic soil bacteria to hydrocarbon pollution and bioremediation treatments. *Appl Environ Microbiol* 75: 6258-6267.
- Stapleton RD, Sayler GS (1998) Assessment of the Microbiological Potential for the Natural Attenuation of Petroleum Hydrocarbons in a Shallow Aquifer System. *Microb Ecol* 36: 349-361.
- Whyte LG, Smits TH, Labbé D, Witholt B, Greer CW, et al. (2002) Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531. *Appl Environ Microbiol* 68: 5933-5942.
- Kuhn E, Bellicanta GS, Pellizari VH (2009) New alk genes detected in Antarctic marine sediments. *Environ Microbiol* 11: 669-673.
- Panicker G, Mojib N, Aislabie J, Bej AK (2010) Detection, expression and quantitation of the biodegradative genes in Antarctic microorganisms using PCR. *Antonie Van Leeuwenhoek* 97: 275-287.
- Bell TH, Yergeau E, Martineau C, Juck D, Whyte LG, et al. (2011) Identification of nitrogen-incorporating bacteria in petroleum-contaminated arctic soils by using [¹⁵N]DNA-based stable isotope probing and pyrosequencing. *Appl Environ Microbiol* 77: 4163-4171.
- Kauppi B, Lee K, Carredano E, Parales RE, Gibson DT, et al. (1998) Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure* 6: 571-586.
- Cébron A, Norini MP, Beguiristain T, Leyval C (2008) Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHDalpha) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *J Microbiol Methods* 73: 148-159.
- Gibson DT, Parales RE (2000) Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 11: 236-243.
- Romine MF, Stillwell LC, Wong KK, Thurston SJ, Sisk EC, et al. (1999) Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *J Bacteriol* 181: 1585-1602.
- Goyal AK, Zylstra GJ (1996) Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. *Appl Environ Microbiol* 62: 230-236.
- Jeon CO, Park M, Ro HS, Park W, Madsen EL (2006) The naphthalene catabolic (nag) genes of *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2: evolutionary implications for two gene clusters and novel regulatory control. *Appl Environ Microbiol* 72: 1086-1095.
- Laurie AD, Lloyd-Jones G (1999) The phn genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. *J Bacteriol* 181: 531-540.
- Simon MJ, Osslund TD, Saunders R, Ensley BD, Suggs S, et al. (1993) Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. *Gene* 127: 31-37.
- Head IM, Jones DM, Larter SR (2003) Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature* 426: 344-352.
- Staats M, Braster M, Röling WF (2011) Molecular diversity and distribution of aromatic hydrocarbon-degrading anaerobes across a landfill leachate plume. *Environ Microbiol* 13: 1216-1227.
- Kuntze K, Shinoda Y, Moutakki H, McInerney MJ, Vogt C, et al. (2008) 6-Oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-coenzyme A hydrolases from obligately anaerobic bacteria: characterization and identification of its gene as a functional marker for aromatic compounds degrading anaerobes. *Environ Microbiol* 10: 1547-1556.
- Higashioka Y, Kojima H, Fukui M (2011) Temperature-dependent differences in community structure of bacteria involved in degradation of petroleum hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. *J Appl Microbiol* 110: 314-322.
- Silva TR, Verde LCL, Santos Neto EV, Oliveira VM (2012) Diversity analyses of microbial communities in petroleum samples from Brazilian oil fields. *Int Biodeter Biodegr*.
- Bellicanta GS (2005) Diversity of catabolic genes in sediment samples of Santos and São Vicente Estuarine Systems, SP. *Biota Neotropica* 5.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 8: 175-185.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, et al. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75: 7537-7541.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- Hall BG (2013) Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. *Mol Biol Evol*.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.
- Magurran AE (2004) *Measuring Biological Diversity*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.

42. Chao A, Ma MC, Yang MCK (1993) Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. *Biometrika* 80: 193-201.
43. Chao A (1984) Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat* 11: 265-270.
44. Schloss PD, Handelsman J (2008) A statistical toolbox for metagenomics: assessing functional diversity in microbial communities. *BMC Bioinformatics* 9: 34.
45. Smits TH, Röthlisberger M, Witholt B, van Beilen JB (1999) Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains. *Environ Microbiol* 1: 307-317.
46. van Beilen JB, Smits TH, Roos FF, Brunner T, Balada SB, et al. (2005) Identification of an amino acid position that determines the substrate range of integral membrane alkane hydroxylases. *J Bacteriol* 187: 85-91.
47. Turova TP, Nazina TN, Mikhaĭlova EM, Rodionova TA, Ekimov AN, et al. (2008) AlkB homologues in thermophilic bacteria of the genus *Geobacillus*. *Mol Biol (Mosk)* 42: 247-257.
48. Onstott TC, Phelps TJ, Colwell FS, Ringelberg D, White DC, et al. (1998) Observations pertaining to the origin and ecology of microorganisms recovered from deep subsurface Taylorsville Basin, Virginia. *Geomicrobiol J* 15: 353-385.
49. Kato T, Miyayama A, Kanaya S, Morikawa M (2009) Alkane inducible proteins in *Geobacillus thermoleovorans* B23. *BMC Microbiol* 9: 60.
50. McMullan G, Christie JM, Rahman TJ, Banat IM, Teman NG, et al. (2004) Habitat, applications and genomics of the aerobic, thermophilic genus *Geobacillus*. *Biochem Soc Trans* 32: 214-217.
51. Shestakova NM, Korshunova AV, Mikhailova EM, Sokolova DSH, Tourova TP, et al. (2011) Characterization of the aerobic hydrocarbon-oxidizing enrichments from a high-temperature petroleum reservoir by comparative analysis of DNA and RNA derived clone libraries. *Microbiology* 80: 60-69.
52. Barbe V, Vallenet D, Fonknechten N, Kreimeyer A, Oztas S, et al. (2004) Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic Acids Res* 32: 5766-5779.
53. Sette LD, Simioni KC, Vasconcellos SP, Dussan LJ, Neto EV, et al. (2007) Analysis of the composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91: 253-266.
54. Miqueleto PB, Andreote FD, Dias AC, Ferreira JC, Dos Santos Neto EV, et al. (2011) Cultivation-independent methods applied to the microbial prospection of oil and gas in soil from a sedimentary basin in Brazil. *AMB Express* 1: 35.
55. Irie S, Doi S, Yorifuji T, Takagi M, Yano K (1987) Nucleotide sequencing and characterization of the genes encoding benzene oxidation enzymes of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 169: 5174-5179.
56. Santos PM, Sá-Correia I (2007) Characterization of the unique organization and co-regulation of a gene cluster required for phenol and benzene catabolism in *Pseudomonas* sp. M1. *J Biotechnol* 131: 371-378.
57. Laurie AD, Lloyd-Jones G (2000) Quantification of *phnAc* and *nahAc* in contaminated New Zealand soils by competitive PCR. *Appl Environ Microbiol* 66: 1814-1817.
58. Yoshida N, Yagi K, Sato D, Watanabe N, Kuroishi T, et al. (2005) Bacterial communities in petroleum oil in stockpiles. *J Biosci Bioeng* 99: 143-149.
59. Korenblum E, Souza DB, Penna M, Seldin L (2012) Molecular analysis of the bacterial communities in crude oil samples from two Brazilian offshore petroleum platforms. *Int J Microbiol* 2012: 156537.
60. da Cunha CD, Rosado AS, Sebastián GV, Seldin L, von der Weid I (2006) Oil biodegradation by *Bacillus* strains isolated from the rock of an oil reservoir located in a deep-water production basin in Brazil. *Appl Microbiol Biotechnol* 73: 949-959.
61. McInerney MJ, Rohlin L, Mouttaki H, Kim U, Krupp RS, et al. (2007) The genome of *Syntrophus aciditrophicus*: life at the thermodynamic limit of microbial growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 7600-7605.
62. Ahn YB, Chae JC, Zylstra GJ, Häggblom MM (2009) Degradation of phenol via phenylphosphate and carboxylation to 4-hydroxybenzoate by a newly isolated strain of the sulfate-reducing bacterium *Desulfobacterium anilini*. *Appl Environ Microbiol* 75: 4248-4253.
63. dos Santos Neto EV, Hayes JM (1999) Use of hydrogen and carbon stable isotopes characterizing oils from the Potiguar Basin (Onshore), Northeastern Brazil. *AAPG Bulletin* 83: 496-518.

Citation: Verde LCL, e Silva TR, Dellagnezze BM, Santos Neto EVd, de Oliveira VM (2013) Diversity of Hydrocarbon-Related Catabolic Genes in Oil Samples from Potiguar Basin (Rn, Brazil). *J Pet Environ Biotechnol* 4: 138. doi:10.4172/2157-7463.1000138

Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

Special features:

- 250 Open Access Journals
- 20,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: <http://www.editorialmanager.com/envirosci>

CAPÍTULO 2 – Quantificação dos genes catabólicos e sua expressão em enriquecimento microbiano aeróbio utilizando a técnica de PCR em Tempo Real

2.1. INTRODUÇÃO

O isolamento e o cultivo microbiano a partir de amostras de petróleo têm revelado uma grande variedade de organismos nestes ambientes (MAGOT et al., 2000; SETTE et al., 2007). A utilização combinada de técnicas de biologia molecular com métodos baseados em cultivo tradicionais tem sido utilizada em estudos microbiológicos do petróleo, proporcionando uma visão mais precisa da diversidade microbiana em tais ambientes extremos (VOORDOUW et al., 1996; ORPHAN et al., 2000). Informações sobre a composição da comunidade e perfis enzimáticos podem trazer uma compreensão das preferências metabólicas microbianas, produzindo informações sobre estes microorganismos que podem ser aplicadas em processos biotecnológicos, como, por exemplo, biorremediação.

Os mecanismos enzimáticos envolvidos na degradação aeróbia de hidrocarbonetos por bactérias têm sido extensivamente estudados por várias décadas (Boll e Heider, 2010), sendo as enzimas monoxigenases e alceno hidroxilases bem caracterizadas no processo da biodegradação aeróbia de hidrocarbonetos (ROJO et al., 2009). As comparações de fragmentos de genes *alkB* mostram uma diversidade muito alta destas proteínas no ambiente, incluindo genes *alkB* de uma mesma espécie (VAN BEILEN et al., 2003; MARCHANT et al., 2006; VAN BEILEN; FUNHOLFF, 2007; XU et al., 2008).

O mecanismo que permite às bactérias degradar membros específicos da grande diversidade de compostos aromáticos tem sido estudado em várias cepas bacterianas isoladas, predominantemente pertencentes aos filos Proteobacteria e Actinobacteria (BRENNEROVA et al., 2009). As dioxigenases são enzimas chave na degradação de compostos aromáticos e muitas dessas proteínas foram descritas, purificadas e caracterizadas nas últimas décadas (BRENNEROVA et al., 2009).

A utilização de métodos tradicionais dependentes de cultivo é de grande relevância em estudos microbiológicos, pois permitem a investigação de aspectos genéticos, fisiológicos e taxonômicos. Contudo, pode consumir muito tempo e somente refletir uma pequena porcentagem da comunidade microbiana e seu conteúdo genético presente no ambiente. A utilização das técnicas de PCR em Tempo Real e *Microarray* podem fornecer resultados mais precisos para estimar a diversidade a abundancia de genes e seus transcritos envolvidos no processo de biodegradação de hidrocarbonetos pelos micro-organismos em ambientes contaminados (CÉBRON et al., 2008).

O objetivo deste trabalho consistiu em quantificar os genes catabólicos (*alk* e ARHD) e sua expressão em um enriquecimento microbiano aeróbio de amostras do reservatório de petróleo biodegradado (GMR75), através da técnica de PCR em Tempo Real e DNA *Microarray*, além de avaliar a degradação do petróleo em relação ao tempo através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Amostras

As amostras de petróleo utilizadas neste trabalho foram coletadas sob condições de assepsia em julho de 2008 na Bacia Potiguar (RN) (Tabela 1), transportadas ao laboratório da Divisão de Recursos Microbianos com o suporte logístico da Petrobrás e mantidas à temperatura ambiente até o seu processamento.

Tabela 1. Detalhes sobre os poços amostrados na Bacia de Potiguar, Rio Grande do Norte.

Poços	T(°C)	Profundidade (m)	Grau de biodegradação
GMR75	42,2	535,5 - 540,5	biodegradado
PTS01	48,3	801 - 803	Não biodegradado
SER17	57,2	3247 - 3262	biodegradado
PTS02	52,7	846 - 848	Não biodegradado

Foram utilizadas as amostras provenientes dos poços GMR75 e PTS01 para a construção de bibliotecas de genes catabólicos (*alk*, *ARHD* e *bamA*), descritas no Capítulo 1 desta tese. No caso dos enriquecimentos microbianos descritos neste capítulo, em função do volume do óleo GMR75 não ser suficiente para todos os ensaios, a amostra de óleo do poço SER 17 foi utilizada como inóculo. Este óleo também é classificado como biodegradado, o que aumenta a chance de recuperação de microbiota potencialmente ativa para analisar o processo de biodegradação do petróleo. O óleo do poço PTS02, considerado não biodegradado, foi utilizado como substrato nos enriquecimentos com o intuito de avaliar o processo de biodegradação por cromatografia.

2.2.2 Enriquecimento da microbiota aeróbia de petróleo

O enriquecimento da microbiota aeróbia a partir das amostras de óleo foi realizado em frascos “SCHOTT” com capacidade para 1 litro, utilizando-se 800 mL de meio Bushnell Haas (BH) como meio basal. Este último constitui meio mineral amplamente descrito pela literatura para experimentos envolvendo micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos (ERIKSSON et al., 2000; SETTE et al., 2007).

O meio Bushnell Haas foi composto pelos seguintes reagentes:

Composição	Volume
KH ₂ PO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
NH ₄ NO ₃	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
FeCl ₃	0,05 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g
Água Milli-Q	1 L

O pH do meio BH foi ajustado para 7,0, seguindo-se a distribuição de volumes de 800 mL em frascos Schott (1 L) e esterilização em autoclave durante 20 min a 1 atm.

Após seu preparo, o meio foi adicionado de 10 g de arenito e 10 cubos de espumas de poliuretano, previamente esterilizados. Seguiu-se a aplicação de hexadecano e fenantreno como substrato (4 mL). Uma alíquota de 8 mL de óleo do poço GMR75 foi diluído (1:1) em tween 80 e usado como inóculo. Os enriquecimentos, utilizando-se ambos os substratos (hexadecano e fenatreno), foram realizados em quadruplicata e incubados em estufa em agitador rotacional a 130 rpm e 28°C por 30 dias. Estas condições foram empregadas a fim de se obter resultados de biodegradação em curto período de tempo, conforme já havia sido realizado em estudo prévio do grupo (VASCONCELLOS et al., 2009).

Após este período, a biomassa foi recuperada e inoculada novamente em frascos “SCHOTT” com capacidade para 1 litro contendo 600 mL de meio Bushnell Haas (BH), utilizando os mesmos procedimentos descritos acima. Porém, neste caso, uma alíquota de 6 mL do óleo não biodegradado do poço PTS01 esterilizado foi utilizada como substrato e cerca de 6 g de células recuperadas da biomassa do 1º enriquecimento do óleo do poço GMR75 foi usado como inóculo. O experimento consistiu de 6 pontos de amostragem (após 5; 10; 15; 20; 25 e 30 dias), realizada em triplicata, e 5 controles

(controle 1 contendo o petróleo do poço GMR75 e a solução de vitaminas; controle 2 contendo o petróleo do poço PTS01 autoclavado e a solução de vitaminas; controle 3 contendo petróleo do poço PTS01 autoclavado e as células recuperadas, submetido à autoclagem; controle 4 somente o meio; controle 5 contendo as células recuperadas sem o petróleo do poço PTS01, submetido à autoclavagem), totalizando 23 frascos.

2.2.3 Análise da degradação do óleo nos enriquecimentos através de CG-EM

Após o período de incubação dos enriquecimentos aeróbios, prosseguiu-se com a extração da fase orgânica. As análises de cromatografia para avaliação da degradação de hidrocarbonetos do petróleo pela microbiota recuperada nos enriquecimentos foram realizadas no laboratório de Química Orgânica, no Instituto de Química da UNICAMP, sob a supervisão da Profa. Anita Marsaioli.

Na extração utilizou-se uma alíquota de 50 mL do enriquecimento acrescido de 20 mL de acetato de etila, agitação e separação das fases orgânica e aquosa (2x). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio ($MgSO_4$) e evaporada sob o fluxo de N_2 . O extrato obtido foi diluído em éter etílico e metilado por diazometano. O extrato metilado foi seco sob fluxo de N_2 , pesado e solubilizado em 1 mL de acetato de etila. A partir desta solução, foi feito o cálculo (através da fórmula $C1.V1 = C2.V2$) determinando a massa necessária para obter-se 1 mg/mL do extrato para injeção no CG-EM. Em seguida evaporou-se o solvente e adicionou-se 1 mL de hexano. Utilizou-se heptadecano na concentração de 0,03 mg/mL como padrão interno para a quantificação da atividade biodegradadora dos micro-organismos, através de análises cromatográficas.

Os índices de biodegradação foram obtidos por CG-EM, utilizando-se cromatógrafo gasoso HP6890 *Agilent*, acoplado a detector de massas HP 5970-MSD usando uma rampa de 80°C/2 min aquecido até 270°C a 4°C/min, e depois até 300°C a

10°C/min, ficando a 300 graus por 25 minutos. A coluna utilizada foi uma MDN5S 30 metros, injetor tipo split (20:1), tendo He como gás de arraste, fluxo de 1 mL/min, coluna capilar de sílica fundida do tipo HP-5MS, cuja fase estacionária consiste de 5% de fenil metil silicone. Os dados foram adquiridos utilizando-se o modo SCAN e os valores de massa variaram entre 50 e 700 u.m.a. Tal metodologia de monitoramento dos ensaios de biodegradação CG-EM já é consolidada pelos componentes deste grupo de pesquisa, apresentando-se eficiente na quantificação e qualificação dos produtos gerados a partir do metabolismo microbiano de biomarcadores do petróleo.

2.2.4 Extração de RNA e DNA dos cultivos enriquecidos

A extração de DNA dos enriquecimentos foi precedida pela adição de 20% de solução aquosa de Tween 80 a 10%. O DNA foi extraído no Instituto de Biotecnologia de Montreal (*NRC Biotechnology Research Institute - Canadá*), sob a supervisão do Prof. Charles Greer. Os *pellets*, obtidos do volume total do enriquecimento microbiano centrifugado, foram suspensos em 1,0 mL de tampão PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,76 mM, pH 7,4). A esta solução foi adicionada lisozima (100 µL de uma solução 100 mg/mL), e os microtubos foram mantidos a 37°C durante 60 minutos. A seguir, foram adicionados 4 µL da enzima proteinase K (solução estoque 10 mg/mL) e 75 µL de SDS (solução 20%), e incubação a 60°C durante 60 minutos. Foram realizados 4 ciclos de “freeze-thaw” (ciclos de 3 min a 80°C, alternados por 3 min em gelo seco com etanol absoluto), de forma a promover a lise mecânica das paredes celulares microbianas. Foi adicionado 1 vol. de pérolas de vidro a cada microtubo, e este agitado manualmente por 90 segundos. Igual volume de fenol saturado (Tris-HCl pH 8,0) foi adicionado às soluções para limpeza, seguido de centrifugação por 5 minutos a 12.000 rpm. Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para novo microtubo, adicionado

de 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e centrifugado novamente por 10 minutos a 13.000 rpm e 10°C. A fase superior foi transferida para novo microtubo e precipitada com 10% v/v de NaCl 5 M e etanol absoluto (2 volumes) a -70°C *overnight*. Após precipitação do DNA, o *pellet* foi centrifugado por 20 minutos a 10.000 rpm e 4°C. O *pellet* foi lavado 2 vezes com 800 µL de etanol 70% gelado e centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Depois de seco, o DNA foi suspenso em 40 µL de água Milli-Q esterilizada e estocado em freezer a -20°C. A integridade e concentração do DNA obtido foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen). A quantificação do DNA das amostras foi realizada utilizando o kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen).

A extração de RNA dos enriquecimentos foi também realizada no Instituto de Biotecnologia de Montreal (*NRC Biotechnology Research Institute - Canadá*), segundo o método descrito por Winderickx e Castro (1994), com modificações. As células foram suspensas em 800 µL de tampão de extração (EDTA 1 mM; LiCl 0,1 M; Tris 0,1 M, pH 7,5) e, a seguir, adicionadas de 800 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) contendo 80 µL de SDS 10%. Após agitação em vortex, a solução foi centrifugada por 4 minutos a 10.000 rpm e 4°C e o sobrenadante transferido para um microtubo novo. Todo o processo foi repetido até que a interface não fosse mais visível. O RNA foi precipitado através da adição de acetato de sódio 40% (1/20 do volume) e etanol absoluto (2 volumes) a -70°C *overnight*. Após precipitação do RNA, a solução foi centrifugada por 8 minutos a 10.000 rpm e 4°C. O *pellet* foi lavado 2 vezes com 1 mL de etanol 70% gelado e centrifugado a 10.000 rpm por 8 minutos a 4°C. Depois de seco o RNA foi suspenso em 40 µL de água DEPC (Dimetil pirocarbonato) e estocado em freezer a -70 °C. A concentração e a integridade do RNA isolado foram verificadas através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) e tratado

com água DEPC. O RNA das amostras foi quantificado utilizando o kit *Quant-iT™ RiboGreen® RNA* (Invitrogen). O experimento de extração de RNA foi realizado com as amostras no gelo e as vidrarias utilizadas para as soluções foram esterilizadas em uma estufa a 108°C por 24 horas.

Após a extração, as amostras de RNA foram tratadas com o kit *TURBO DNA-free™* (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante. Cerca de 2 µg de RNA foi utilizado no tratamento. Para a confirmação da degradação total do DNA, uma reação de PCR com 35 ciclos utilizando os *primers* universais de rRNA16S U341 e U758 (LAWRENCE et al., 2004), e 100 ng do RNA tratado, foi realizada.

2.2.5 Quantificação dos genes catabólicos *alk* e ARHD nos enriquecimentos por PCR em tempo real (qPCR)

Nas reações de PCR em tempo real, foi utilizado o DNA extraído das amostras de enriquecimento aeróbio. Esta atividade foi realizada no Instituto de Biotecnologia de Montreal (*NRC Biotechnology Research Institute - Canadá*) sob a supervisão do Prof. Charles Greer. Foi utilizado o kit *iQ SYBR green Supermix* (Bio-Rad Laboratories). As reações foram realizadas em um equipamento *Rotor-Gene 3000* (Corbett Life Science).

Os *primers* utilizados foram os mesmos empregados para a construção das bibliotecas dos genes catabólicos *alk* e ARHD (Capítulo 1), além do par de *primers* do gene rRNA 16S, Eub338/ Eub518 (FIERER et al., 2005). Para os ensaios em que dímeros de *primers* foram um problema, uma etapa de leitura adicional de 15 segundos foi incluída ao final de cada ciclo e o sinal de fluorescência foi adquirido no final desta etapa. Os padrões foram feitos a partir de diluições de plasmídeos linearizados contendo o fragmento do gene de interesse que foi clonado a partir de DNA de um organismo de referência. No caso do gene *alk*, este foi amplificado a partir do DNA de *Acinetobacter*

calcoaceticus (CCT 0050), e o gene ARHD foi amplificado a partir do DNA de *Pseudomonas putida* 17484 (CBMAI 992). Para todas as reações, água Milli-Q ultrapura foi utilizada como controle negativo e não gerou sinal detectável.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se de 1 a 75 ng de DNA extraído dos enriquecimentos, 0,3 μ M de *primers*, 1x do *iQ SYBR green Supermix* em um volume final de 15 μ L. O ciclo para as reações de PCR em tempo real foram: 97°C por 3 minutos, e 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 48°C para o gene *alk* e 58°C para o gene ARHD, e uma etapa de extensão a 72°C por 1 minuto. A especificidade dos produtos amplificados foi analisada pelas curvas de dissociação geradas pelo equipamento.

2.2.6 Quantificação da expressão dos genes catabólicos *alk* e ARHD nos enriquecimentos por PCR em tempo real (qRT-PCR)

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no Instituto de Biotecnologia de Montreal (*NRC Biotechnology Research Institute* - Canadá), sob a supervisão do Prof. Charles Greer, com amostras de RNA tratado com DNase utilizando o kit *iScript one-step RT-PCR* com *Sybr green* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). As reações foram realizadas em um equipamento *Rotor-Gene 3000* (Corbett Life Science). Os *primers* e padrões utilizados foram os mesmos descritos no item anterior. Para os ensaios em que dímeros de primers foram um problema, foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item anterior. Para todas as reações dois controles negativos foram utilizados, um sem a adição da enzima Transcriptase Reversa e o outro somente com água Milli-Q. Nos dois controles negativos não foi observado sinal detectável de amplificação.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se de 1 a 75 ng do total de RNA extraído dos enriquecimentos. O procedimento de amplificação foi o

seguinte: síntese de cDNA por 10 min a 50°C; inativação da enzima Transcriptase Reversa por 5 min a 95°C; seguida dos ciclos de amplificação de 97°C por 3 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 48°C para o gene *alk* e 58°C para o gene ARHD, e extensão a 72°C por 1 minuto e 15 segundos a 80°C (aquisição de sinal no final desta etapa). A especificidade dos produtos amplificados foi analisada pelas curvas de dissociação geradas pelo equipamento.

2.2.7 Avaliação dos genes catabólicos no enriquecimento aeróbio por *microarrays*

Para a síntese e marcação das sondas de DNA, utilizou-se o kit *BioPrime matriz CGH kit* (Invitrogen), segundo instruções do fabricante. A reação de anelamento dos *primers* ao molde de DNA foi realizada com 400 ng de DNA total e água deionizada para um volume final de reação 22 mL. Foram adicionados 20 µL de *Random primers* (2,5x) e a solução foi incubada a 95°C por 5 minutos e, em seguida, 5 minutos no gelo. Para a reação de marcação das sondas foram misturados 5 µL do Mix nucleotídeo (10x), 1 µL de Exo-Klenow (40 U/µL), 2 µL de Cy3-dCTP 1 mM (GE Healthcare) *Referência* e, nas amostras do enriquecimento aeróbio foram adicionados 2 µL do Cy5-dCTP 1 mM (GE Healthcare) *Teste*. O meio de reação foi incubado por 3 horas a 37°C. Após a incubação, foram adicionados 5 µL de EDTA (0,5 M pH 8.0) à solução e esta foi mantida a -20°C *overnight*.

Em seguida, as sondas marcadas de DNA foram purificadas. Para isso, foram adicionados 220 µL do tampão PureLink™ Binding Buffer B2 em cada amostra e aplicada em uma coluna de purificação. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 1 minuto e descartado o líquido que passou pela coluna. Foram adicionados 650 µL do tampão de lavagem à coluna de purificação e centrifugado novamente, como descrito acima. Após a centrifugação, as colunas de purificação foram transferidas para um tubo

novo. Foram adicionados 50 µL do tampão de eluição (10 mM Tris-HCl, pH 8.5), seguido de incubação por 1 minuto. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 13.000 rpm por 1 minuto e estocado no escuro a -20°C.

Foi colocado nos *slides* um *LifterSlip* (Erie Scientific) 60 X 25 mm, de acordo com as dimensões do *microarray*. Os *slides* foram pré-hibridizados por 1 hora a 37°C com uma solução DIG *Easy hybridization solution* (Roche Applied) contendo 5% de BSA. As amostras foram distribuídas aleatoriamente e a hibridização foi realizada por 20 horas a 37°C em um aparelho *Slide Booster* (Implen). As lâminas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos a 37°C em uma solução 0,1x SSC (0,15 M NaCl e 0,015 M citrato de sódio) /0,1% SDS, seguida por uma única lavagem por 5 min a 37°C em 0,1x SSC. As lâminas foram digitalizadas em um *scanner* de *microarray GX ScanArray PLUS* (PerkinElmer, Boston, MA) com uma resolução de 10 µm. As imagens foram transferidas para o programa *Quant-Array* (PerkinElmer), onde cada ponto foi identificado e quantificado. Os dados foram então exportados para o programa Excel, onde a intensidade dos spots foi calculada. O *LifterSlip* contém genes de degradação de bactérias isoladas de solos contaminados com petróleo e foi utilizado por Yergeau et al. (2009).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise cromatográfica CG-EM foi utilizada para avaliar a biodegradação dos hidrocarbonetos do óleo não biodegradado (PTS01), utilizado como substrato pelas bactérias enriquecidas a partir de amostras de óleo biodegradado (GMR75). A Figura 1 mostra dois dos cromatogramas obtidos, no período inicial do ensaio (**painel a**) e após 10 dias (**painel b**), evidenciando os ruídos observados nesses períodos do experimento. Foi observada a presença de um pico identificado como sendo o hexadecano, o qual persistiu após 10 dias de experimento. O hexadecano foi adicionado junto ao fenantreno nos

enriquecimentos como substrato para estimular o crescimento da microbiota do petróleo degradadora de hidrocarbonetos.

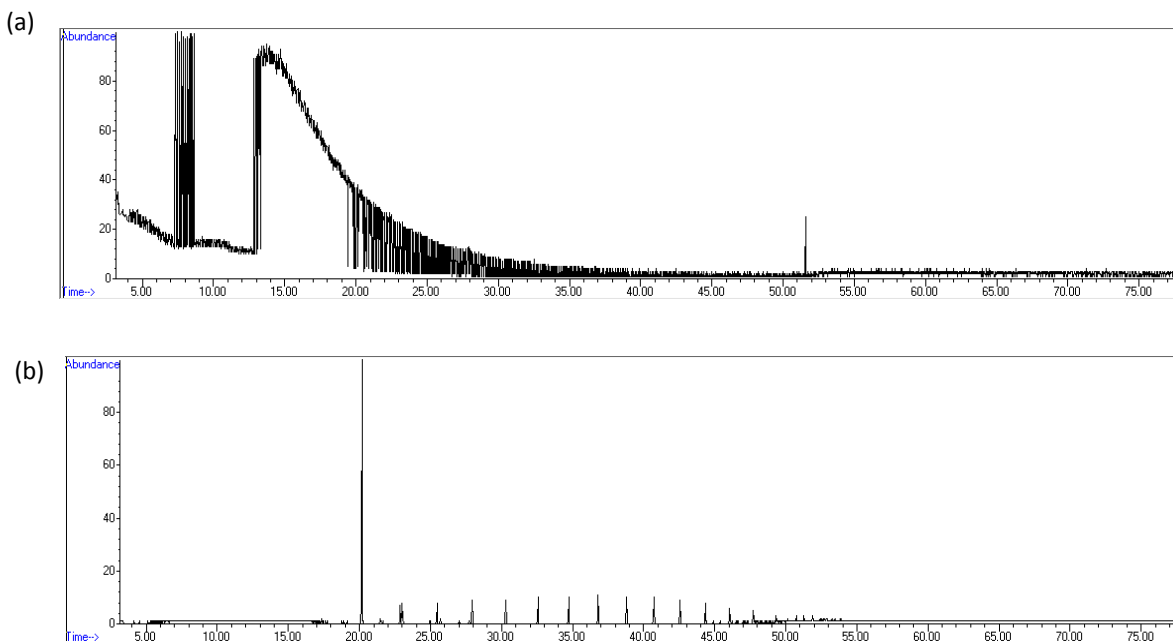


Figura 1. (a) Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores no tempo inicial do ensaio, onde pode ser observado o ruído. **(b)** Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores após 10 dias de incubação, mostrando o pico do hexadecano. O eixo y corresponde a abundância dos compostos presentes nas amostras e o eixo x corresponde ao tempo de retenção em minuto.

Como os picos referentes ao biomarcador hexadecano interferiram negativamente na avaliação da degradação do óleo pela microbiota, novos enriquecimentos aeróbios foram realizados, porém sem a adição do hexadecano e do fenantreno. Para a confirmação de que seria possível avaliar a degradação do óleo não biodegradado do poço PTS02 na presença da microbiota obtida a partir do óleo biodegradado do poço SER17, foi realizada uma análise cromatográfica do tempo inicial do ensaio (Figura 2), onde não foram detectados ruídos.

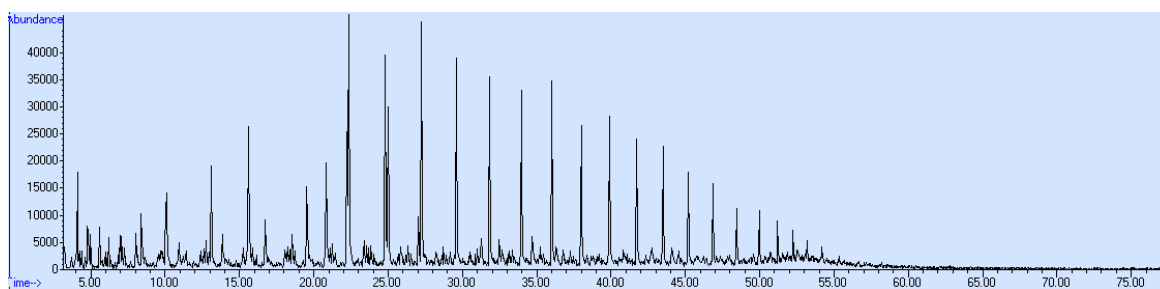


Figura 2. Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores no período inicial do enriquecimento aeróbio sem a adição de hexadecano e fenantreno. O eixo y corresponde a abundância dos compostos presentes nas amostras e o eixo x corresponde ao tempo de retenção em minuto.

Após 60 dias de incubação do enriquecimento, cerca de 10 a 70 ng/ μL de DNA foi obtido com o protocolo utilizado, sendo também observada a co-extração de RNA de boa qualidade (Figura 3). A quantificação do DNA obtido dos enriquecimentos revelada por *PicoGreen* (invitrogen), após a purificação e concentração, está detalhada na Tabela 1.

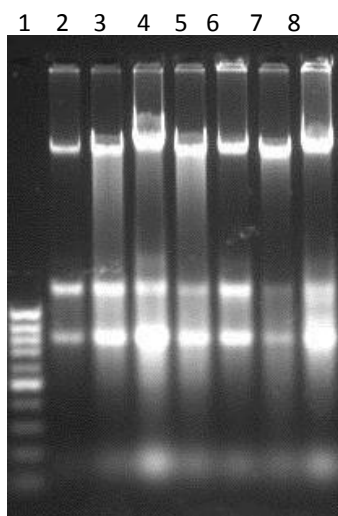


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose do DNA extraído das amostras dos cultivos enriquecidos aeróbios. Canaletas: (1) 4 μL do Marcador de peso molecular *ladder* 100 pb; (2) tempo de incubação 0 h; (3) após 5 dias; (4) 10 dias; (5) 15 dias; (6) 20 dias; (7) 25 dias; (8) 30 dias.

Tabela 1. Concentração final de DNA obtido após a extração do DNA total das amostras de cultivo aeróbio.

Descrição da amostra de DNA	Concentração (ng/ μ L)	DNA total (ng)
Amostra de incubação 0 h	9,65	1929
Amostra de incubação 5 dias	46,09	9218
Amostra de incubação 10 dias	73,01	14602
Amostra de incubação 15 dias	56,57	11314
Amostra de incubação 20 dias	32,85	6570
Amostra de incubação 25 dias	44,19	8839
Amostra de incubação 30 dias	56,28	11257

Devido à pouca quantidade de biomassa microbiana levada para o Canadá, resolvemos utilizar o RNA que foi co-extraído juntamente com o DNA (Figura 3). Foi separada uma alíquota das amostras e tratada com DNase. Posteriormente, foi realizada uma reação de PCR com 35 ciclos e utilizando os *primers* universais U341 e U758 (LAWRENCE et al., 2004) para o gene RNAr 16S, a fim de confirmar a total degradação do DNA. Após a confirmação da degradação do DNA observada pela falta do produto da reação de PCR, as amostras de RNA foram quantificadas utilizando o *RiboGreen* (invitrogen). Os valores obtidos estão detalhados na Tabela 2.

Tabela 2. Concentração final de RNA obtido após a extração do RNA total das amostras de cultivo aeróbio.

Descrição da amostra de RNA	Concentração (ng/ μ L)	Total RNA (ng)
Amostra de incubação 0 h	2,31	1154
Amostra de incubação 5 dias	2,21	1107
Amostra de incubação 10 dias	4,42	2212
Amostra de incubação 15 dias	2,54	1271
Amostra de incubação 20 dias	5,98	2988
Amostra de incubação 25 dias	2,56	1282
Amostra de incubação 30 dias	5,01	2506

Após a confirmação da extração de DNA e RNA das amostras do enriquecimento e a confirmação da quantidade e qualidade dos mesmos, foi realizada o PCR em tempo real para os genes catabólicos *alk* e ARHD. Primeiramente, foram utilizados os *primers*

Eub338 e Eub518 (FIERER et al., 2005) para o gene RNAr 16S a fim de avaliar a quantidade de bactérias totais presentes no enriquecimento aeróbio, como mostrado na Figura 4.

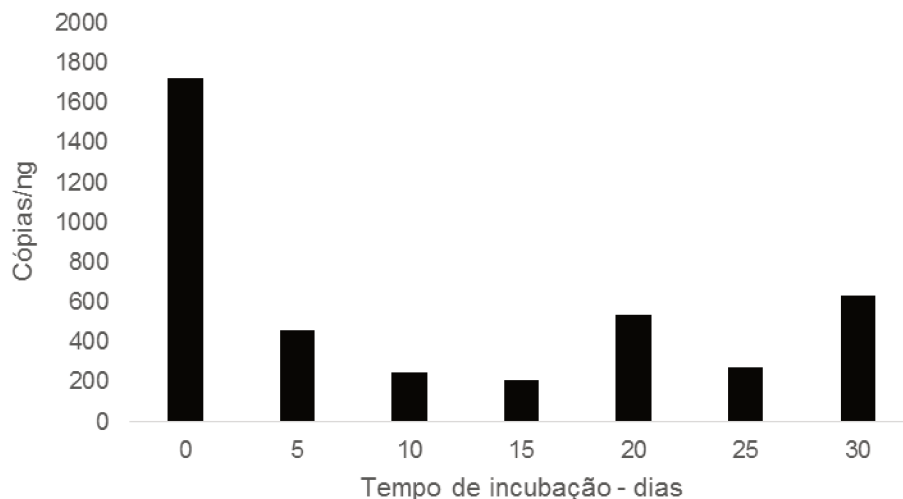


Figura 4. PCR em tempo real do gene RNAr 16S utilizando o DNA extraído do enriquecimento aeróbio.

Como pode ser observado, no período inicial do enriquecimento existia uma grande quantidade de gene RNAr 16S devido ao fato desse enriquecimento ter tido duas fases. Na 1ª fase, o hexadecano e o fenantreno foram utilizados para aumentar a biomassa do enriquecimento. Na 2ª fase, as células provenientes do 1º enriquecimento foram coletadas e inoculadas novamente em um enriquecimento contendo o óleo não biodegradado PTS01. Esse resultado confirma que no início do 2º enriquecimento existia uma grande quantidade de biomassa bacteriana.

Na reação de PCR em tempo real do gene alceno monoxigenase (*alk*) (Figura 5), pode ser observado que as bactérias que possuem o gene alceno monoxigenase estão em maior abundância após 10 dias do início do enriquecimento. Esse resultado sugere que após 10 dias na presença do petróleo não biodegradado PTS01, as bactérias que possuem o gene *alk* foram capazes de aumentar sua abundância no enriquecimento

provavelmente por conseguirem degradar o óleo para utilizá-lo como fonte de carbono e energia.

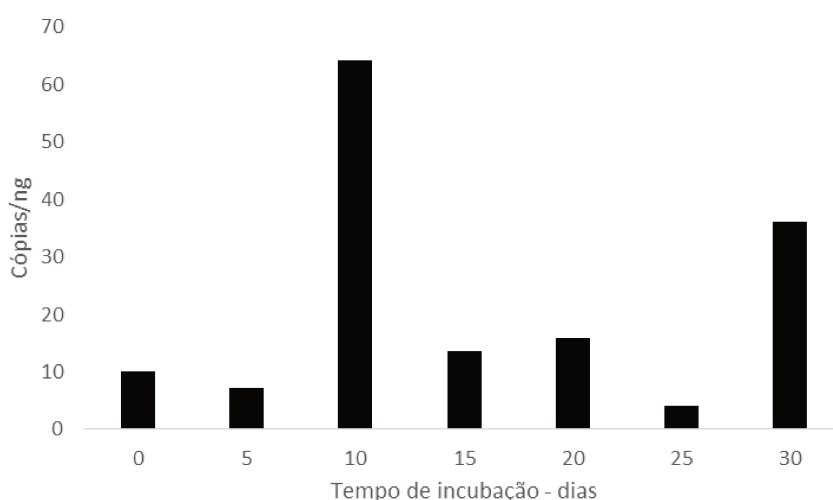


Figura 5. PCR em tempo real do gene *alk* utilizando o DNA extraído das amostras dos enriquecimentos aeróbios.

Na reação de PCR em tempo real com o gene ARHD (Figura 6) foi observado que as bactérias que possuem este gene estão em maioria logo no início do enriquecimento. Esse resultado sugere que no momento da coleta das células, no final da 1ª fase do enriquecimento, as bactérias que possuíam a capacidade de utilizar aromáticos foram favorecidas em relação àquelas que utilizam alcanos. Entretanto, embora o número de cópias dos genes ARHDs tenha decaído com o tempo de incubação do enriquecimento aeróbio, ainda assim mostrou-se significativamente maior que o número de cópias dos genes *alk* em todos os pontos de coleta. Estes dados sugerem que os membros da microbiota responsáveis pela degradação de aromáticos dominaram todo o tempo do enriquecimento. Nos enriquecimentos que se sucederam, esse resultado foi levado em consideração e a estratégia de enriquecimento foi modificada, ou seja, o enriquecimento foi realizado em uma única etapa, sem a adição de hexadecano e fenantreno.

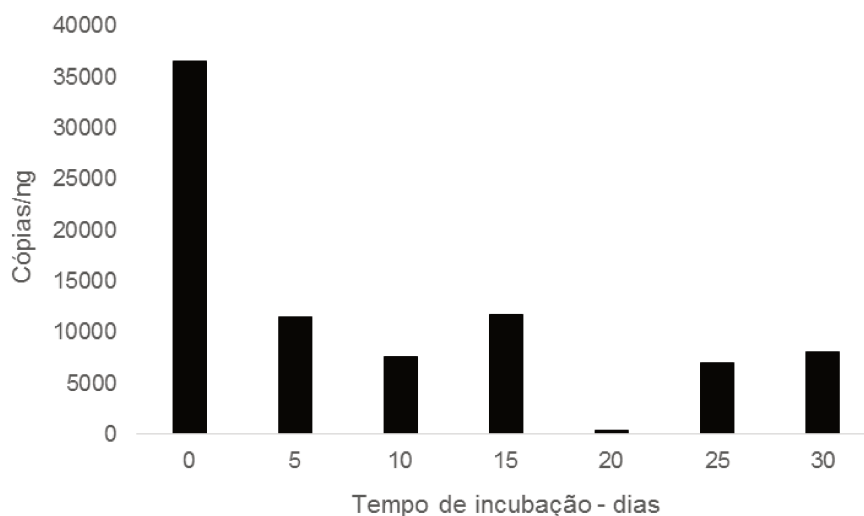


Figura 6. PCR em tempo real do gene ARHD utilizando o DNA extraído dos enriquecimentos aeróbios.

Em seguida, foi realizada a análise de quantificação da expressão dos genes catabólicos *alk* e ARHD por PCR em Tempo Real.

O RNA mostrou-se de boa qualidade e em condições de ser utilizado na reação de PCR em tempo real. Os resultados de PCR em Tempo Real mostraram que, em quase todos os pontos, a expressão do gene RNAr 16S foi alta, confirmando a integridade do RNA e a atividade da comunidade microbiana das enriquecimentos (Figura 7). Somente no ponto 4 (20 dias de incubação) a expressão do RNAr foi baixa em relação aos outros pontos, sugerindo que a comunidade microbiana degradadora apresentou uma queda na sua atividade após 20 dias de incubação.

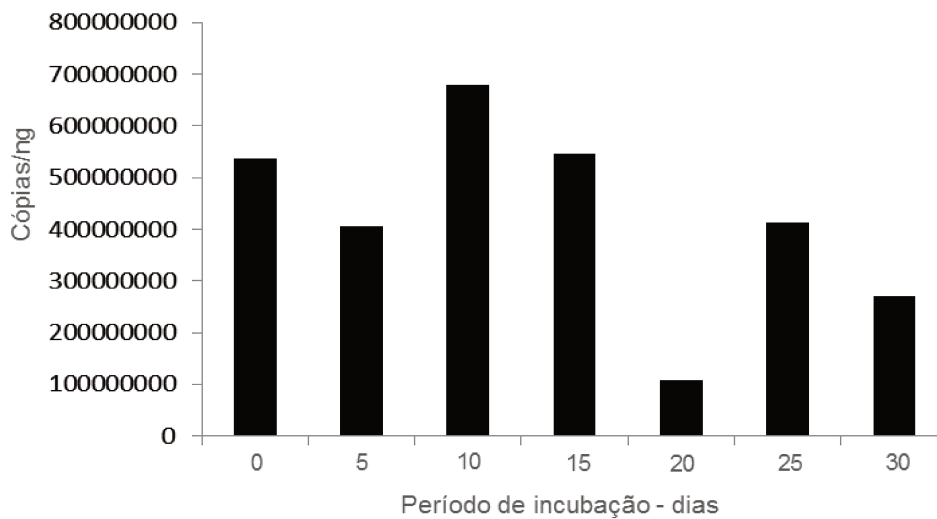


Figura 7. PCR em tempo real do gene RNAr 16S utilizando o RNA extraído das amostras dos enriquecimentos aeróbios.

Para a quantificação da expressão do gene alcano monoxigenase (*alk*) foi realizada uma reação de PCR em tempo real utilizando o RNA das amostras do enriquecimento aeróbio e os *primers* degenerados usados para a construção da biblioteca deste gene catabólico. Após várias tentativas, não foi observada amplificação a partir do RNA do gene *alk* em nenhum ponto de incubação. Estes resultados sugerem que os membros da microbiota responsáveis pela degradação de alcanos não estavam ativos, embora estivessem presentes, como observado na Figura 5. Estas observações reiteram a importância dos dados de cromatografia da degradação dos hidrocarbonetos no enriquecimento aeróbio para confirmar se ocorreu ou não a degradação de alcanos, já que existe a presença de bactérias que possuem este gene, principalmente após 10 dias de incubação.

Na reação de PCR em tempo real com o gene ARHD, foi visto que a sua expressão foi maior no ponto 2, após 10 dias de incubação do enriquecimento (Figura 8). Esse resultado indica que apesar da grande abundância das populações de bactérias que

possuem este gene, a expressão é muito baixa nos primeiros dias de enriquecimento utilizando o óleo PTS01 como substrato. Outra observação referente à análise de expressão do gene ARHD, é que apesar do baixo número de cópias do gene no ponto 4, após 20 dias de incubação do enriquecimento aeróbio (Figura 6), a sua expressão é alta (Figura 8). Mais uma vez, a falta do resultado de cromatografia da degradação dos hidrocarbonetos no enriquecimento aeróbio dificulta a interpretação dos resultados de expressão dos genes ao longo do tempo de incubação.

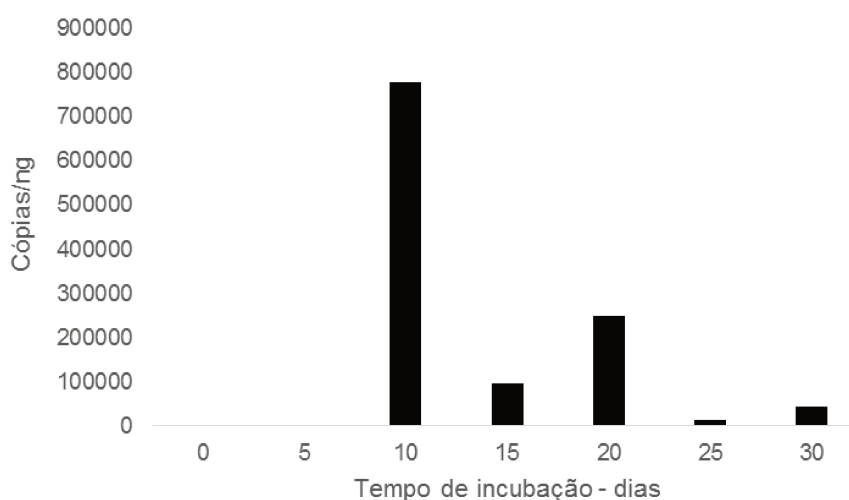


Figura 8. PCR em tempo real do gene ARHD utilizando o RNA extraído das amostras dos enriquecimentos aeróbios.

Como citado acima, foram realizados novos enriquecimentos sem a presença do hexadecano e do fenantreno. A análise de CG mostrou que ao longo de 60 dias de incubação a microbiota recuperada do petróleo biodegradado (SER17) e inoculada no petróleo não biodegradado (PTS02) conseguiu remover quase todos os *n*-alcanos por biodegradação (Figura 9). Com relação aos parâmetros de biodegradação, pode-se observar que houve uma biodegradação preferencial dos hidrocarbonetos lineares com relação aos ramificados (razão C_{18} / fitano). Ainda, pôde-se perceber que o índice de preferência de carbono (IPC), o qual é a razão dos hidrocarbonetos ímpares sobre os

pares, permaneceu quase que inalterado, o que demonstra não ter havido nenhuma preferência da microbiota em degradar hidrocarbonetos pares ou ímpares (Tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros de biodegradação para os ensaios no período inicial do enriquecimento, após 20 dias e 60 dias.

Tempo	Fitano/C₁₈	IPC
0 dia	0,45	1.04
20 dias	1,47	1.02
60 dias	3,49	1.02

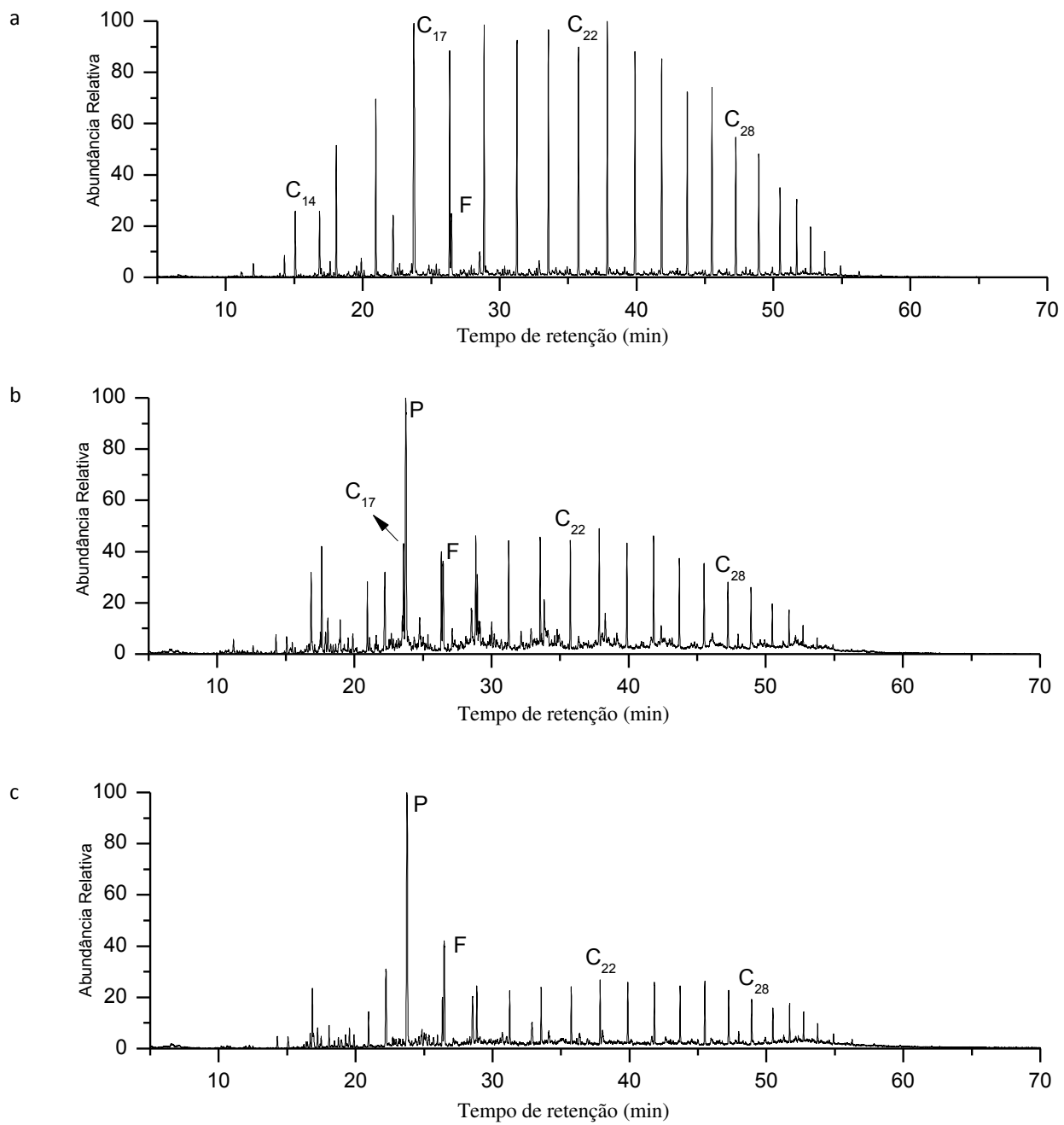


Figura 9. (a) Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores no tempo 0 h; (b) Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores no tempo de 10 dias; (c) Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores no tempo de 60 dias. P – Pristano e F - Fitano.

Por outro lado, os metil-fenantrenos e os dimetil-fenantrenos foram encontrados na amostra de óleo PTS02, indicando que estes hidrocarbonetos aromáticos não foram degradados pela microbiota recuperada a partir do petróleo SER17 após 60 dias de incubação nos ensaios (Figura 10).

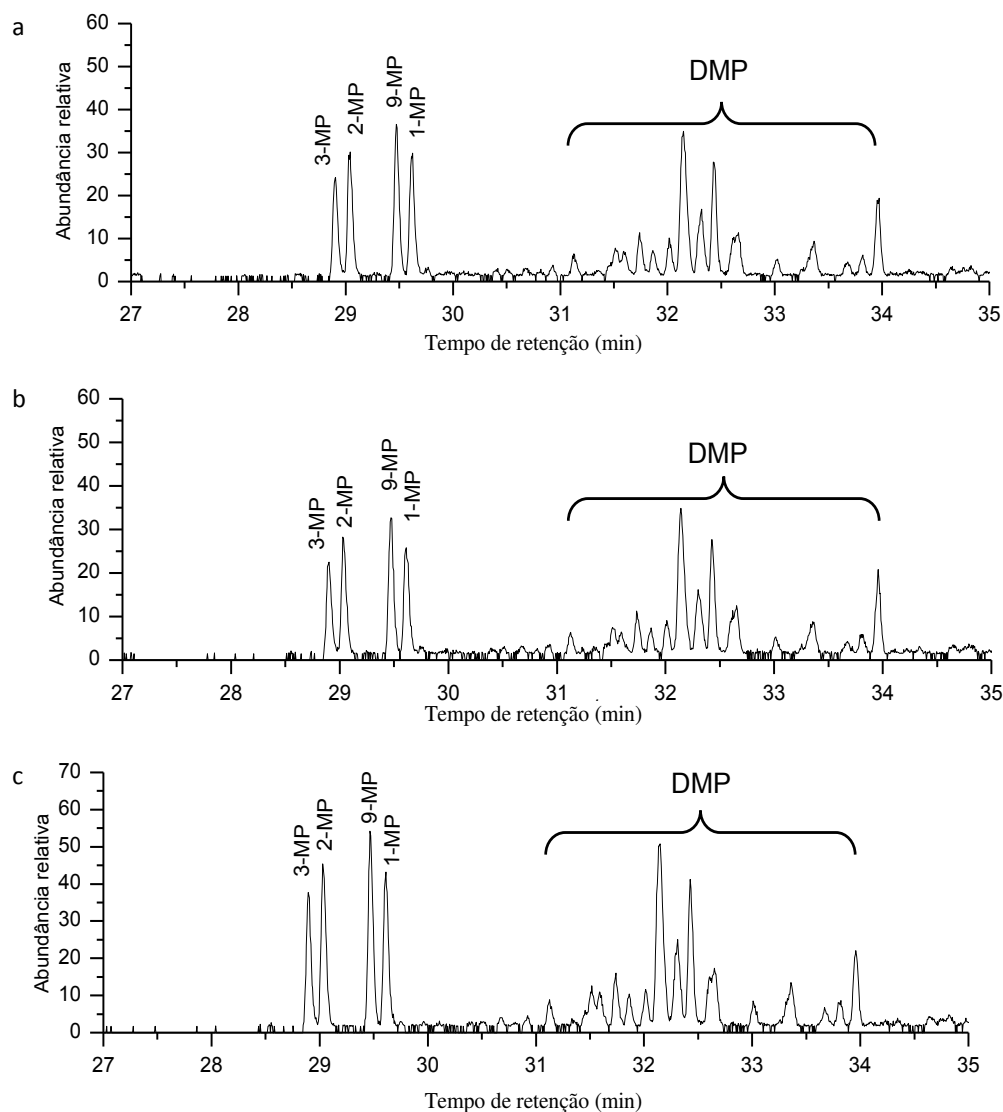


Figura 10. (a) Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores no tempo 0 h; (b) Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores no tempo de 10 dias; (c) Cromatograma de corrente iônica total dos biomarcadores no tempo de 60 dias. MP – metil-fenantrenos (o número corresponde à posição do grupo metil) e DMP - dimetil-fenantrenos.

Dados de biodegradação do óleo indicam que os hidrocarbonetos do petróleo são degradados sequencialmente, onde os *n*-alcanos são os primeiros hidrocarbonetos a

serem degradados no processo de biodegradação, enquanto os aromáticos necessitam de um tempo maior (RÖLING et al., 2003). Como observado na Figura 10, os hidrocarbonetos aromáticos não foram biodegradados pela microbiota do reservatório, o que sugere que o tempo de incubação não foi suficiente para ocorrer a biodegradação desta classe de compostos, ou mesmo que pode ter havido falta de nutrientes adequados, os quais constituem um dos principais fatores que controlam o processo de biodegradação (HEAD et al., 2003).

Nas reações de PCR em tempo real, foi utilizado o DNA e o cDNA das amostras de enriquecimento aeróbio. Esta etapa foi realizada na Embrapa sob a supervisão do Prof. Itamar Soares de Melo. Após várias tentativas de encontrar a concentração certa do DNA e cDNA a ser utilizada no PCR em tempo real, infelizmente não foi possível observar a amplificação dos genes catabólicos *alk* e *ARHD* nas amostras de enriquecimento. Um dos fatores que pode ter contribuído para este insucesso, foi a formação de dímeros de *primers* nas reações, observada na curva de *Melt*. Uma das causas para esta formação de dímeros pode ser a baixa concentração do DNA e cDNA proveniente da amostra, o que não possibilita o anelamento dos primers na sequência-alvo, ou a alta concentração dos *primers* utilizados (POWELL et al., 2006).

O experimento de *microarray* utilizando o DNA extraído das células coletadas do enriquecimento aeróbio foi construído a partir de 140 produtos de PCR amplificados a partir de genes clonados relacionados com a degradação de alcanos (10 genes), de hidrocarbonetos aromáticos (90 genes), com o ciclo de nitrogênio (6 genes), com a transformação de metais pesados (7 genes), e com outros processos (27 genes) (YERGEAU et al., 2009). Esta atividade foi realizada no Instituto de Biotecnologia de Montreal (*NRC Biotechnology Research Institute*) sob a supervisão do Prof. Charles Greer.

Infelizmente, nenhuma das amostras de DNA do enriquecimento aeróbio utilizadas na técnica de *microarray* hibridizou com as sondas contidas no microarranjo. Esse resultado sugere que as sequências de DNA recuperadas dos poços de petróleo e envolvidas com a degradação de hidrocarbonetos sejam sequências novas, com baixa ou nenhuma similaridade com as sequências utilizadas para a construção do microarranjo. Face aos resultados obtidos, não foi realizada a avaliação da expressão dos genes através da hibridização do RNA com o microarranjo.

2.4. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo revelaram que a utilização do hexadecano neste trabalho, na tentativa de selecionar bactérias degradadoras de hidrocarbonetos lineares, não foi bem sucedida uma vez que o hexadecano interferiu negativamente na análise cromatográfica, impedindo a avaliação da degradação dos hidrocarbonetos no período de 30 dias de incubação do enriquecimento. O mesmo problema não foi observado na análise cromatográfica do enriquecimento sem a utilização do hexadecano.

Foi observada uma maior quantidade e expressão do gene ARHD envolvido na degradação dos hidrocarbonetos aromáticos em comparação ao gene *alk* envolvido na degradação de hidrocarbonetos lineares. Apesar da interferência negativa do hexadecano na leitura do cromatograma, devido à sua alta concentração no enriquecimento, os genes de degradação de hidrocarbonetos lineares não foram os mais expressos e sim os genes envolvidos na degradação dos hidrocarbonetos aromáticos, sugerindo uma preferência da comunidade microbiana à degradação inicial de hidrocarbonetos aromáticos ao invés dos lineares.

A análise de PCR em Tempo Real revelou alta expressão do gene envolvido na degradação dos compostos aromáticos na comunidade microbiana do poço GMR75 após

10 dias de incubação. No entanto, no caso da comunidade microbiana da amostra do poço SER17 não foi observada, através da análise cromatográfica, a degradação dos compostos aromáticos após 60 dias de incubação, demonstrando a diferença da preferência de degradação destas duas comunidades e a importância do estudo da comunidade de bactérias para entender melhor o seu papel na degradação do óleo em um dado reservatório de petróleo.

A análise do microarranjo sugere que as sequências presentes no enriquecimento aeróbio utilizando amostra do poço de petróleo biodegradado GMR75 são sequências novas, devido ao fato das sequências obtidas no enriquecimento não terem hibridizado com nenhuma sonda contida no microarranjo. Este resultado demonstra a necessidade de estudos funcionais futuros sobre a biodegradação nos reservatórios de petróleo, a fim de melhor elucidar a ecologia microbiana e os mecanismos de degradação deste ambiente hostil.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boll, M., e Heider, J. (2010) Anaerobic degradation of hydrocarbons: mechanisms of C-H-Bond activation in the absence of oxygen. In: Handbook of hydrocarbon and lipid Microbiology. Timmis K. N. (ed.). Berlin Heidelberg. Springer-Verlag, 1012-1024
- Brennerova, M. V., Josefiova, J., Brenner, V., Pieper, D. H., and Junca, H. (2009) Metagenomics reveals diversity and abundance of meta-cleavage pathways in microbial communities from soil highly contaminated with jet fuel under air-sparging bioremediation. *Environmental Microbiology* 11: 2216– 2227.
- Cébron, A; Norini, MP; Beguiristain, T; Leyval, C (2008) Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD α) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods* 73: 148–159.
- Eriksson, M.; Dalhammar, G.; Borg-Karlson, A.-K. (2000) Biological degradation of selected hydrocarbons in an old PAH/creosote contaminated soil from a gas work site. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53: 619–626.

- Fierer, N.; Jackson, J. A.; Vilgalys, R.; Jackson, R. B. (2005). Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4117–4120.
- Lawrence, J.R.; Chenier, M. R.; Roy, R.; Beaumier, D.; Fortin, N.; et al. (2004) Microscale and molecular assessment of impacts of nickel, nutrients, and oxygen level on structure and function of river biofilm communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(7): 4326-4339.
- Magot, M., Ollivier, B., Patel, B. K. C. (2000) Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie Van Leeuwenhoek* 77: 103–116.
- Marchant, R., Sharkey, F.H., Banat, I. M., Rahman, T. J., Perfumo A. (2006) The degradation of n-hexadecane in soil by thermophilic geobacilli. *FEMS Microbiology Ecology* 56: 44–54.
- Orphan, V.J., Taylor, L.T., Hafenbradl, D., Delong, E.F., 2000. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblage associated with high temperature petroleum reservoirs. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 700–711.
- Sette LD, Simioni K C M, Vasconcelos SP, Dussán LJ, Marsaioli AJ, Santos Neto EV, Oliveira VM. (2007) Analysis of composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91: 253-266.
- Sette, L. D.; Simioni, K. C. M.; Vasconcelos, S. P.; Dussán, L. J.; Marsaioli, A. J.; et al. (2007) Analysis of composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Antonie van Leeuwenhoek* 91: 253-266.
- van Beilen, J. B., Li, Z., Duetz, W. A., Smits, T. H. M., Witholt, B. (2003) Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil and Gas Science and Technology* 58: 427–440
- van Beilen, J. B., e Funhoff, E. G. (2007) Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74:13–21.
- Voordouw, G., Armstrong, S.M., Reimer, M.F., Fouts, B., Telang, A.J., Shen, Y., Gevertz, D., 1996. Characterization of 16S rRNA genes from oil field microbial communities indicates the presence of a variety of sulfate-reducing, fermentative, and sulfide-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1623–1629.
- Winderickx, J.; Castro, J. M. (1994) Pratical course in molecular biology of microrganisms. Universidade Federal de Ouro Preto - MG, January 23 - February 11, p. 59.
- Xu, M., Xiao, X., Wang, F. (2008) Isolation and characterization of alkane hydroxylases from a metagenomic library of Pacific deep-sea sediment. *Extremophiles* 12:255–262.

CAPÍTULO 3 - Análise Integrada de Metagenômica e Metatranscriptômica de Enriquecimentos Aeróbios de um Reservatório de Petróleo no Nordeste do Brasil.

Leandro C. L. Verde, Rubens T. D. Duarte, Bruna M. Dellagnezze, Etienne Yergeau, Charles W. Greer, Eugênio V. dos Santos Neto, Valéria M. de Oliveira. *Submetido à revista PLoS ONE.*

3.1. RESUMO

O presente estudo utilizou uma abordagem integrada de metagenômica e metatranscriptômica para caracterizar a estrutura e função da comunidade bacteriana em enriquecimentos aeróbicos de óleo biodegradado de um reservatório de petróleo *onshore* na Bacia Potiguar (RN), no Nordeste do Brasil. DNA e cDNA foram obtidos a partir de enriquecimentos bacterianos e sequenciados utilizando a plataforma Illumina. A análise taxonômica pelo MG-RAST mostrou dominância de Actinobacteria seguida pela Proteobacteria no conjunto de dados de DNA e um aumento no metabolismo de Actinobacteria no conjunto de dados de cDNA após 20 dias de incubação do enriquecimento. A anotação funcional baseada na via metabólica KEGG mostrou uma pequena divergência entre os conjuntos de dados de DNA e cDNA. As sequências mais abundantes e ativas foram relacionadas com as proteínas: Ligase Coenzima A de ácido graxo de cadeia longa, envolvida na degradação de compostos aromáticos; descarboxilase, envolvida com o ciclo de glioxilato; e o fator sigma da RNA polimerase, envolvido na regulação da resposta ao estresse oxidativo. Além disso, a anotação da expressão gênica com foco na degradação aromática revelou que o grupo que degrada o ácido n-fenilalcanoico foi o mais representado entre as sequências dos conjuntos de dados do DNA e cDNA. Este grupo inclui os genes que codificam o *operon fadBA*, que está envolvido com a via da β -oxidação responsável pela degradação dos ácidos graxos. Os resultados do presente trabalho fornecem informações significativas sobre a comunidade bacteriana degradadora de hidrocarbonetos recuperadas de reservatórios de petróleo e demonstram o potencial da metagenômica e metatranscriptômica para a investigação detalhada da estrutura e funcionamento de comunidades microbianas em ambientes hostis.

3.2 INTRODUÇÃO

A maioria dos recursos do petróleo da Terra está parcialmente biodegradado (RÖLING et al., 2003). Os mecanismos de degradação do óleo em reservatórios de petróleo, assim como os micro-organismos envolvidos, ainda são pouco compreendidos. O conhecimento dos micro-organismos presentes em reservatórios de petróleo, as suas propriedades fisiológicas e o potencial bioquímico para a degradação de hidrocarbonetos pode vir a beneficiar a exploração de petróleo. Estes vários micro-organismos são capazes de degradar hidrocarbonetos do petróleo, com o conseqüente aumento da densidade do óleo, teor de enxofre, acidez e viscosidade, interferindo com as operações de extração e refino, resultando em perdas econômicas significativas (MAGOT et al., 2000).

As informações sobre a composição da comunidade de bactérias e genes envolvidos no processo de biodegradação podem melhorar nossa compreensão das vias metabólicas microbianas de ocorrência preferencial, assim como uma melhor aplicação dos micro-organismos específicos nos processos de biodegradação ou biorremediação. A combinação de ambas as abordagens dependente e independente de cultivo pode nos permitir alcançar uma visão mais abrangente sobre as interações e os papéis funcionais dos organismos presentes na comunidade. A combinação de técnicas de microbiologia clássica com metodologias moleculares independentes de cultivo já foi empregada em estudos prévios para investigar comunidades bacterianas em reservatórios de petróleo de alta temperatura (ORPHAN et al., 2000, 2003; SHESTAKOVA et al., 2011).

Com a rápida expansão no campo da biologia molecular, métodos para avaliar o perfil da comunidade microbiana de degradadores de hidrocarbonetos têm sido extensivamente empregados, tais como as bibliotecas de genes RNAr 16S, DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), T-RFLP (*Terminal-Restriction Fragment Length*

Polymorphism), FISH (*Fluorescent in Situ Hybridization*), Multiplex e PCR em Tempo Real, *microarray* e SIP (*Stable Isotope Probing*) (BELLER et al., 2002; BALDWIN et al., 2003; BONCH-OSMOLOVSKAYA et al., 2003; SETTE et al., 2007; MALIK et al., 2008; BELL et al., 2011).

Embora estes métodos ainda sejam úteis para a caracterização de comunidades menos diversas, eles falham ao refletir integralmente a real diversidade microbiana e associar diversidade taxonômica com o funcionamento do ecossistema quando amostras de alta complexidade estão sendo investigadas. Métodos de sequenciamento em larga escala, como as tecnologias de pirosequenciamento 454 e Illumina, têm sido aplicados como novos métodos promissores para investigar genes e níveis de expressão gênica da comunidade microbiana em diferentes ambientes. A metagenômica baseada no sequenciamento de DNA em larga escala tem sido aplicada com o intuito de caracterizar comunidades microbianas em solos contaminados com diesel (YERGEAU et al., 2012), águas residuárias de refinaria de petróleo (SILVA et al., 2013), água do mar (GILBERT et al., 2008), solo (URICH et al., 2008), intestino (QIN et al., 2010) e cavidade oral (LAZAREVIC et al., 2009) de humanos, reservatórios de petróleo (AN et al., 2013), detritos de tubulações de petróleo (JOSHI et al., 2014), entre outros. Contudo, somente alguns estudos de metatranscriptômica têm sido aplicados a comunidades microbianas em água marinhas (FRIAS-LOPEZ et al., 2008; SHI et al., 2011), solo (URICH et al., 2008), lodos ativados (YU; ZHANG, 2012) e derramamento de óleo (MASON et al., 2012).

No presente estudo, a estrutura da comunidade microbiana e os níveis de expressão gênica de enriquecimentos aeróbicos de petróleo biodegradado foram investigados utilizando uma abordagem integrada de metagenômica e metatranscriptômica. Os objetivos deste trabalho consistiram na caracterização filogenética e funcional da comunidade microbiana recuperada de um reservatório de

petróleo biodegradado, através de enriquecimentos aeróbios, na tentativa de identificar as vias metabólicas relevantes para o processo de biodegradação.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Amostragem

As amostras de óleo (naturalmente misturado com água de formação) foram coletadas em julho de 2008 a partir de dois poços de produção, nomeados GMR75 e PTS1, em reservatórios *onshore* na Bacia Potiguar (Nordeste, Brasil), com apoio logístico do CENPES/Petrobras. As amostras foram enviadas para o laboratório CPQBA-DRM e armazenadas no escuro e em temperatura ambiente para análises posteriores. A amostra de petróleo GMR75 foi classificada como moderadamente biodegradada e produzida a partir de um reservatório com uma temperatura *in situ* de 42,2°C, a uma profundidade de 535,5 – 540,5 m. A amostra de petróleo PTS1 foi classificada como não biodegradada e recuperada a partir de um reservatório com temperatura *in situ* de 48,3°C, a uma profundidade de 801 - 803 m.

3.3.2 Enriquecimentos bacterianos aeróbios

A amostra de petróleo bruto/ água de formação (10% do volume do meio, v/v) foi inoculada em 100 ml dos seguintes meios de cultura: caldo de tripticase de soja (TSB, Difco) e caldo marinho (MB, Difco); uma solução de vitaminas (2 mg de biotina, 2 mg de ácido fólico, 5 mg de hidrocloreto de tiamina; 5 mg de ácido nicotínico; 5 mg de pantotenato de cálcio, 10 mg de hidrocloreto de piridoxina, 0,1 mg de vitamina B12 e 5 mg de ácido lipóico, por litro de água destilada) foi adicionada a 0,1% (v/v) para estimular o crescimento microbiano. Os consórcios aeróbios foram incubados em frascos Erlenmeyer em agitador rotacional a 42°C e 120 rpm durante 5 dias.

Os *pellets* de cada enriquecimento microbiano foram coletados por centrifugação e inoculados em 2 L do respectivo meio de cultura, seguido de incubação a 42°C em agitador rotacional a 120 rpm. Após 10 dias de incubação, a biomassa foi recuperada por centrifugação (5.000 *g*, 18°C, 10 min). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de ambos os enriquecimentos microbianos (TSB e MB) foram reunidos e transferidos para frascos Erlenmeyer (125 ml) contendo 40 ml do meio Bushnell Haas (BHM, Difco), adicionado de 0,1% (v/v) solução de vitamina e 30 mg de óleo não-biodegradado (PST01) da bacia Potiguar (Nordeste, Brasil). O experimento foi realizado em triplicata e monitorado durante 20 dias. Os frascos foram sacrificados a cada 10 dias para a recuperação da biomassa e extração de ácidos nucleicos.

3.3.3 Extração de Ácidos nucleicos e Síntese de cDNA

Para cada amostra de enriquecimento, 30 ml foram centrifugados durante 10 min a 4.000 *g* a 4 °C. Os *pellets* foram coletados e divididos para extração de DNA e RNA utilizando o *Kit Wizard Genomic DNA purification* (Promega, EUA) e o *Kit Purelink Micro-To-Midi Total RNA Purification System* (Invitrogen, EUA), respectivamente. A concentração e a pureza do DNA e RNA foram determinadas por microespectrofotometria (NanoDrop -1000, Thermo Scientific, Willmington, DE, EUA).

3.3.4 Construção e sequenciamento de bibliotecas de DNA e cDNA

O sequenciamento do DNA foi realizado por um laboratório multi- usuário localizado em Piracicaba (São Paulo, Brasil), utilizando a plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA). No caso do cDNA, o sequenciamento foi realizado utilizando uma *lane* do sequenciador Illumina HiSeq 1000 (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, o DNA foi preparado utilizando o *kit Nextera*

DNA Sample prep. (Illumina), enquanto o *TruSeq RNA Sample prep kit v2 (Illumina)* foi utilizado para preparar as bibliotecas de mRNA. Os fragmentos de DNA e cDNA foram processados por reparação final, *A-tailing*, ligação dos adaptadores, amplificação por PCR e purificação dos produtos de acordo com as instruções do fabricante, resultando em bibliotecas com fragmento de DNA e de cDNA de tamanho ~ 200 bp para subsequente sequenciamento. O programa baseado no CASAVA (versão 1.8.2) foi utilizado para converter as imagens de fluorescência cruas (arquivos bcl) em arquivos de sequências nomeadas (fastq).

3.3.5 Análises de bioinformática

Análise de informação de domínio taxonômico combinado

Inicialmente, sequências de leitura aleatórias do Illumina foram analisadas no Mothur v1.31.2 (SCHLOSS et al., 2009) e convertidas em *contigs* com base no pareamento dos *primers* direto-reverso e na qualidade de nucleotídeos (sequências com > 50% de baixa qualidade e/ou score Phred < 20 foram descartadas). Os *contigs* foram a seguir analisados no Mothur para remover sequências com homopolímeros ou sequências curtas. Para dados metagenômicos, *contigs* de alta qualidade foram montados utilizando uma combinação de VelvetH (para construir um histograma de k-mer), VelvetG (para construir o gráfico Bruijin) e o MetaVelvet (para gerar sequências *scaffold* em formato fasta) (NAMIKI et al., 2012). Dados metatranscriptômicos foram montados utilizando IDBA-Tran v.1.0.13 (PENG et al., 2013). A anotação de ambos os dados metagenômico e metatranscriptômico foi realizada utilizando o servidor MG-RAST (*Meta Genome Rapid Annotation using Subsystem Technology*, v3.1) (<http://metagenomics.nmpdr.org>). Este *pipeline* fornece vários métodos para as reconstruções filogenéticas e metabólicas, análise de similaridade de proteínas,

classificação e anotação funcional de proteínas (MEYER et al., 2008). A análise de similaridade de proteínas foi realizada utilizando BLAST contra o banco de dados M5NR de proteína (<http://metagenomics.nmpdr.org>), que integra vários bancos de dados de sequência em um banco de dados único e pesquisável. No presente estudo, o conjunto de dados de DNA (MG-RAST ID: 4543129.3 e 4543130.3) e o conjunto de dados de RNA (MG-RAST ID: 4543721.3 e 4543722.3) foram utilizados para as análises.

3.3.6 Classificação da expressão gênica global

Para obter informações de todas as vias metabólicas, a expressão gênica global foi anotada com o Subsistemas SEED no MG-RAST com o conjunto de dados total do DNA e do cDNA em um valor corte de e-valor $< 1e^{-10}$ (PFISTER et al., 2010).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Perfil filogenético do metagenoma e metatranscriptoma

Neste estudo, duas amostras de enriquecimento (P1 - após 10 dias e P2 - após 20 dias) foram sequenciadas para investigar o perfil metagenômico e metatranscriptômico da comunidade bacteriana. Um total de 18.984 e 17.017 sequências (*reads*) do conjunto de dados metagenômico e 23.359 e 69.947 *reads* do conjunto de dados metatranscriptômico das amostras P1 e P2, respectivamente, foi obtido pelo controle de qualidade do MG-RAST.

A análise do metagenoma baseada em todas as bases de dados de anotação disponíveis no MG-RAST revelou que o domínio Bacteria foi dominante em ambas as amostras P1 e P2, representando 99,21% e 99,32% das sequências, respectivamente. Eukarya representou 0,16% e 0,14%, Archaea 0,04% e 0,06%, vírus 0,43% e 0,53% e

outras sequências 0,06% e 0,05% da abundância do DNA total em P1 e P2, respectivamente.

Para um melhor entendimento dos níveis de atividade das diferentes populações na comunidade microbiana do enriquecimento após 10 e 20 dias, a afiliação taxonômica das sequências de cDNA foi analisada utilizando o banco de dados do MG-RAST. Os resultados das análises metatranscriptômicas mostraram que, como esperado, Bacteria também foi o domínio dominante em ambos os conjuntos de dados de P1 e P2, correspondendo a 82,58% e 98,27%, respectivamente. Eukarya representaram 17,16% e 1,61%, Archaea 0,10% e 0,05%, vírus 0,03% e 0,05% e outras sequências 0,13% e 0,02% da abundância total de cDNA em P1 e P2, respectivamente.

No conjunto de dados do metagenoma, os filos bacterianos mais abundantes foram Actinobacteria e Proteobacteria, os quais representaram cerca de 85% e 14%, respectivamente, dos *reads* de DNA que codificam proteínas tanto em P1 quanto em P2 (Figura 1). Miqueletto e colaboradores (2011) estudaram a comunidade bacteriana de uma amostra de solo da bacia petrolífera Potiguar e observaram que, similarmente aos resultados encontrados neste trabalho, o filo Actinobacteria foi mais abundante do que o filo Proteobacteria. A habilidade de se adaptar a substratos recalcitrantes tem sido sugerida para explicar a significativa ocorrência de Actinobactérias em algumas amostras ambientais (FIERER et al., 2007).

O filo Actinobacteria possui uma ampla distribuição em diferentes reservatórios de petróleo ao redor do mundo e tem sido descrito como degradadores de hidrocarbonetos (SALINAS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2008; SILVA et al., 2013).

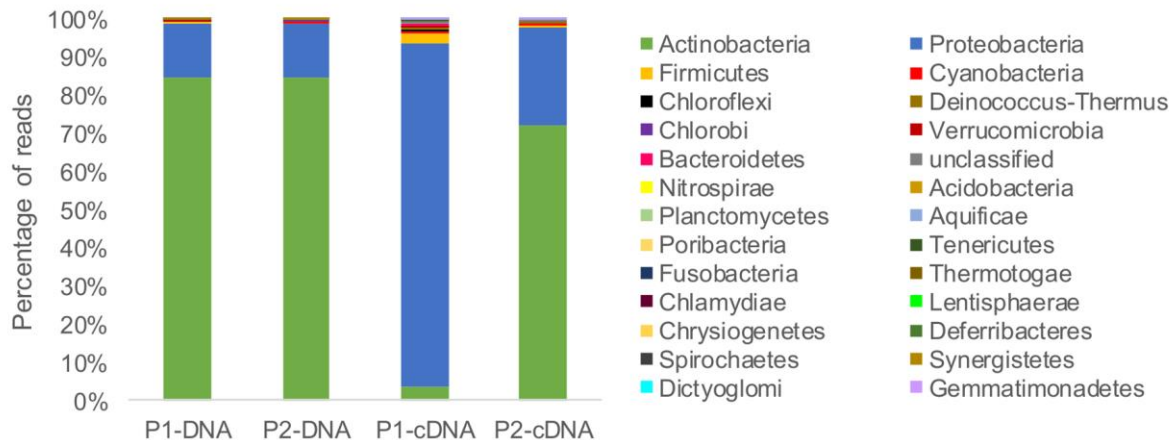


Figura 1. Classificação filogenética dos *reads* obtidos do sequenciamento do metagenoma e metatranscriptoma. Resultados para filós obtidos pela plataforma MG-RAST.

Proteobacteria foi o segundo filo mais abundante na comunidade bacteriana de ambas as amostras, especialmente a classe Betaproteobacteria, a qual representou 9,7% dos *reads* em P1 e P2. Muitos representantes do filo Proteobacteria podem crescer em compostos aromáticos ou metano (COLEMAN et al., 2006) e têm sido descritos como degradadores de hidrocarbonetos em diferentes reservatórios de petróleo (KORENBLUM et al., 2012; SETTE et al., 2007).

No conjunto de dados de metatranscriptoma, o filo Proteobacteria foi o mais ativo após 10 dias de enriquecimento do petróleo (P1), representando 90,25% dos *reads* de cDNA que codificam proteínas. O filo Actinobacteria foi o segundo mais predominante, o qual representou somente 3,65% dos *reads* de cDNA que codificam proteínas. Após 20 dias de enriquecimento do petróleo (P2), houve uma inversão no perfil da comunidade bacteriana e o filo Actinobacteria tornou-se o mais ativo, com 72,43% dos *reads* de cDNA que codificam proteínas, e o filo Proteobacteria passou a representar apenas 25,19% das sequências.

Apesar da alta abundância do filo Actinobacteria comparado com Proteobacteria, o último mostrou maior diversidade, abrangendo um número muito maior de gêneros em ambos os conjuntos de dados metagenômico e metatranscriptômico (Figura 2). Entretanto, o gênero mais abundante foi *Streptomyces*, representando 50,7% e 62,06% dos *reads* de DNA que codificam proteínas em P1 e P2, respectivamente. Relatos anteriores têm descrito *Streptomyces* spp. como eficientes degradadores de n-hexadecano, benzaldeído, catecol, ácido fenilacético e ácido protocatecuico (DA ROSA et al., 2013; RADWAN et al., 1998; BALACHANDRAN et al., 2012).

No conjunto de dados de metatranscriptômica, após 10 dias de enriquecimento, o gênero *Streptomyces* demonstrou uma baixa atividade metabólica, com apenas 0,84% dos *reads* de cDNA que codificam proteínas. Contudo, após 20 dias, os *reads* de cDNA que codificam proteínas relacionados a este gênero aumentaram para 51,42%, indicando a alta atividade metabólica deste grupo no enriquecimento sendo provavelmente os organismos chave no processo de biodegradação do petróleo após 20 dias de enriquecimento.

Os gêneros com maior atividade no conjunto de dados de metatranscriptoma após 10 dias de enriquecimento foram *Azoarcus*, *Thauera* e *Aromatoleum* (classe Betaproteobacteria), representando 13,52%, 12,33%, e 11,04% dos *reads* de cDNA que codificam proteínas, respectivamente (Figura 2). Estes gêneros têm sido relatados como metabolicamente muito versáteis com relação à utilização de hidrocarbonetos aromáticos como a única fonte de carbono e energia (SILVA et al., 2012; WIDDEL; RABUS, 2001; FOGHT, 2008; TRAUTWEIN et al., 2008; KASAI et al., 2006). Após 20 dias de enriquecimento (P2), os *reads* de cDNA que codificam proteínas dos gêneros *Thauera*, *Azoarcus* e *Aromatoleum* diminuíram para 3,5%, 3% e 2,7%, respectivamente. Estes resultados sugerem que estas Betaproteobactérias são responsáveis pela degradação

dos hidrocarbonetos aromáticos e que estes compostos são degradados nos primeiros dias do enriquecimento.

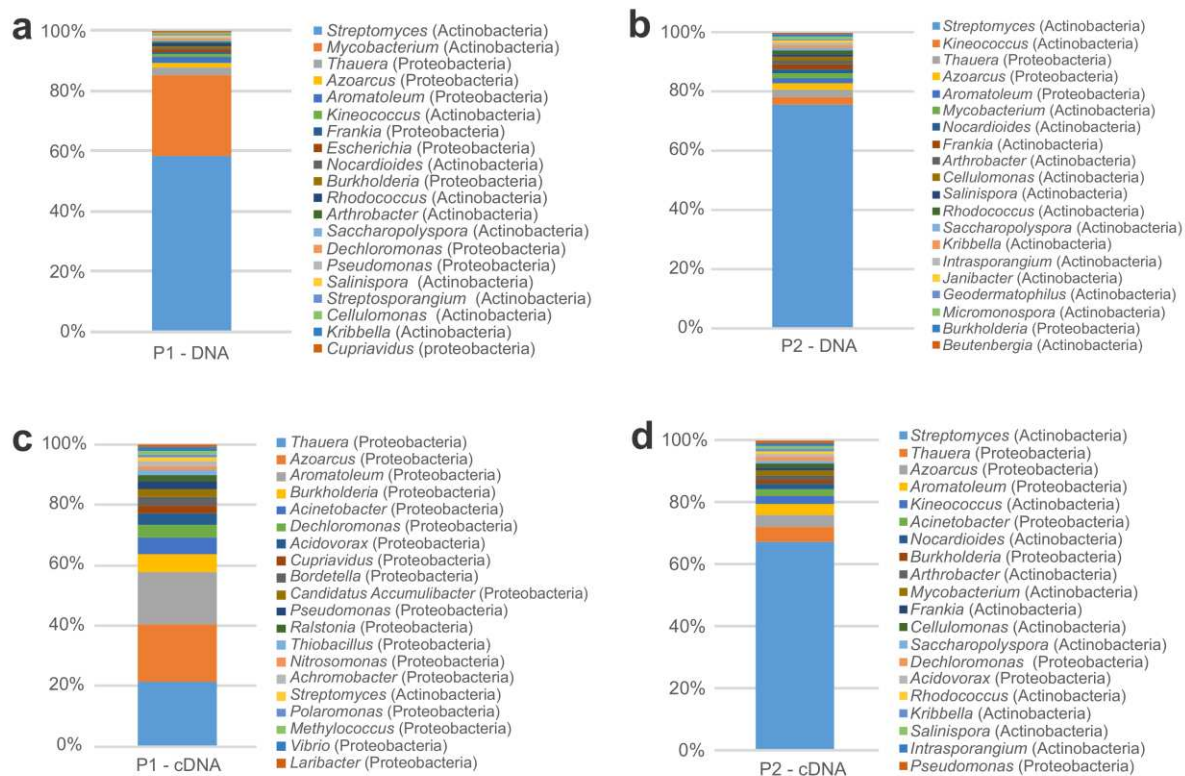


Figura 2. Abundância dos 20 gêneros mais dominantes encontrados nos conjuntos de dados de metagenoma (**a**, após 10 dias, e **b**, após 20 dias de incubação) e metatranscriptoma (**c**, após 10 dias, e **d**, após 20 dias de incubação) usando MG-RAST.

Os conjuntos de dados de metagenoma e metatranscriptoma mostraram a presença e atividade de alguns gêneros degradadores de hidrocarbonetos, como *Mycobacterium*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Geobacillus* e *Alcanivorax*. Estes gêneros possuem a versatilidade de atuar em hidrocarbonetos alcanos e aromáticos, especialmente em compostos de alto peso molecular (VILA; GRIFOLL, 2009; VAN BEILEN et al, 2003; 2004; SMITS et al., 2002; TUROVA et al., 2008).

Trabalhos publicados por nosso grupo de pesquisa relataram a caracterização da diversidade filogenética e funcional da comunidade microbiana presente na mesma

amostra de petróleo usada neste trabalho, originada do reservatório de petróleo terrestre (GMR75) da Bacia Potiguar, utilizando bibliotecas do gene RNAr16S e de genes catabólicos de degradação aeróbia e anaeróbia (SILVA et al., 2013; VASCONCELLOS et al., 2010; VERDE et al., 2013). Os autores demonstraram a dominância dos filos Proteobacteria e Actinobacteria e, em alguns casos, a presença e relevância dos gêneros *Thauera* e *Streptomyces* na comunidade microbiana da amostra de petróleo GMR75. No presente trabalho, o gênero mais abundante em ambos os enriquecimentos bacterianos P1 e P2 foi *Streptomyces*. Estas bactérias foram encontradas somente no trabalho de Silva e colegas (2013), baseado em bibliotecas de genes RNAr 16S obtidas diretamente a partir das amostras de petróleo, sugerindo que este táxon foi favorecido pelas condições do enriquecimento, provavelmente devido à sua habilidade em degradar hidrocarbonetos, permitindo-os utilizar eficientemente o petróleo como fonte de carbono e energia.

3.4.2 Análise funcional do metagenoma e metatranscriptoma

Para um melhor entendimento dos processos metabólicos utilizados pela comunidade de bactérias no enriquecimento aeróbio após 10 dias (P1) e 20 dias (P2) de incubação, as sequências funcionais das amostras de metagenoma e metatranscriptoma foram analisadas. As sequências foram funcionalmente anotadas com a plataforma MG-RAST usando o banco de dados do Subsistema SEED, com o *e-Value* máximo de $1e^{-10}$, identidade mínima de 60% e comprimento mínimo de alinhamento de 15 medido em aminoácidos para proteína. A análise funcional permitiu a classificação de 86,3% e 84,5% de sequências do metagenoma e 52,6% e 69,3% de sequências do metatranscriptoma em P1 e P2, respectivamente. O perfil metabólico básico da comunidade bacteriana do enriquecimento mostrou 27 categorias (Figura 3). A maioria das funções foi relacionada ao metabolismo de carboidratos, diversas funções, cofatores, aminoácidos e derivados e

metabolismo de proteínas, sugerindo os papéis dominantes destas categorias no funcionamento do sistema.

Para permitir uma visão mais profunda da composição e atividade da comunidade bacteriana recuperada do reservatório de petróleo, os genes com maior número de sequências no metagenoma e metatranscriptoma de P1 e P2 são descritos em detalhes nos itens subsequentes.

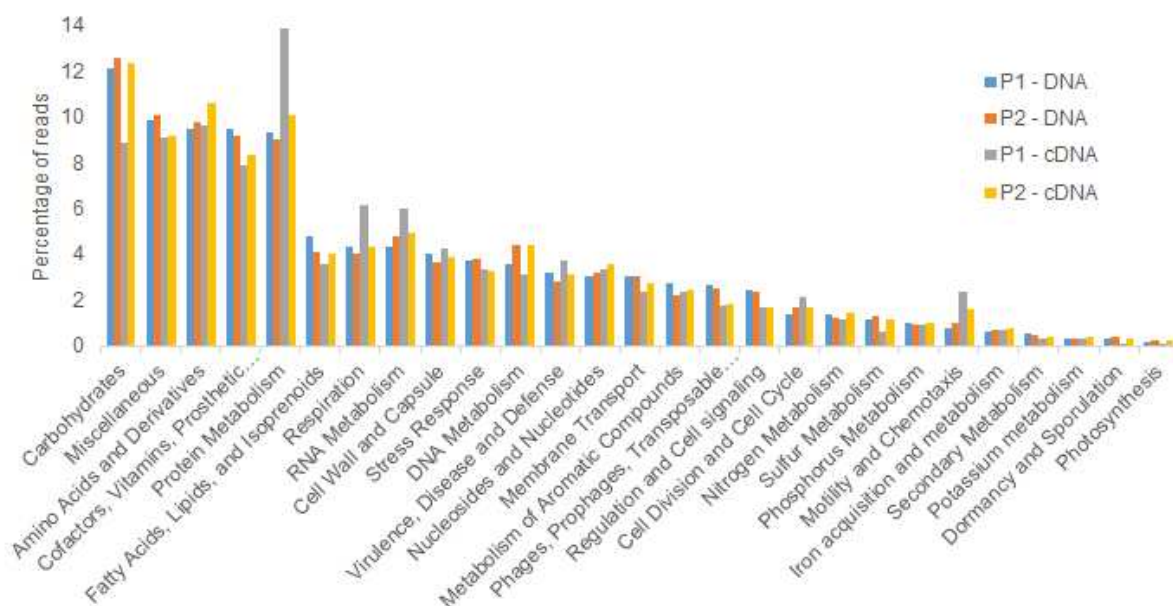


Figura 3. Perfil metabólico baseado nas análises automatizadas do subsistema SEED no MG-RAST. O número total de *reads* de DNA e cDNA foram atribuídos a categorias metabólicas básicas.

Ligase Coenzima A de ácido graxo de cadeia longa (EC 6.2.1.3)

Dentre todas as sequências gênicas encontradas no metagenoma e metatranscriptoma, as que codificam a proteína ligase CoA de ácido graxo de cadeia longa foi a mais abundante no período de incubação de 10 dias. Estas sequências foram classificadas nas categorias funcionais relacionadas com a biossíntese de biotina, regulação da degradação de ácidos graxos, metabolismo dos ácidos graxos e degradação

do ácido n-Fenilalcanoico. Os gêneros relacionados com estas sequências no P1 do metagenoma foi *Mycobacterium*, com 59,5% do total de *reads*, e do metatranscriptoma foi *Azoarcus*, o qual foi representado por 40,8% do total de *reads*, enquanto no P2 as sequências foram relacionadas ao gênero *Streptomyces*, com 66,7% dos *reads* do metagenoma e 42,4% dos *reads* do metatranscriptoma. Esta proteína tem um papel em vários processos metabólicos e regulatórios catalizando a formação de acil-CoA através do processo que requer ácido graxos, ATP e coenzima A como substratos (Faergeman et al., 1997). Devido à importância desta proteína, Dong e colaboradores (2012) caracterizaram dois genes que codificam esta proteína na bactéria degradadora de petróleo *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2, um bacilo termofílico isolado a partir de um reservatório profundo de petróleo na China. Os autores inocularam a bactéria em sacarose e no petróleo como fonte de energia e posteriormente observaram a expressão do RNAm por PCR em tempo real. Os resultados demonstraram que na presença do petróleo esse gene foi mais expresso, que na presença da sacarose, sugerindo a importância do mesmo no processo de degradação do petróleo. Yao e colaboradores (2013) observaram a presença deste gene no genoma de *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 e a ausência do mesmo no genoma da bactéria *Geobacillus thermodenitrificans* DSM465, a qual é incapaz de degradar alcanos. Estes resultados estão de acordo com os dados encontrados neste trabalho, uma vez que este gene foi o mais abundante e o mais expresso na comunidade bacteriana obtida após 10 dias de enriquecimento. Em adição, os resultados sugerem que a ligase CoA de ácido graxo de cadeia longa pode estar envolvida no passo inicial da degradação de petróleo.

Descarboxilase

Entre todas as sequências de genes encontradas nos conjuntos de dados do metagenoma e metatranscriptoma, o gene que codifica a enzima descarboxilase, envolvida na via para a regeneração do glioxilato para a assimilação de compostos C1 e C2, foi o mais abundante em 20 dias de enriquecimento. Nesta via alternativa, ocorre a desidratação de β -hidroxibutiril-CoA e a redução para butiril-CoA, o qual sofre carboxilação para etilmalonil-CoA. Subsequentemente, uma complexa série de descarboxilação, rearranjo e reações de carboxilação leva à formação de succinato (ENSIGN, 2006; KOROTKOVA et al., 2005). Neste estudo, encontramos sequências relacionadas à descarboxilase envolvida na conversão de etilmalonil-CoA para Isobutiril-CoA.

Ensign (2006) estudou esta via alternativa de assimilação de acetato e destacou a diversidade metabólica de bactérias que podem digerir compostos C2 e a importância de compreender o metabolismo microbiano de metabólitos centrais. Feng e colaboradores (2007) descreveram a sequência do genoma completo de *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 e seu proteoma parcial. Características metabólicas gerais e específicas foram descritas para esta bactéria, e os mecanismos de adaptação em reservatórios de petróleo foram discutidos. Os autores encontraram que proteínas envolvidas em uma via alternativa de glioxilato, que permite o crescimento em acetato como única fonte de carbono, foram expressas na linhagem NG80-2. Estes resultados sugeriram que esta bactéria possui vias metabólicas versáteis para a sua sobrevivência sob várias condições ambientais. Em reservatórios de petróleo, ácidos orgânicos, com o acetato sendo o mais abundante, são comumente detectados e tidos como importantes para a sobrevivência bacteriana (BRATH, 1991). Nossos resultados sugerem que a comunidade bacteriana utilizou esta via alternativa de assimilação do acetato após 20 dias de enriquecimento.

Os *reads* relacionados à descarboxilase encontrados em ambos os tempos de amostragem foram principalmente afiliados ao gênero *Streptomyces*. Estes representaram 42,4% e 57,41% dos *reads* do metagenoma e 52,3% e 51,4% dos *reads* do metatranscriptoma, para P1 e P2, respectivamente. Este gênero já foi descrito utilizando esta via alternativa do ciclo do glioxilato (HAN; REYNOLDS, 1997). Após 10 dias de enriquecimento as sequências metagenômicas relacionadas a esta proteína foram o segundo grupo mais abundante entre todas as sequências. No entanto, este gene não estava entre os mais expressos no metatranscriptoma de P1.

Fator sigma da RNA polimerase

Em todo o período do enriquecimento, sequências com similaridade a genes que codificam o fator σ da RNA polimerase estavam entre as sequências mais abundantes e expressas no metagenoma e metatranscriptoma. Estas sequências foram classificadas na categoria funcional de regulação de resposta ao estresse oxidativo. A proteína RNA polimerase está envolvida no processo de transcrição e o fator σ é uma subunidade destacável da RNA polimerase responsável pelo reconhecimento de sequências promotoras no DNA e pela regulação da expressão gênica em bactérias (BUSCHE et al., 2012). As sequências similares ao fator σ da RNA polimerase foram principalmente afiliadas ao gênero *Streptomyces* no metagenoma de P1 e P2 e no metatranscriptoma de P2, já no metatranscriptoma de P1, os *reads* foram afiliados ao gênero *Azoarcus*. Estes resultados sugerem que nos períodos de 10 e 20 dias de incubação os membros da comunidade envolvidos com a degradação do petróleo, *Streptomyces* e *Azoarcus*, estavam majoritariamente envolvidos com a síntese de proteínas responsáveis pela regulação do estresse oxidativo.

3.4.2.1 *Metabolismo de compostos aromáticos*

A categoria do metabolismo de compostos aromáticos é dividida em várias subcategorias. Foi observado que o nível 2 do subsistema SEED, teve a maior abundância de sequências nas vias periféricas para o catabolismo de compostos aromáticos, representando 52,8% e 41,2% dos *reads* no metagenoma e 49,7% e 46,2% dos *reads* no metatranscriptoma de P1 e P2, respectivamente, para esta categoria. No nível 3 do subsistema SEED estão importantes vias relacionadas à degradação de compostos aromáticos, tais como a degradação do bifenilo, degradação do benzoato, degradação do naftaleno e antraceno, degradação do ácido *n*-Fenilalcanoico e outros. Dentro deste nível, as sequências com maior abundância e atividade foram relacionadas à degradação do ácido *n*-Fenilalcanoico (Figura 4) e incluem enoil-CoA hidratase (EC 4.2.1.17), 3-OH-acil-CoA desidrogenase (EC 1.1.1.35), cis-trans-D3-D2-enoil-CoA isomerase (EC 5.3.3.8), 3-OH-butil-CoA epimerase (EC 5.1.2.3) e 3-cetoacil-CoA tiolase (EC 2.3.1.16). Estas proteínas são codificadas pelo operon *fadBA* relacionado à via da β -oxidação, responsável pela degradação de ácidos graxos, e sua indução ocorre pelo crescimento em meios contendo ácidos graxos de cadeia longa como fonte de carbono e energia (PAWAR; SCHULZ, 1981; ISHIKAWA et al., 1981; DIRUSSO, 1990).

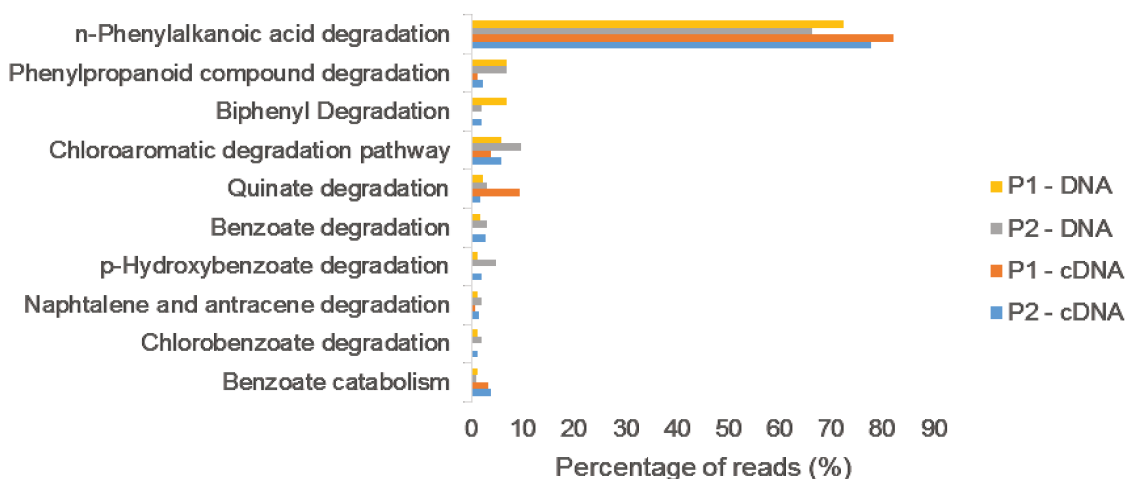


Figura 4. Distribuição dos *reads* de DNA e cDNA relacionados às vias periféricas para o catabolismo de compostos aromáticos com base no nível 3 dos subsistemas SEED.

Oliveira e colaboradores (2001) investigaram os genes e as enzimas envolvidas na β -oxidação dos ácidos n-fenilalcanóico e n-alcanóico em *Pseudomonas putida* U e demonstraram seu papel essencial na degradação do ácido n-fenilalcanóico e na síntese de novos poliésteres aromáticos biodegradáveis (bioplásticos). Eles observaram que *P. putida* U possui a habilidade para acumular uma reserva de ácido graxo (poliesteres), um provável evento secundário causado por uma excessiva acumulação de intermediários da β -oxidação, os quais podem ser usados quando a fonte de carbono do meio tiver sido esgotada, proporcionando a esta espécie vantagens nutricionais com respeito a outras bactérias que compartilham o mesmo habitat (OLIVEIRA et al., 2001).

Verde e colaboradores (2013) construíram uma biblioteca de genes catabólicos a partir de DNA extraído diretamente da mesma amostra de petróleo biodegradado (GMR75) usada neste trabalho e relataram a presença de genes envolvidos na degradação de compostos aromáticos (dioxigenases). Contudo, os resultados observados neste estudo revelaram uma baixa abundância destas proteínas após 20 dias de enriquecimento. Não obstante, algumas dioxigenases foram detectadas, assim como um

baixo nível de expressão gênica (Tabela 1). Dentre as sequências relacionadas com os genes que codificam dioxigenases foram encontradas uma dioxigenase envolvida na degradação aeróbia de fenol, tolueno, xileno e cresol utilizando a via *meta* (MERIMAA et al., 2006) e uma dioxigenase envolvida na via de degradação do bifenil, catalisando a clivagem do primeiro anel pela incorporação de dois átomos de oxigênio ao anel catecol (HATTA et al., 2003).

Lu e colaboradores (2011) encontraram que genes envolvidos na degradação de compostos aromáticos foram mais abundantes do que aqueles envolvidos na degradação de alcanos em amostras de pluma de óleo, o que pode ser importante para determinar os efeitos em longo prazo do derramamento de óleo nos ecossistemas marinhos.

Apesar do baixo número de sequências relacionadas aos genes envolvidos na degradação de compostos aromáticos, tais como degradação do bifenil, catabolismo e degradação de benzoato, degradação de naftaleno e degradação do clorobenzeno, um leve aumento na expressão de tais genes ocorreu após 20 dias de enriquecimento (Figura 4). Estes resultados sugerem que as bactérias que possuem genes de dioxigenase envolvidos na degradação de hidrocarbonetos aromáticos foram pouco enriquecidas sob as condições utilizadas. Além disso, os dados podem indicar também que o período de incubação não foi suficiente para a comunidade bacteriana iniciar ativamente o processo de degradação dos aromáticos, e, desta forma, níveis significativos de expressão de dioxigenases não foram observados.

Tabela 1. Anotação das sequências protéicas relacionadas a genes de dioxigenases envolvidas na degradação de compostos aromáticos a partir dos conjuntos de dados metagenômico e metatranscriptômico.

Nome	Organismo Hospedeiro	Proteína mais similar	Identidade AA (%)	Grupo
P1 - DNA (11120)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CPHL_A	Lignostilbene-alpha,beta-dioxygenase	311/311 (100%)	Actinobacteria
P1 - DNA (12808)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> 210	Phenylpropionate dioxygenase, large terminal subunit	114/114 (100%)	Actinobacteria
P1 - DNA (13826)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T17 Unclassified.	Lignostilbene-alpha,beta-dioxygenase	305/307 (99%)	Actinobacteria
P1 - DNA (14471)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	biphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase bphC	300/300 (100%)	Actinobacteria
P1 - DNA (18816)	<i>Kribbella flavida</i> DSM 17836	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	160/177 (90%)	Actinobacteria
P1 - DNA (4689)	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Oxidoreductase	72/76 (95%)	Actinobacteria
P1 - DNA (7865)	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	protocatechuate 3,4-dioxygenase subunit beta	172/173 (99%)	Actinobacteria
P1 - DNA (7866)	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) Unclassified.	protocatechuate 3,4-dioxygenase subunit alpha	60/66 (91%)	Actinobacteria
P1 - DNA (3205)	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680 Unclassified.	catechol 2,3-dioxygenase	253/314 (81%)	Actinobacteria
P2 - DNA (12482)	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	protocatechuate 3,4-dioxygenase subunit beta	22/23 (96%)	Actinobacteria
P2 - DNA (13247)	<i>Kribbella flavida</i> DSM 17836	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	78/93 (84%)	Actinobacteria
P2 - DNA (3188)	<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472 Unclassified.	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	67/87 (77%)	Betaproteobacteria
P2 - DNA (4241)	<i>Streptomyces coelicolor</i>	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	330/336 (98%)	Actinobacteria
P2 - DNA (7878)	<i>Saccharomonospora viridis</i> DSM 43017	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	57/58 (98%)	Actinobacteria
P2 - DNA (11735)	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680 Unclassified.	catechol 2,3-dioxygenase	55/70 (79%)	Actinobacteria
P2 - DNA (12483)	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) Unclassified.	protocatechuate 3,4-dioxygenase subunit alpha	43/50 (86%)	Actinobacteria
P2 - DNA (14931)	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Oxidoreductase	79/89 (89%)	Actinobacteria
P1 - cDNA (1526)	<i>Saccharomonospora viridis</i> DSM 43017	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	47/48 (98%)	Actinobacteria
P1 - cDNA (4072)	<i>Saccharomonospora viridis</i> DSM 43017	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	52/53 (98%)	Actinobacteria
P2 - cDNA (1536)	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	protocatechuate 3,4-dioxygenase subunit beta	246/253 (97%)	Actinobacteria
P2 - cDNA (5956)	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) Unclassified.	protocatechuate 3,4-dioxygenase subunit alpha	184/201 (92%)	Actinobacteria
P2 - cDNA (2958)	<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472 Unclassified.	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	69/88 (78%)	Betaproteobacteria
P2 - cDNA (12531)	<i>Streptomyces coelicolor</i>	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	329/335 (98%)	Actinobacteria
P2 - cDNA (2789)	<i>Kribbella flavida</i> DSM 17836	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	306/351 (87%)	Betaproteobacteria
P2 - cDNA (6549)	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Oxidoreductase	292/310 (94%)	Actinobacteria
P2 - cDNA (11807)	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680 Unclassified.	catechol 2,3-dioxygenase	68/77 (88%)	Actinobacteria

3.5. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo revelaram a dominância de Actinobacteria e a alta diversidade de Proteobacteria na microbiota recuperada após 20 dias de enriquecimento microbiano, confirmando a eficiência do método de enriquecimento em selecionar bactérias potencialmente envolvidas no processo de biodegradação de hidrocarbonetos. As sequências com maior abundância e níveis de expressão foram relacionadas aos genes envolvidos na assimilação de compostos C1 e C2 utilizando uma via alternativa, na regulação de estresse oxidativo e no metabolismo de compostos aromáticos, sugerindo uma adaptação da comunidade microbiana às condições do enriquecimento e um processo inicial de biodegradação de compostos de hidrocarbonetos. Contudo, genes mais especificamente relacionados ao passo inicial de oxidação de hidrocarbonetos não foram encontrados em nível de DNA. Estes dados sugerem que a microbiota enriquecida após 20 dias utilizou como fonte primária de carbono e energia outros compostos presentes no petróleo, possivelmente resultantes de um processo de degradação anterior. É provável que o período de incubação utilizado no presente estudo não tenha sido suficientemente longo para permitir a ocorrência de degradação de hidrocarbonetos, embora bactérias conhecidas por serem eficientes degradadoras tenham dominado o enriquecimento. Os resultados do presente trabalho demonstram o potencial da abordagem integrada de metagenoma e metatranscriptoma para explorar a diversidade microbiana em ambientes hostis tal como reservatório de petróleo na busca de um melhor entendimento do papel dos micro-organismos no processo de biodegradação.

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- An D, Caffrey SM, Soh J, Agrawal A, Brown D et al. (2013) Metagenomics of hydrocarbon resource environments indicates aerobic taxa and genes to be unexpectedly common. *Environ Sci Technol* 47: 10708–10717.
- Anders HJ, Kaetzke A, Kämpfer P, Ludwig W, Fuchs G (1995) Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the *Proteobacteria*. *Int J Syst Bacteriol.* 45(2): 327-333.
- Balachandran C, Duraipandiyan V, Balakrishna K, Ignacimuthu S (2012) Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. *Bioresour Technol* 112: 83-90.
- Baldwin BR, Nakatsu CH, Nies L (2003) Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 69(6): 3350–3358.
- Barth T (1991) Organic acids and inorganic ions in waters from petroleum reservoirs, Norwegian continental shelf: a multivariate statistical analysis and comparison with American reservoir formation waters. *Appl Geochem* (6): 1–15.
- Bell TH, Yergeau E, Martineau C, Juck D, Whyte LG, et al. (2011) Identification of Nitrogen-Incorporating Bacteria in Petroleum-Contaminated Arctic Soils by Using [15N] DNA-Based Stable Isotope Probing and Pyrosequencing. *Appl Environ Microbiol* 77(12): 4163-4171.
- Beller HR, Kane SR, Legler TC, Alvarez PJ (2002) A real-time polymerase chain reaction method for monitoring anaerobic, hydrocarbon-degrading bacteria based on a catabolic gene. *Environ Sci Technol* 36(18): 3977-3984.
- Bonch-Osmolovskaya EA, Miroshnichenko ML, Lebedinsky AV, Chernyh NA, Nazina TN, et al. (2003) Radioisotopic, culture-based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir. *Appl Environ Microbiol* 69: 6143-6151.
- Busche T, Šilar R, Pičmanová M, Pátek M, Kalinowski J (2012) Transcriptional regulation of the operon encoding stress-responsive ECF sigma factor SigH and its anti-sigma factor RshA, and control of its regulatory network in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Genomics* 13: 445.
- Coleman NV, Bui NB, Holmes AJ (2006) Soluble di-iron monooxygenase gene diversity in soils, sediments and ethane enrichments. *Environ Microbiol* 8: 1228–1239.
- da Rosa JP, Korenblum E, Franco-Cirigliano MN, Abreu F, Lins U, et al. (2013) *Streptomyces lunalinharesii* strain 235 shows the potential to inhibit bacteria involved in biocorrosion processes. *BioMed Research International*; 2013, p1

- DiRusso CC (1990) Primary sequence of the *Escherichia coli* *fadBA* operon, encoding the fatty acid-oxidizing multienzyme complex, indicates a high degree of homology to eucaryotic enzymes. *J Bacteriol* 172: 6459-6488.
- Dong Y, Du H, Gao C, Ma T, Feng L (2012) Characterization of two long-chain fatty acid CoA ligases in the Gram-positive bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2. *Microbiol Research* 167: 602– 607.
- Ensign SA (2006) Revisiting the glyoxylate cycle: alternate pathways for microbial acetate assimilation. *Mol Microbiol* 61(2): 274–276.
- Faergeman NJ, DiRusso CC, Elberger A, Knudsen J, Black PN (1997) Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* homologue to the murine fatty acid transport protein impairs uptake and growth on long-chain fatty acids. *J Biol Chem* 272(13): 8531–8538.
- Feng L, Wang W, Cheng J, Ren Y, Zhao G, et al. (2007) Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(13): 5602-5607.
- Fierer N, Bradford MA, Jackson RB (2007) Toward an Ecological Classification of Soil Bacteria. *Ecology* 88: 1354–1364.
- Foght J (2008) Anaerobic Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons: Pathways and Prospects. *J Mol Microbiol Biotechnol* 15: 93–120.
- Frias-Lopez J, Shi Y, Tyson GW, Coleman ML, Schuster SC, et al. (2008) Microbial community gene expression in ocean surface waters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3805–3810.
- Gilbert JA, Field D, Huang Y, Edwards R, Li W, et al. (2008) Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities. *PLoS One* 3: e3042.
- Han L, Reynolds KA (1997) A novel alternate anaplerotic pathway to the glyoxylate cycle in *streptomycetes*. *J Bacteriol* 179: 5157–5164.
- Hatta T, Mukerjee-Dhar G, Damborsky J, Kiyohara H, Kimbara K (2003) Characterization of a novel thermostable Mn(II)-dependent 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from a polychlorinated biphenyl- and naphthalene-degrading *Bacillus* sp. JF8. *J Biol Chem* 278(24): 21483-21492.
- Ishikawa M, Mikami Y, Usukura J, Iwasaki H, Shinagawa H, et al. (1997) Reconstitution, morphology and crystallization of a fatty acid β -oxidation multienzyme complex from *Pseudomonas fragi*. *Biochem J* 328: 815-820.
- Joshi MN, Dhebar SV, Dhebar SV, Bhargava P, Pandit A, et al. (2014) Metagenomics of petroleum muck: revealing microbial diversity and depicting microbial syntrophy. *Arch Microbiol*. DOI 10.1007/s00203-014-0992-0.

- Kasai Y, Takahata Y, Manefield M, Watanabe K (2006) RNA-based stable isotope probing and isolation of anaerobic benzene-degrading bacteria from gasoline-contaminated groundwater. *Appl Environ Microbiol* 72(5): 3586-3592.
- Korenblum E, Souza DB, Penna M, Seldin L (2012) Molecular Analysis of the Bacterial Communities in Crude Oil Samples from Two Brazilian Offshore Petroleum Platforms. *Internat J Microbiol* 2012, p1.
- Korotkova N, Lidstrom ME, Chistoserdova L (2005) Identification of genes involved in the glyoxylate regeneration cycle in *Methylobacterium extorquens* AM1, including two new genes, *meaC* and *meaD*. *J Bacteriol* 187: 1523–1526.
- Lazarevic V, Whiteson K, Huse S, Hernandez D, Farinelli L, et al. (2009) Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *J Microbiol Methods* 79: 266–271.
- Lu Z, Deng Y, Van Nostrand JD, He Z, Voordeckers J, Zhou A, et al. (2011). Microbial gene functions enriched in the Deepwater Horizon deep-sea oil plume. *ISME J* 6: 451–460.
- Magot MB, Ollivier B, Patel BKC (2000) Microbiology of petroleum reservoirs, Anton Leeuw *Int J G* 77: 103–116.
- Malik S, Beer M, Megharaj M, Naidu R (2008) The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environ. Int.* 34(2): 265-276.
- Mason OU, Hazen TC, Borglin S, Chain PS, Dubinsky EA, et al. (2012) Metagenome, metatranscriptome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deepwater Horizon oil spill. *ISME J* 6(9): 1715-1727.
- Merimaa M, Heinaru E, Liivak M, Vedler E, Heinaru A (2006) Grouping of phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase genes among phenol- and p-cresol-degrading *Pseudomonas* species and biotypes. *Arch Microbiol* 186: 287–296.
- Meyer F, Paarman D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, et al. (2008) The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 9: 386.
- Miqueletto PB, Andreote FD, Dias AC, Ferreira JC, Dos Santos Neto EV, et al. (2011) Cultivation-independent methods applied to the microbial prospection of oil and gas in soil from a sedimentary basin in Brazil. *AMB Express* 1: 35.
- Namiki T, Hachiya T, Tanaka H, Sakakibara Y (2012) MetaVelvet: an extension of Velvet assembler to de novo metagenome assembly from short sequence reads. *Nucleic Acids Res* 40(20): e155.
- Oliveira ER, Carnicero D, García B, Miñambres B, Moreno MA, et al. (2001) Two different pathways are involved in the β -oxidation of n-alkanoic and n-phenylalkanoic acids in *Pseudomonas putida* U: genetic studies and biotechnological applications. *Mol Microbiol* 39(4): 863-874.

- Oliveira VM, Sette LD, Simioni, KCM, Dos Santos Neto EV (2008) Bacterial diversity characterization in petroleum samples from Brazilian reservoirs. *Braz J Microbiol* 39(3): 445-452.
- Orphan VJ, Taylor LT, Hafenbradl D, Delong EF (2000) Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblage associated with high temperature petroleum reservoirs. *Appl Environ Microbiol* 66: 700–711.
- Orphan, V.J., Goffredi, S.K., Delong, E.F., and Boles, J.R. (2003) Geochemical influence on diversity and microbial processes in high temperature oil reservoirs. *Geomicrobiol J* 20: 295–311.
- Pawar S, Schulz H (1981) The structure of the multienzyme complex of fatty acid oxidation from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 256: 3894-3899.
- Peng Y, Leung HC, Yiu SM, Lv MJ, Zhu XG, et al. (2013) IDBA-tran: a more robust de novo de Bruijn graph assembler for transcriptomes with uneven expression levels. *Bioinformatics* 29 (13): i326-i334.
- Pfister CA, Meyer F, Antonopoulos DA (2010) Metagenomic profiling of a microbial assemblage associated with the California mussel: a node in networks of carbon and nitrogen cycling. *PLoS One* 5: e105180.
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, et al. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59–65.
- Radwan SS, Barabás G, Sorkhoh NA, Damjanovich S, Szabó I, et al. (1998) Hydrocarbon uptake by *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* 169(1): 87-94.
- Röling WF, Head IM, Larter SR (2003) The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. *Res Microbiol* 154(5): 321-328.
- Salinas MB, Fardeau M, Cayol J, Casalot L, Patel BKC, et al. (2004) *Petrobacter succinatimandens* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic, nitrate-reducing bacterium isolated from an Australian oil well. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 645-649.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, et al. (2009) Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75(23): 7537-7541.
- Sette LD, Simioni KCM, Vasconcelos SP, Dussán LJ, Marsaioli AJ, et al. (2007) Analysis of composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Anton Leeuw Int J G* 91: 253-266.
- Shestakova NM, Korshunova AV, Mikhailova EM, Sokolova DSH, Tourova TP, et al. (2011) Characterization of the aerobic hydrocarbon-oxidizing enrichments from a high-temperature petroleum reservoir by comparative analysis of DNA and RNA derived clone libraries. *Microbiology* 80: 60-69.

- Shi Y, Tyson GW, Eppley JM, DeLong EF (2011) Integrated metatranscriptomic and metagenomic analyses of stratified microbial assemblages in the open ocean. *ISME Journal* 5: 999–1013.
- Shinoda Y, Sakai Y, Uenishi H, Uchihashi Y, Hiraishi A, et al. (2004) Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. strain DNT-1. *Appl Environ Microbiol* 70(3): 1385-1392.
- Silva CC, Hayden H, Sawbridge T, Mele P, De Paula SO, et al. (2013) Identification of Genes and Pathways Related to Phenol Degradation in Metagenomic Libraries from Petroleum Refinery Wastewater. *PLoS ONE* 8(4): e61811.
- Silva CC, Hayden H, Sawbridge T, Mele P, Kruger RH, et al. (2012) Phylogenetic and functional diversity of metagenomic libraries of phenol degrading sludge from petroleum refinery wastewater treatment system. *AMB Express* 2(1): 18.
- Silva TR, Verde LCL, Dos Santos Neto EV, Oliveira VM (2013) Diversity analyses of microbial communities in petroleum samples from Brazilian oil fields. *Int Biodeter Biodegr* 81: 57–70.
- Smits THM, Balada SB, Witholt B, van Beilen JB (2002) Functional analysis of alkane hydroxylases from Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 184:1733-1742.
- Sun W, Cupples AM (2012) Diversity of five anaerobic toluene-degrading microbial communities investigated using stable isotope probing. *Appl Environ Microbiol* 78(4): 972-980.
- Trautwein K, Kühner S, Wöhlbrand L, Halder T, Kuchta K, et al. (2008) Solvent stress response of the denitrifying bacterium "*Aromatoleum aromaticum*" strain EbN1. *Appl Environ Microbiol* 74: 2267–2274.
- Turova TP, Nazina TN, Mikhaĭlova EM, Rodionova TA, Ekimov AN, et al. (2008) AlkB homologues in thermophilic bacteria of the genus *Geobacillus*. *Mol Biol (Mosk)* 42: 247-257.
- Urich T, Lanzen A, Qi J, Huson DH, Schleper C, et al. (2008) Simultaneous Assessment of Soil Microbial Community Structure and Function through Analysis of the Meta-Transcriptome. *PLoS One* 3(6): e2527.
- van Beilen JB, Li Z, Duetz WA, Smits THM, Witholt B: (2003) Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil Gas Sci Technol* 58:427-440.
- van Beilen JB, Marin MM, Smits THM, Roethlisberger M, Franchini AG, et al. (2004) Characterization of two alkane hydroxylase genes from the marine hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Environ Microbiol* 6:264-273.
- Vasconcellos SP, Angolini CFF, García INS, Dellagnezze BM, Silva CC, et al. (2010) Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs. *Organic Geochem* 41(7): 675–681.

- Verde LCL, Silva TR, Dellagnezze BM, Dos Santos Neto EV, Oliveira VM (2013) Diversity of Hydrocarbon-Related Catabolic Genes in Oil Samples from Potiguar Basin (RN, Brazil) *J Pet Environ Biotechnol* 4: 2.
- Vila J, Grifoll M (2009) Actions of *Mycobacterium* sp. strain AP1 on the saturated- and aromatic-hydrocarbon fractions of fuel oil in a marine medium. *Appl Environ Microbiol* 75(19): 6232-6239.
- Widdel F, Rabus R (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol* 12(3): 259-276.
- Yao N, Ren Y, Wang W (2013) Genome sequence of a thermophilic bacillus, *Geobacillus thermodenitrificans* DSM465. *Genome Announc.* 1(6): e01046-13.
- Yergeau E, Sanschagrín S, Beaumier D, Greer CW (2012) Metagenomic Analysis of the Bioremediation of Diesel-Contaminated Canadian High Arctic Soils. *PLoS ONE* 7(1): e30058.
- Yu K, Zhang T (2012) Metagenomic and Metatranscriptomic Analysis of Microbial Community Structure and Gene Expression of Activated Sludge. *PLoS ONE* 7(5): e38183.

5. DISCUSSÃO GERAL

Um dos grandes problemas enfrentados nas indústrias de petróleo é o processo de biodegradação do óleo, levando à diminuição do seu valor de mercado devido à baixa quantidade de hidrocarbonetos saturados, além do aumento da densidade, acidez, metais pesados e quantidade de enxofre, gerando uma redução da velocidade de vazão e comprometendo as operações do refino (WHITE et al., 2003). Devido a esses problemas, a indústria de petróleo nacional (Petrobras) passou a investir em pesquisas sobre biodegradação, na tentativa de compreender melhor esse processo e minimizar os problemas causados.

Devido ao fato do petróleo ser uma mistura complexa de compostos orgânicos e dos ambientes dos reservatórios possuírem características físico-químicas distintas, o estudo da diversidade microbiana dos reservatórios de petróleo torna-se extremamente importante para entender a suscetibilidade do reservatório ao processo de biodegradação. Uma grande parte dos micro-organismos presentes nos reservatórios de petróleo não é capaz de ser cultivada utilizando técnicas tradicionais de microbiologia, havendo a necessidade da utilização de técnicas moleculares independente de cultivo para caracterizar de maneira mais precisa a comunidade microbiana (VOORDOUW et al. 1996; SETTE et al. 2007; AN et al. 2013). Embora o número de espécies de micro-organismos encontrados nos reservatórios de petróleo venha aumentando, o nosso conhecimento sobre o papel desenvolvido por essa comunidade no processo de biodegradação ainda é escasso.

No presente estudo, foi utilizada uma abordagem de caráter polifásico, visando investigar a diversidade de genes catabólicos da microbiota presente em amostras de petróleo de reservatórios brasileiros biodegradado e não biodegradado utilizando métodos para como caracterizar a comunidade microbiana aplicando métodos baseados em

enriquecimento e independentes de cultivo de maneira a contribuir para a elucidação das vias gênicas envolvidas nos processos de biodegradação em ambientes de reservatório.

Primeiramente, neste trabalho foram analisados os dados da diversidade de genes catabólicos da comunidade microbiana envolvidos em processos aeróbios e anaeróbios de degradação dos reservatórios de petróleo, os quais revelaram uma diferença na distribuição de genes catabólicos entre os poços de petróleo biodegradado e não biodegradado. No poço de petróleo biodegradado ocorreu uma maior diversidade das sequências do gene de degradação aeróbia alceno monooxigenase (*alk*) e do gene de degradação anaeróbia 6-oxociclohex-1-ene-1-carboxil-CoA hidrolase (*bamA*), e o gene aeróbio dioxigenase (ARHD) foi mais diverso no poço não biodegradado. Em todas as bibliotecas dos genes catabólicos, o filo Proteobacteria foi o grupo dominante. O filo Proteobacteria possui uma grande diversidade de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos pertencentes às Classes Alfa, Beta, e Gamaproteobacteria (VAN BEILEN et al., 2003 e VAN BEILEN; FUNHOFF, 2007).

Nas bibliotecas do gene catabólico *alk* foram encontradas sequências afiliadas aos gêneros *Geobacillus*, *Acinetobacter* e *Streptomyces*. Estes gêneros são conhecidos por possuírem a capacidade de degradar hidrocarbonetos (TUROVA et al., 2006; BARBE et al., 2004; VAN BEILEN et al., 2003). Resultados similares quanto à diversidade bacteriana também foram observados por Silva et al. (2013) em estudo da comunidade microbiana utilizando bibliotecas de genes 16S rRNA das mesmas amostras de petróleo utilizadas no presente trabalho. Os autores demonstraram a presença dos mesmos gêneros encontrados neste trabalho, com algumas divergências.

No trabalho reportado por Silva e colaboradores (2013), o gênero *Geobacillus* foi encontrado somente no poço de petróleo não biodegradado (PTS1) e em alta abundância, contrariamente ao resultado observado no presente trabalho, com a presença deste

gênero somente no poço de petróleo biodegradado e em baixa abundância. De acordo com a literatura, este gênero é comumente isolado de reservatórios de petróleo de altas temperaturas e possui potencial para degradar o óleo (ONSTOTT et al., 1998; KATO et al., 2009). Neste sentido, fatores abióticos limitantes do processo de biodegradação, como temperatura, quantidade de nutrientes, pressão e metais pesados (MAGOT et al., 2005; ALMEIDA et al., 2012) poderiam explicar os resultados observados para os óleos da Bacia Potiguar, ou seja, a alta abundância de *Geobacillus* associada à não degradação do óleo.

Quando a abordagem de metagenômica e metatranscriptômica foi empregada, o gênero *Geobacillus* foi encontrado em baixa abundância e atividade, além disso, não foi encontrada nenhuma sequência que codifique genes de alceno monooxigenase relacionadas a este gênero, indicando que o enriquecimento não foi eficiente para o desenvolvimento destas bactérias envolvidas no processo de degradação de hidrocarbonetos.

Outro gênero encontrado nas bibliotecas dos genes catabólicos (Capítulo 1) e por Silva e colaboradores (2013) foi *Streptomyces*. Membros pertencentes a este gênero têm sido descritos como eficientes degradadores de hidrocarbonetos (RADWAN et al., 1998; BALACHANDRAN et al., 2012), além de ter um potencial uso na indústria de petróleo como biocidas de bactérias envolvidas no processo de biocorrosão (DA ROSA et al., 2013). No entanto, neste trabalho a presença deste gênero foi observada somente no poço não biodegradado e em ambos os poços de petróleo biodegradado e não biodegradado por Silva et al. (2013). O fato deste gênero ter sido encontrado somente no poço não biodegradado pode ter sido decorrente do esforço amostral, o qual não foi suficiente para cobrir ambos os poços e detectar sequências afiliadas a este gênero. Em estudos similares acerca da diversidade microbiana de poços biodegradados e não

biodegradados da bacia de Campos, realizados por Sette et al. (2007) e Oliveira et al. (2008), foi observada a presença deste gênero em ambos os poços, corroborando os resultados encontrados por Silva et al. (2013).

O gênero *Streptomyces* foi encontrado em alta abundância no enriquecimento aeróbio do poço de petróleo biodegradado através da abordagem metagenômica, confirmando a presença deste gênero neste poço. Porém, a metatranscriptômica revelou que este gênero apresentou um baixo nível de atividade nos primeiros 10 dias de enriquecimento, e posteriormente se tornou o gênero mais ativo na comunidade microbiana do enriquecimento, após 20 dias de incubação. Não foram encontradas sequências que codificam monoxigenases relacionadas a este gênero, sugerindo que apesar da dominância deste gênero o enriquecimento não foi seletivo para bactérias que possuem sequências de genes envolvidos na degradação de hidrocarbonetos alifáticos. Dentre as espécies encontradas, as que possuíram maior abundância de genes e nível de expressão foram *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor* e *Streptomyces avermitilis*.

O gênero *Acinetobacter* foi dominante em relação ao gene que codifica a alceno monoxigenase nas bibliotecas de genes catabólicos dos dois poços, biodegradado e não biodegradado. Contudo, no poço biodegradado foi observada uma maior diversidade de OPFs (Familia Proteica Operacional) em relação ao poço não biodegradado. Este gênero pertence à classe Gamaproteobacteria, conhecida por possuir bactérias envolvidas no processo de biodegradação de hidrocarbonetos (SMITS et al., 1999; WENTZEL et al., 2007). Silva e colaboradores (2013) encontraram um resultado similar em relação a este gênero, corroborando com o resultado encontrado neste trabalho. Sette e colaboradores (2007) encontraram este gênero somente nas amostras do petróleo biodegradado.

Apesar da baixa abundância desse gênero nos dados de metagenoma dos enriquecimentos, vale ressaltar que o número de sequências relacionadas a este gênero não se alterou em função do tempo de incubação, por outro lado, este gênero apresentou um aumento na quantidade de sequências expressas ao longo do enriquecimento, indicando um aumento na atividade de membros deste gênero após 20 dias de incubação. Dentre as populações que tiveram a sua expressão aumentada estão as de *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter* sp. ATCC 27244, *Acinetobacter* sp. ADP1 e *Acinetobacter oleivorans*, conhecidas por seu potencial de degradação de hidrocarbonetos.

Dentre as OPFs encontradas nas bibliotecas do gene catabólico *alk* foi observada uma sequência no poço biodegradado que não apresentou homologia a nenhuma sequência presente no banco de dados (NCBI), sugerindo que se trata de uma nova sequência do gene *alk* de uma bactéria nativa do reservatório de petróleo. Kuhn e colaboradores (2009) encontraram uma distribuição diferencial do gene *alk* entre dois ambientes marinhos da Antártica, sendo a maioria das sequências representante de possíveis novos genes *alk*. Um estudo de amostras de solo petrolífero revelou também uma alta diversidade de genes alceno monoxigenase em comparação a amostras de solo não petrolíferos, e as análises filogenéticas indicaram que a maioria das sequências correspondentes ao gene *alk* representava potencialmente novos genes (MIQUELETTO et al., 2011).

Os resultados obtidos pela abordagem de metagenômica e metatranscriptômica revelaram que o enriquecimento foi eficiente na seleção de gêneros conhecidos por suas habilidades de degradação de hidrocarbonetos, demonstrando que estes estão presentes na amostra de petróleo biodegradado GMR75, além de corroborar os resultados observados na biblioteca do gene *alk* para os gêneros apresentados. Contudo, não foram

encontradas em nível de RNA, sequências correspondentes ao gene *alk* no enriquecimento após 20 dias de incubação, o que sugere que o tempo de incubação não foi o suficiente para que o processo de biodegradação fosse iniciado, apesar da presença dos gêneros envolvidos neste processo.

Nas bibliotecas dos genes catabólicos ARHDs, ao contrário do resultado obtido nas bibliotecas do gene *alk*, foi observada uma maior diversidade de OPFs no poço não biodegradado (PTS01) em relação ao poço biodegradado (GRM75). As sequências encontradas nestas bibliotecas foram relacionadas aos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia*. Estes gêneros são conhecidos por possuírem uma maquinaria que os possibilita degradar hidrocarbonetos aromáticos com uma grande eficiência (VAN HAMME et al., 2003).

O gênero *Pseudomonas* tem sido extensivamente estudado em relação às vias metabólicas envolvidas na degradação de compostos aromáticos como o naftaleno, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BOSCH et al., 1999; TÁNCSICS et al., 2010). Uma nova organização genética e co-regulação de um grupo de genes envolvidos nos primeiros passos das vias de degradação do fenol e benzeno foram descritos em *Pseudomonas* sp. M1 (SANTOS; SÁ-CORREIA, 2007). Os autores demonstraram que esta espécie exibiu uma excepcional habilidade de biodegradação para uma variedade de compostos recalcitrantes e/ou tóxicos.

A presença dominante de sequências de dioxigenase do gênero *Pseudomonas* encontradas no poço biodegradado em comparação ao poço não biodegradado, onde somente duas sequências foram observadas, corroborando os resultados encontrados por Silva et al. (2013). A presença dominante deste gênero no poço biodegradado pode ser uma possível causa da condição deste poço, uma vez que este gênero possui a

habilidade de expressar genes de dioxigenase rapidamente em resposta à contaminação com petróleo (PAISSÉ et al., 2011).

Dentre as espécies encontradas no metagenoma e metatranscriptoma dos enriquecimentos aeróbios estão *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas stutzeri*, conhecidas por sua versatilidade no processo de degradação de hidrocarbonetos aromáticos. Yergeau e colaboradores (2012) monitoraram a comunidade microbiana de solos tratados com escavação, aeração e fertilização e não tratados, em Alert, no Canadá. Os autores, através de uma abordagem metagenômica e quantificação dos genes envolvidos no processo de degradação de hidrocarbonetos, demonstraram que a contaminação com hidrocarbonetos e o tratamento do solo modificaram drasticamente a comunidade microbiana, favorecendo organismos aeróbios com potencial para degradar vários compostos de hidrocarbonetos, com predomínio do gênero *Pseudomonas*.

O gênero *Burkholderia* tem sido amplamente estudado em relação à degradação de hidrocarbonetos aromáticos de baixo peso molecular, como naftaleno e fenantreno (LAURIE; LLOYD-JONES, 2000), além de terem sido detectados em amostras de petróleo (YOSHIDA et al., 2005 e KORENBLUM et al., 2012). Nas bibliotecas dos genes catabólicos ARHDs, as OPFs afiliadas a este gênero foram encontradas somente no poço não biodegradado PTS01. Por outro lado, este gênero foi detectado no poço biodegradado (GMR75) através da abordagem integrada de metagenômica e metatranscriptômica, demonstrando que a utilização de sequenciamento em larga escala proporcionou uma melhor cobertura da diversidade presente na amostra. Adicionalmente, o gênero *Burkholderia* pode ter sido favorecido nas condições do enriquecimento, facilitando a sua detecção pela abordagem de metagenômica. A utilização de um sequenciador de segunda geração, como o Illumina, é uma ferramenta poderosa que

oferece alta sensibilidade, permitindo a detecção e quantificação relativa de milhares de genes, mesmo em baixa abundância (DEGNAN; OCHMAN, 2012).

Os dados de metagenômica e metatranscriptômica revelaram a presença das seguintes espécies do gênero *Burkholderia* nos enriquecimentos: *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia multivorans*, e *Burkholderia xenovorans*, além de espécies não identificadas (*Burkholderia* sp.).

O mesmo resultado observado para o gênero *Acinetobacter* ocorreu para os gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia*, ou seja, a sua presença nos enriquecimentos não foi modificada entre os tempos de incubação de 10 e 20 dias. No entanto, em nível de metatranscriptoma este gênero apresentou um aumento na abundância de sequências expressas, indicando um aumento na sua atividade após 20 dias de incubação.

As OPFs encontradas na biblioteca ARHD agruparam entre si e formaram *clusters* filogeneticamente distintos das sequências conhecidas disponíveis nas bases de dados públicas, sugerindo que essas sequências podem representar novos genes de dioxigenases de organismos ainda não identificados.

Ao contrário do observado para o gene *alk* no metagenoma e metatranscriptoma, o gene ARHD foi observado após 20 dias de incubação, sugerindo que o enriquecimento favoreceu populações com capacidade de degradação de compostos aromáticos. Um resultado similar foi observado por Lu e colaboradores (2011) em um enriquecimento de amostras de um derramamento de petróleo no Golfo do México. Foram encontradas sequências similares a genes que codificam dioxigenases como: catecol 2,3-dioxigenase, homogentisato 1,2 – dioxigenase, protocatecuato 3,4 – dioxigenase (cadeia α e β), 2,3 dihidroxibifenil 1,2-dioxigenase e 4 – hidroxifenilpiruvato dioxigenase. Dentre estas dioxigenases, somente a 4 – hidroxifenilpiruvato dioxigenase foi encontrada no

metatranscriptoma após 10 dias. Após 20 dias de incubação, as dioxigenases catecol 2,3-dioxigenase, 4 – hidroxifenilpiruvato dioxigenase e homogentisato 1,2 – dioxigenase mostraram um aumento relativo na sua abundância, sugerido aumento na sua expressão e, conseqüentemente, aumento na degradação de compostos aromáticos.

As sequências encontradas na biblioteca do gene *bamA* foram relacionadas aos gêneros *Synthrophus* e *Desulfobacterium*. Estes gêneros são extensivamente estudados e conhecidos por possuírem uma maquinaria que os possibilita degradar anaerobicamente hidrocarbonetos aromáticos com uma grande eficiência. Os resultados observados na biblioteca do gene catabólico *bamA* revelaram uma maior diversidade deste genes no poço biodegradado GMR75.

Assim como ocorreu nas bibliotecas dos genes *alk* e ARHD, a maioria das OPFs encontradas na biblioteca *bamA* agrupou entre si e formou *clusters* filogeneticamente distintos das sequências conhecidas disponíveis nas bases de dados públicas, sugerindo que essas sequências podem representar novos genes catabólicos de organismos ainda não identificados.

Nas análises dos genes catabólicos obtidas do enriquecimento aeróbio por PCR em Tempo Real, apesar da presença do hexadecano ter interferido na análise de degradação do petróleo por cromatografia, foi observado que a abundância dos genes de dioxigenase foi significativamente maior em relação àquela observada para o gene da alcano monoxigenase. Em adição, a expressão dos genes *alk* não foi observada no enriquecimento.

O fato do hexadecano não ter estimulado a abundância e expressão do gene de degradação de alcanos (*alk*), aliado aos resultados gerados pelo sequenciamento Illumina, sugere que a comunidade bacteriana presente no poço de petróleo

biodegradado GMR75 possui uma preferência inicial na degradação dos compostos aromáticos. Em um trabalho recente, Lu e colaboradores (2012) analisaram uma comunidade bacteriana de amostras de pluma de óleo e observaram também que os genes envolvidos na degradação de hidrocarbonetos aromáticos foi mais abundante que os genes envolvidos na degradação de alcanos.

Nos dados de metagenoma e metatranscriptoma foram encontradas sequências em 27 categorias funcionais, com a maioria delas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, cofatores, amino ácidos e derivados e metabolismo de proteínas, sugerindo o dominante papel destas categorias no sistema funcional.

Para entender melhor a composição e atividade da comunidade bacteriana recuperada da amostra de petróleo biodegradado, os genes com maior número de sequências no metagenoma e metatranscriptoma de 10 e 20 dias de enriquecimento foram relacionados a proteínas envolvidas na degradação do petróleo, assimilação de compostos C1 e C2 e uma proteína reguladora de estresse oxidativo, sugerindo uma adaptação ao enriquecimento e um processo inicial de biodegradação de compostos aromáticos. Na realidade, genes relacionados à assimilação de acetato e degradação de ácidos graxos foram os mais abundantes e expressos, sugerindo que a microbiota enriquecida por 20 dias utilizou, ao invés dos hidrocarbonetos, outros compostos já presentes no petróleo como fonte de carbono e energia, possivelmente resultado de um processo prévio de degradação.

Devido à relevância da degradação de compostos aromáticos neste trabalho, os genes que codificam as enzimas importantes relacionadas a este processo foram analisados, mesmo não sendo uma das categorias metabólicas mais abundantes. Nesta categoria metabólica foram encontrados genes relacionados à degradação do bifênolo, benzoato, naftaleno e antraceno, degradação do ácido *n*-Fenilalcanóico e outros.

Contudo, as sequências com maior abundância e atividade foram relacionadas à degradação do ácido *n*-Fenilalcanoico. Estas proteínas são codificadas pelo operon *fadBA* relacionado à via da β -oxidação, responsável pela degradação de ácidos graxos, e sua indução ocorre pelo crescimento em meios contendo ácidos graxos de cadeia longa como fonte de carbono e energia (PAWAR; SCHULZ, 1981; ISHIKAWA et al., 1997; DIRUSSO, 1990).

6. CONCLUSÕES GERAIS

- 6.1 Os resultados obtidos nas análises de diversidade das bibliotecas dos genes catabólicos *alk*, ARHD e *bamA* revelaram que para os genes *alk* e *bamA* o poço de petróleo GMR75 apresentou-se mais diverso em relação ao poço de petróleo PTS01, entretanto para o gene ARHD o poço PTS01 foi mais diverso que o poço GMR75. Estes dados podem indicar a presença de maior diversidade de micro-organismos capazes de degradar alcanos aerobicamente e aromáticos anaerobicamente no poço biodegradado GMR75;
- 6.2 As sequências dos genes catabólicos obtidos mostraram-se filogeneticamente relacionadas aos gêneros *Geobacillus*, *Acinetobacter* e *Streptomyces* para os genes *alkB*; *Pseudomonas* e *Burkholderia* para os genes ARHD e *Syntrophus* para os genes *bamA*. Estes dados de sequência sugerem que a microbiota presente em ambas as amostras de óleo biodegradado e não biodegradado possui o potencial genético para degradação aeróbia e anaeróbia de hidrocarbonetos do petróleo.
- 6.3 A maioria das sequências dos genes catabólicos das amostras de petróleo biodegradado e não biodegradado agrupou entre si e formou *clusters* filogeneticamente distintos das sequências conhecidas disponíveis nas bases de dados, sugerindo que essas sequências podem representar genes novos de organismos ainda não cultivados;
- 6.4 Os resultados obtidos nas análises filogenética e funcional dos enriquecimentos aeróbios revelaram a maior abundância do filo Actinobacteria (gênero *Streptomyces*) ao final do enriquecimento, seguido pelo filo Proteobacteria (classe β -Proteobacteria), demonstrando a seleção massiva de uma grande diversidade de bactérias potencialmente envolvidas no processo de biodegradação de hidrocarbonetos;

- 6.5 As sequências com maior abundância e nível de expressão foram relacionadas aos genes que codificam proteínas envolvidas na degradação de petróleo, assimilação de compostos C1 e C2 utilizando uma via alternativa e regulação de estresse oxidativo, sugerindo uma adaptação às condições do enriquecimento e o início do processo de biodegradação de compostos aromáticos.
- 6.6 Apesar do período de incubação de 20 dias utilizado no presente trabalho não ter sido suficiente para permitir observar um alto nível de expressão de genes relacionados com o processo de biodegradação de hidrocarbonetos, foram encontradas sequências afiliadas a bactérias conhecidas por serem eficientes degradadoras e que dominaram o ambiente do enriquecimento;
- 6.7 Os resultados do presente trabalho demonstram o potencial da abordagem combinada de metagenômica e metatranscriptômica para investigar a diversidade microbiana em ambientes hostis como reservatórios de petróleo e obter um melhor entendimento dos papéis dos micro-organismos no processo de biodegradação.

7. PERSPECTIVAS

- 7.1 Aumento no tempo de incubação do ensaio de biodegradação a fim de obter resultados mais conclusivos sobre as etapas e os genes aeróbios como o *alk* e ARHD envolvidos na degradação do óleo;
- 7.2 Confirmação do potencial da microbiota de degradação dos hidrocarbonetos presentes no petróleo através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;
- 7.3 Avaliação da influência de fatores como alta temperatura, salinidade, metais pesados, dentre outros, no processo de biodegradação pela comunidade microbiana presente em reservatórios de petróleo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- Achong, G. R.; Rodriguez, A. M.; Spormann, A. M. (2001) Benzylsuccinate synthase of *Azoarcus* sp. strain T: cloning, sequencing, transcriptional organization, and its role in anaerobic toluene and *m*-xylene mineralization. *J. Bacteriol.* 183: 6763-6770.
- Aitken, C. M.; Jones, D. M.; Larter, S. R. (2004) Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs. *Nature* 431: 291-294.
- Almeida, R.; Mucha, A. P.; Teixeira, C.; Bordalo, A. A.; Almeida, C. M. R. (2012) Biodegradation of petroleum hydrocarbons in estuarine sediments: metal influence. *Biodegradation* DOI 10.1007/s10532-012-9562-9.
- Amann, R. I.; Ludwig, W.; Schleifer, K. H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews.* 59: 143-169.
- Amouric, A.; Quéméneur, M.; Grossi, V.; Liebgott, P. P.; Auria, R.; Casalot, L. (2009) Identification of different alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus ruber* strain SP2B, an hexane-degrading actinomycete. *Journal of applied microbiology* 1-14.
- An, D.; Caffrey, S. M.; Soh, J.; Agrawal, A.; Brown, D.; et al. (2013) Metagenomics of hydrocarbon resource environments indicates aerobic taxa and genes to be unexpectedly common. *Environ. Sci. Technol.* 47: 10708–10717.
- Atlas, R. M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45: 180–209.
- Aziz, R. K.; Bartels, D.; Best, A. A.; Dejongh, M.; Disz, T.; et al. (2008) The RAST Server: Rapid Annotation using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9: 75.
- Balachandran, C.; Duraipandiyar, V.; Balakrishna, K.; Ignacimuthu, S. (2012) Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. *Bioresour. Technol.* 112: 83-90.
- Baldwin, B. R.; Nakatsu, C. H.; Nies, L. (2003) Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 69(6): 3350–3358.
- Barbe, V.; Vallenet, D.; Fonknechten, N.; Kreimeyer, A.; Oztas, S.; et al. (2004) Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic. Acids. Res.* 32: 5766-5779.
- Bastin E. (1926) Microorganisms in oil fields. *Science*, 63: 21-24.
- Batie, C. J.; Ballou, D. P.; Correll, C. C. (1991) Phthalate dioxygenase reductase and related flavin-iron-sulfur containing electron transferases. *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes* 3: 543-556.

- Behar, F.; Barros Penteado, H. L.; Lorant, F.; Budzinsk, H. (2006). Study of biodegradation processes along the Carnaubais trend, Potiguar Basin (Brazil) – Part 1. *Organic Geochemistry* 37: 1042–1051.
- Bell, T. H.; Yergeau, E.; Martineau, C.; Juck, D.; Whyte, L. G.; Greer, C. W. (2011) Identification of Nitrogen-Incorporating Bacteria in Petroleum-Contaminated Arctic Soils by Using [15N]DNA-Based Stable Isotope Probing and Pyrosequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 77(12): 4163-71.
- Beller, H. R.; Kane, S. R.; Legler, T. C.; Alvarez, P. J. (2002) A real-time polymerase chain reaction method for monitoring anaerobic, hydrocarbon-degrading bacteria based on a catabolic gene. *Environ. Sci. Technol.* 36(18): 3977-3984.
- Beller, H. R.; Spormann, A. M. (1998) Analysis of the novel benzylsuccinate synthase reaction for anaerobic toluene activation based on structural studies of the product. *J. Bacteriol.* 180: 5454-5457.
- Beller, H. R.; Spormann, A. M. (1999) Substrate range of benzylsuccinate synthase from *Azoarcus* sp. strain T. *FEMS Microbiol. Lett.* 178: 147-153.
- Bonch-Osmolovskaya, E. A.; Miroshnichenko, M. L.; Lebedinsky, A. V.; Chernyh, N. A.; Nazina, T. N.; et al. (2003) Radioisotopic, culture-based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6143-6151.
- Boll, M., Heider, J. (2010) Anaerobic degradation of hydrocarbons: mechanisms of C-H-Bond activation in the absence of oxygen. In: Handbook of hydrocarbon and lipid Microbiology. Timmis K. N. (ed.). Berlin Heidelberg. Springer-Verlag, 1012-1024
- Bosch, R.; Garcia-Valdes, E.; Moore, E. R. (1999) Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene- degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene* 236: 149–157.
- Brakstad, O.G.; Iodeng A. G. G. (2005) Microbial diversity during biodegradation of crude oil in seawater from the North Sea. *Microb. Ecol.* 49:94–103.
- Brennerova, M. V.; Josefiova, J.; Brenner, V.; Pieper, D. H.; Junca, H. (2009) Metagenomics reveals diversity and abundance of meta-cleavage pathways in microbial communities from soil highly contaminated with jet fuel under air-sparging bioremediation. *Environmental Microbiology* 11: 2216– 2227.
- Canosa, I.; Sánchez-Romero, J. M.; Yuste, L.; Rojo, F. (2000) A positive feedback mechanism controls expression of AlkS, the transcriptional regulator of the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway. *Molecular Microbiology* 35(4): 791-799.
- Canosa, I.; Yuste, L.; Rojo, F. (1999) Role of the alternative sigma factor σ_s in expression of the AlkS regulator of the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway. *Journal of Bacteriology* 181(6): 1748–1754.

- Carmona, M.; Zamarro, M. T.; Blazquez, B.; Durante-Rodríguez, G.; Juárez, J. F.; Valderrama, J. A.; Barragán, M. J. L.; García, J. L.; Díaz, E. (2009) Anaerobic Catabolism of Aromatic Compounds: a Genetic and Genomic View. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73: 71–133.
- Chadhain, S. M. N.; Norman, R. S.; Pesce, K.; Kukor, J. J.; Zylstra, G. J. (2006) Microbial dioxygenase gene population shifts during polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology* 72(6): 4078–4087.
- Coleman, N. V.; Bui, N. B.; Holmes, A. J. (2006) Soluble di-iron monooxygenase gene diversity in soils, sediments and ethene enrichments. *Environ. Microbiol.* 8(7): 1228–1239.
- Connan J. (1984) In: Brooks J, Welte DH Advances in petroleum geochemistry, vol 1. Academic, London, pp 299–335.
- Coschigano, P. W. (2000) Transcriptional analysis of the *tutE tutFDGH* gene cluster from *Thauera aromatica* strain T1. *Applied and Environmental Microbiology* 66(3): 1147–1151.
- da Rosa J. P.; Korenblum, E.; Franco-Cirigliano, M. N.; Abreu, F.; Lins, U.; et al. (2013) *Streptomyces lunalinharesii* strain 235 shows the potential to inhibit bacteria involved in biocorrosion processes. *BioMed Research International* p1.
- Degnan, P. H.; Ochman, H. (2012) Illumina-based analysis of microbial community diversity. *The ISME Journal* 6: 183–194.
- Díaz, E. (2004) Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int Microbiol* 7(3):173-180.
- Dinamarca, M. A.; Aranda-Olmedo, I.; Puyet, A.; Rojo, F. (2003) Expression of the *Pseudomonas putida* OCT plasmid alkane degradation pathway is modulated by two different global control signals: evidence from continuous cultures. *Journal of Bacteriology* 185(16): 4772–4778.
- DiRusso CC (1990) Primary sequence of the *Escherichia coli fadBA* operon, encoding the fatty acid-oxidizing multienzyme complex, indicates a high degree of homology to eucaryotic enzymes. *J Bacteriol* 172: 6459-6488.
- Fang, H.; Cai, L.; Yu, Y.; Zhang, T. (2013) Metagenomic analysis reveals the prevalence of biodegradation genes for organic pollutants in activated sludge. *Bioresour Technol.* 129: 209-218.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104(13): 5602-5607.
- Flocco, C. G.; Gomes, N. C. M.; Cormack, W. M.; Smalla, K (2009) Occurrence and diversity of naphthalene dioxygenase genes in soil microbial communities from the Maritime Antarctic. *Environmental Microbiology* 11(3): 700–714.

- Foght, J. M. (2010) Microbial communities in oil shales, biodegraded and heavy oil reservoirs, and bitumen deposits. In: Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Timmis K. N. (ed.). Berlin Heidelberg. Springer-Verlag, 2160-2172.
- Gibson, D. T.; Parales, R. E. (2000) Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 11: 236–243.
- Gilbert JA, Field D, Huang Y, Edwards R, Li W, et al. (2008) Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities. *PLoS One* 3: e3042.
- Giovannoni, S. J.; Britschgi, T. B.; Moyer, C. L.; Field, K. G. (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345: 60–63.
- Gralton, E. M.; Campbell, A. L.; Neidle E. L. (1997) Directed introduction of DNA cleavage sites to produce a high-resolution genetic and physical map of the *Acinetobacter* sp. strain ADP1 (BD413UE) chromosome. *Microbiology* 143: 1345–1357.
- Graus, W.; Roglieri, M.; Jaworski, P.; Alberio, L.; Worrell, E. (2011) The promise of carbon capture and storage: evaluating the capture-readiness of new EU fossil fuel power plants. *Climate Policy* 11(1): 789–812.
- Greene, A. C.; Patel, B. C.; Sheehy, A. J. (1997). *Deferribacter thermophilus* Gen. Nov., Sp. Nov., A Novel Thermophilic Manganese- and Iron-Reducing Bacterium Isolated From A Petroleum Reservoir . *International Journal of Systematic Bacteriology* 47(2): 505-509.
- Guo, C.; Sun, W.; Harsh, J. B.; Ogram, A. (1997) Hybridization Analysis of Microbial DNA from Fuel Oil-Contaminated and Noncontaminated Soil. *Microb. Ecol.* 34(3): 178-187.
- Handelsman, J.; Rondon, M. R.; Brady, S. F.; Clardy, J.; Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5: 245-249.
- Harayama, S.; Rekik, M.; Bairoch, A.; Neidle, E. L.; Ornston, I. N. (1991) Potential DNA slippage structures acquired during evolutionary divergence of *Acinetobacter calcoaceticus* chromosomal *benABC* and *Pseudomonas putida* TOL pWW0 plasmid *xyXYZ*, genes encoding benzoate dioxygenases. *J. Bacteriol.* 173(23): 7540-7548.
- Hardeman, F.; Sjöling, S. (2007) Metagenomic approach for the isolation of a novel low-temperature active lipase from uncultured bacteria of marine sediment. *FEMS Microbiology Ecology*. 59: 524-534.
- Hartnett, C.; Neidle, E. L.; Ngai, K. L.; Ornston, I. N. (1990) DNA sequences of genes encoding *Acinetobacter calcoaceticus* protocatechuate 3,4-dioxygenase: evidence indicating shuffling of genes and of DNA sequences within genes during their evolutionary divergence. *J. Bacteriol.* 172(2): 956-966.
- Head, I. M.; Jones, D. M.; Larter, S. R. (2003). Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature* 426: 344-352.

- Head, I.M., Jones, D.M., Larter, S.R. (2006) Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature* 4: 173-182.
- Heider, J.; Rabus, R. (2008) Genomic insights in the anaerobic biodegradation of organic pollutants. In: *Microbial biodegradation: genomics and molecular biology*. Diaz, E. (ed.). Norfolk, UK Caister academic press, p. 25-54.
- Heider, J.; Spormann, A. M.; Beller, H. R.; Widdel, F. (1999) Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 459-473.
- Heiss-Blanquet, S.; Benoit, Y.; Marechaux, C.; Monot, F. (2005) Assessing the role of alkane hydroxylase genotypes in environmental samples by competitive PCR. *Journal Applied Microbiology* 99: 1392–1403.
- Hermuth, K.; Leuthner, B.; Heider, J. (2002) Operon structure and expression of the genes for benzylsuccinate synthase in *Thauera aromatica* strain K172. *Arch. Microbiol.* 177: 132-138.
- Holliger, C.; Zehnder, A. J. (1996) Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7(3): 326-330.
- Hugenholtz, P.; Goebel, B. M.; Pace, N. R. (1998b). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180: 4765-4774.
- Hugenholtz, P.; Pitulle, C.; Hershberger, K. L.; Pace, N. R. (1998a) Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol.* 180: 366-76.
- Huson, D. H.; Auch, A. F.; Qi, J.; Schuster, S. C. (2007) MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Research* 17: 377-386.
- Irie, S.; Doi, S.; Yorifuji, T.; Takagi, M.; Yano, K. (1987) Nucleotide sequencing and characterization of the genes encoding benzene oxidation enzymes of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 169: 5174-5179.
- Ishige, T.; Tani, A.; Sakai, Y.; Kato, N. (2000) Long-chain aldehyde dehydrogenase that participates in *n*-Alkane utilization and wax ester synthesis in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *Applied and Environmental Microbiology* 66(8): 3481–3486.
- Ishikawa M, Mikami Y, Usukura J, Iwasaki H, Shinagawa H, et al. (1997) Reconstitution, morphology and crystallization of a fatty acid β -oxidation multienzyme complex from *Pseudomonas fragi*. *Biochem J* 328: 815-820.
- Joshi MN, Dhebar SV, Dhebar SV, Bhargava P, Pandit A, et al. (2014) Metagenomics of petroleum muck: revealing microbial diversity and depicting microbial syntrophy. *Arch Microbiol.* DOI 10.1007/s00203-014-0992-0.
- Kanaly, R. A.; Harayama, S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Biotechnology* 182(8): 2059-2067.
- Kato, T.; Miyanaga, A.; Kanaya, S.; Morikawa, M. (2009) Alkane inducible proteins in *Geobacillus thermoleovorans* B23. *BMC Microbiol.* 9: 60.

- Kleikemper, J.; Schroth, M. H.; Sigler, W. V.; Schmucki, M.; Bernasconi, S. M.; Zeyer, H. (2002). Activity and Diversity of Sulfate-Reducing Bacteria in a Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* 68(4): 1516–1523.
- Knaebel, D. B.; Crawford, R. L. (1995) Extraction and purification of microbial DNA from petroleum-contaminated soils and detection of low numbers of toluene, octane and pesticide degraders by multiplex polymerase chain reaction and Southern analysis. *Mol. Ecol.* 4(5): 579-591.
- Korenblum, E.; Souza, D. B.; Penna, M.; Seldin, L. (2012) Molecular analysis of the bacterial communities in crude oil samples from two brazilian offshore petroleum platforms. *Int. J. Microbiol.* 2012: 156537.
- Kuhn, E.; Bellicanta, G. S.; Pellizari, V. H. (2009) New alk genes detected in Antarctic marine sediments. *Environ. Microbiol.* 11: 669-673.
- Kuntze, K.; Shinoda, Y.; Moutakki, H.; McInerney, M. J.; Vogt, C.; Richnow, H. H.; Boll, M. (2008) 6-Oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-coenzyme A hydrolases from obligately anaerobic bacteria: characterization and identification of its gene as a functional marker for aromatic compounds degrading anaerobes. *Environmental Microbiology* 10(6): 1547-1556.
- Lamendella, R.; Strutt, S.; Borglin, S.; Chakraborty, R.; Tas, N.; Mason O. U.; Hultman, J.; Prestat, E.; Hazen, T. C.; Jansson, J. K. (2014) Assessment of the Deepwater Horizon oil spill impact on Gulf coast microbial communities. *Front Microbiol.* 5: 130.
- Laurie, A. D.; Lloyd-Jones, G. (2000) Quantification of phnAc and nahAc in contaminated New Zealand soils by competitive PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1814-1817.
- Lazarevic, V.; Whiteson, K.; Huse, S.; Hernandez, D.; Farinelli, L.; et al. (2009) Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *J. Microbiol. Methods.* 79: 266–271.
- Leuthner, B.; Leutwein, C.; Schulz, H.; Hörth, P.; Haehnel, W.; et al. (1998) Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol. Microbiol.* 28: 615-628.
- Li, D.; Midgley, D. J.; Ross, J. P.; Oytam, Y.; Abell, G. C.; Volk, H.; Daud, W. A.; Hendry, P. (2012) Microbial biodiversity in a Malaysian oil field and a systematic comparison with oil reservoirs worldwide. *Arch Microbiol* 194(6):513-23.
- Li, W. (2009). Analysis and comparison of very large metagenomes with fast clustering and functional annotation. *BMC Bioinformatics* 10: 359.
- Lu, Z.; Deng, Y.; Van Nostrand, J. D.; He, Z.; Voordeckers, J.; Zhou, A.; et al. (2011). Microbial gene functions enriched in the Deepwater Horizon deep-sea oil plume. *ISME J.* 6: 451–460.

- Magot, M. (2005) Indigenous microbial communities in oil fields. In: Ollivier B, Magot M (eds) *Petroleum microbiology*. ASM Press, Washington, pp 21–34
- Magot, M.; Ollivier, B.; Patel, B. K. C. (2000) Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie Van Leeuwenhoek* 77: 103–116.
- Malik, S.; Beer, M.; Megharaj, M.; Naidu, R. (2008) The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environ. Int.* 34(2): 265-76.
- Marchant, R.; Sharkey, F. H.; Banat, I. M.; Rahman, T. J.; Perfumo A. (2006) The degradation of n-hexadecane in soil by *thermophilic geobacilli*. *FEMS Microbiology Ecology* 56: 44–54.
- Markowitz, V. M.; Ivanova, N. N.; Szeto, E.; Palaniappan, K.; Chu, K.; et al. (2008) IMG/M: a data management and analysis system for metagenomes. *Nucleic Acids Research* D534-538.
- Mason, O. U.; Hazen, T. C.; Borglin, S.; Chain, P. S.; Dubinsky, E. A.; et al., (2012) Metagenome, metatranscriptome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deepwater Horizon oil spill. *ISME J.* 6(9):1715-1727.
- Meintanis, C.; Chalkou, K. I.; Kormas, K. A.; Karagouni, A. D. (2006) Biodegradation of crude oil by thermophilic bacteria isolated from a volcano island. *Biodegradation* 17: 3–9.
- Miqueletto, P. B.; Andreote, F. D.; Dias, A. C.; Ferreira, J. C.; Dos Santos Neto, E. V.; et al. (2011) Cultivation-independent methods applied to the microbial prospection of oil and gas in soil from a sedimentary basin in Brazil. *AMB Express* 1: 35.
- Mishra, V.; Rup, I.; Srinivasan (2001) Enzymes and operons mediating xenobiotic degradation in bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 27(2): 133-166.
- Nam, J. W.; Nojiri, H.; Yoshida, T.; Habe, H.; Yamane, H.; Omori, T. (2001) New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations. *Biosci Biotechnol Biochem.* 65(2): 254-263.
- Nojiri, H.; Shintani, M.; Omori, T. (2004) Divergence of mobile genetic elements involved in the distribution of xenobiotic-catabolic capacity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 154–174.
- Okerentungba, P. O.; Ezeronye, O. U. (2003). Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria. *Af. J. Biothec.* 2(9): 288-292.
- Oliveira, V. M.; Sette, L. D.; Simioni, K. C. M.; Dos Santos Neto, E. V.; et al. (2008) Bacterial diversity characterization in petroleum samples from brazilian reservoirs. *Braz. J. Microbiol.* 39(3): 445-452.
- Ollivier, B.; Magot, M. (2005) *Petroleum Microbiology*. Washington DC: ASM Press, p. 365.

- Onstott, T. C.; Phelps, T. J.; Colwell, F. S.; Ringelberg, D.; White, D. C.; et al. (1998) Observations pertaining to the origin and ecology of microorganisms recovered from deep subsurface Taylorsville Basin, Virginia. *Geomicrobiol. J.* 15: 353–385.
- Orphan, V. J.; Taylor, L. T.; Hafenbradl, D.; Delong, E. F. (2000) Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Applied Environmental Microbiology* 66: 700–711.
- Paisse, S.; Duran, R.; Coulon, F.; Goñi-Urriza, M. (2011) Are alkane hydroxylase genes (alkB) relevant to assess petroleum bioremediation processes in chronically polluted coastal sediments? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* DOI 10.1007/s00253-011-3381-5.
- Panicker, G.; Mojib, N.; Aislabie, J.; Bej, A. K. (2010) Detection, expression and quantitation of the biodegradative genes in Antarctic microorganisms using PCR. *Antonie Van Leeuwenhoek* 97(3): 275-87.
- Pawar S, Schulz H (1981) The structure of the multienzyme complex of fatty acid oxidation from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 256: 3894-3899.
- Qin, J.; Li, R.; Raes, J.; Arumugam, M.; Burgdorf, K. S.; et al. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59–65.
- Radwan, S. S.; Barabás, G.; Sorkhoh, N. A., Damjanovich, S.; Szabó, I.; et al. (1998) Hydrocarbon uptake by *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* 169(1): 87-94.
- Ratajczak, A.; Geißdörfer, W.; Hillen, W. (1998) Expression of alkane hydroxylase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 is induced by a broad range of *n*-Alkanes and requires the transcriptional activator AlkR. *Journal of Bacteriology* 180(22): 5822–5827.
- Rhee S. –K.; Liu, X.; Wu L.; Chong, S. C.; Wan, X.; Zhou J. (2004) Detection of Genes Involved in Biodegradation and Biotransformation in Microbial Communities by Using 50-Mer Oligonucleotide Microarrays. *Applied and Environmental Microbiology* 70(7): 4303–4317.
- Rodriguez-Brito, B.; Rohwer, F.; Edwards, R. A. (2006) An application of statistics to comparative metagenomics. *BMC Bioinformatics* 7:162.
- Rojo, F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology* 11: 2477-2490.
- Röling, W. F. M.; Head, I. M.; Larter, S. R. (2003) The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. *Research in Microbiology* 154: 321-328.
- Santos, P. M.; Sá-Correia, I. (2007) Characterization of the unique organization and co-regulation of a gene cluster required for phenol and benzene catabolism in *Pseudomonas* sp. M1. *J. Biotechnol.* 131: 371-378.
- Schloss P. D.; Handelsman, J. (2008) A statistical toolbox for metagenomics: assessing functional diversity in microbial communities. *BMC Bioinformatics* 9:34.

- Seshadri, R.; Kravitz, S. A.; Smarr, L.; Gilna, P.; Frazier, M. (2007) CAMERA: A Community Resource for Metagenomics. *PLoS Biology* 5: e75.
- Sette, L. D.; Simioni, K. C. M.; Vasconcellos, S. P.; Dussan, L. J.; Neto, E. V.; Oliveira, V. M. (2007). Analysis of composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Antoine van Leewenhoek* 91: 253-266.
- Silva CC, Hayden H, Sawbridge T, Mele P, Kruger RH, et al. (2012) Phylogenetic and functional diversity of metagenomic libraries of phenol degrading sludge from petroleum refinery wastewater treatment system. *AMB Express* 2(1): 18.
- Silva, T. R.; Verde, L. C. L.; Santos Neto, E. V.; Oliveira, V. M. (2013) Diversity analyses of microbial communities in petroleum samples from Brazilian oil fields. *Int. Biodeter. Biodeg.* 81: 57–70.
- Smits, T. H.; Röthlisberger, M.; Witholt, B.; van Beilen, J. B. (1999) Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains. *Environ. Microbiol.* 1: 307-317.
- Sotsky, J. B.; Greer, C. W.; Atlas, R. M. (1994) Frequency of genes in aromatic and aliphatic hydrocarbon biodegradation pathways within bacterial populations from Alaskan sediments. *Can. J. Microbiol.* 40(11): 981-985.
- Springael, D.; Top, E. M. (2004) Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. *Trends Microbiol.* 12(2): 53-58.
- Staats, M.; Braster, M.; Röling, W. F. (2011) Molecular diversity and distribution of aromatic hydrocarbon-degrading anaerobes across a landfill leachate plume. *Environmental Microbiology* 13(5): 1216-27.
- Staijen, I. E.; Marcionelli, R.; Witholt, B. (1999) The *PalkBFGHJKL* promoter is under carbon catabolite repression control in *Pseudomonas oleovorans* but not in *Escherichia coli alk+* recombinants. *Journal of Bacteriology* 181(5): 1610–1616.
- Stapleton, R. D.; Saylor, G. S. (1998) Assessment of the Microbiological Potential for the Natural Attenuation of Petroleum Hydrocarbons in a Shallow Aquifer System. *Microb. Ecol.* 36(3): 349-361.
- Takai, K.; Inoue, A.; Horikoshi, K. (2002). Methanothermococcus okinawensis sp. nov., a thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a Western Pacific deep-sea hydrothermal vent system. *Internat. J. System. Evol. Microbiol.* 52: 1089–1095.
- Táncsics, A.; Szabó, I.; Baka, E.; Szoboszlay, S.; et al. (2010) Investigation of catechol 2,3-dioxygenase and 16S rRNA gene diversity in hypoxic, petroleum hydrocarbon contaminated groundwater. *Systematic and Applied Microbiology* 33: 398-406.
- Throne-Host, M.; Markussen, S.; Winnberg, A.; Ellingsen, T. E.; Kotlar, H. K.; Zotchev, S. B. (2006) Utilization of n- alkanes by a newly isolated strain of *Acinetobacter*

- venetianus*: the role of two AlkB-type alkane hydroxylases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72: 353–360.
- Turova, T. P.; Nazina, T. N.; Mikhaĭlova, E. M.; Rodionova, T. A.; Ekimov, A. N.; et al. (2008) AlkB homologues in thermophilic bacteria of the genus *Geobacillus*. *Mol. Biol. (Mosk)* 42: 247-257.
- Urich, T.; Lanzen, A.; Qi, J.; Huson, D. H.; Schleper, C.; et al. (2008) Simultaneous Assessment of Soil Microbial Community Structure and Function through Analysis of the Meta-Transcriptome. *PLoS One* 3.
- van Beilen, J. B.; Duetz, W. A.; Schmid, A.; Witholt, B. (2003) Practical issues in the application of oxygenases. *Trends Biotechnol.* 21(4): 170-177.
- van Beilen, J. B.; Funhoff, E. G. (2005) Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16(3): 308-314.
- van Beilen, J. B.; Funhoff, E. G. (2007) Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74:13–21.
- van Beilen, J. B.; Li, Z.; Duetz, W. A.; Smits, T. H. M.; Witholt, B. (2003) Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil and Gas Science and Technology* 58: 427–440.
- van Beilen, J. B.; Panke, S; Lucchini, S.; Franchini, A. G.; thlisberger, M. R.; Witholt, B. (2001) Analysis of *Pseudomonas putida* alkanedegradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the *alk* genes. *Microbiology* 147: 1621–1630.
- van Beilen, J. B.; Smits, T. H.; Whyte, I. G.; Schorcht, S.; Rothlisberger, M.; et al. (2002) Alkane hydroxylase homologues in Gram-positive strains. *Env. Microbiol.* 4(11): 676-682.
- van Hamme, J. D.; Singh, A.; Ward, O. P. (2003) Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 503-549.
- Vasconcellos, S. P.; Crespim, E.; Cruz, G. F.; Senatore, D. B.; Simioni, K. C. M.; dos Santos Neto, E. V.; Marsaioli, A. J.; Oliveira, V. M. (2009) Isolation, biodegradation ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. *Organic Geochemistry* 40: 574–588.
- Verde, L. C. L.; Silva, T. R.; Dellagnezze, B. M.; Dos Santos Neto, E. V.; Oliveira, V. M. (2013) Diversity of Hydrocarbon-Related Catabolic Genes in Oil Samples from Potiguar Basin (RN, Brazil) *J Pet Environ Biotechnol* 4: 2.
- Voordouw, G.; Armstrong, S. M.; Reimer, M. F.; Fouts, B.; Telang, A. J.; Shen, Y.; Gevertz, D. (1996) Characterization of 16S rRNA genes from oil field microbial communities indicates the presence of a variety of Sulfate-Reducing, Fermentative, and Sulfide-Oxidizing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1623-1629.

- Watkinson, R. J.; Morgan, P. (1990) Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation* 1(2-3): 79-92.
- Wentzel, A.; Ellingsen, T. E.; Kotlar, H. K.; Zotchev, S. B.; Throne-Holst, M. (2007) Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76: 1209–1221.
- White, N.; Thompson, M.; Barwise, T. (2003). Understanding the thermal evolution of deep-water continental margins. *Nature* 426: 334-343.
- Whyte, L. G.; Smits, T. H.; Labbé, D.; Witholt, B.; Greer, C. W.; van Beilen, J. B. (2002) Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(12): 5933-5942.
- Widdel, F.; Musat, F. (2010) Diversity and common principles in enzymatic activation of hydrocarbons. In Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Timmis, K.N. (ed). Berlin: Springer Verlag. p. 983-1009.
- Wöhlbrand, L.; Kallerhoff, B.; Lange, D.; Hufnagel, P.; Thiermann, J.; et al. (2007) Functional proteomic view of metabolic regulation in “*Aromatoleum aromaticum*” strain EbN1. *Proteomics* 7: 2222-2239.
- Yergeau, E.; Arbour, M.; Brousseau, R.; Juck D.; Lawrence, J. R.; Masson, L.; Whyte, L. G.; Greer, C. W. (2009) Microarray and Real-Time PCR Analyses of the Responses of High-Arctic Soil Bacteria to Hydrocarbon Pollution and Bioremediation Treatments *Applied and Environmental Microbiology* 75(19): 6258–6267.
- Yergeau, E.; Sanschagrín, S.; Beaumier, D.; Greer, C. W. (2012) Metagenomic Analysis of the Bioremediation of Diesel-Contaminated Canadian High Arctic Soils. *PLoS ONE* 7(1): e30058.
- Yoshida, N.; Yagi, K.; Sato, D.; Watanabe, N.; Kuroishi, T.; et al. (2005) Bacterial communities in petroleum oil in stockpiles. *J. Biosci. Bioeng.* 99: 143–149.
- Youssef, N.; Elshahed, M. S.; McInerney, M. J. (2009) Microbial processes in oil fields: Culprits, problems and opportunities. In *Advances in Applied Microbiology*; Laskin, A. I., Sariaslani, S., Gadd, G. M., Eds.; Academic Press: Burlington, MA; Vol. 66, pp 141–251.

ANEXO 1

Artigo publicado em co-autoria



Diversity analyses of microbial communities in petroleum samples from Brazilian oil fields



T.R. Silva^a, L.C.L. Verde^a, E.V. Santos Neto^b, V.M. Oliveira^{a,*}

^a Research Center for Chemistry, Biology and Agriculture (CPQBA), Campinas University, UNICAMP, CP 6171, CEP 13081-970, Campinas, SP, Brazil

^b Petrobras R&D Center, Cidade Universitária, Quadra 7, Rio de Janeiro, RJ, CEP 21949-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 October 2011

Received in revised form

1 April 2012

Accepted 10 May 2012

Available online 17 June 2012

Keywords:

Petroleum microbiology

rRNA 16S

Microbial diversity

Oil degradation

ABSTRACT

Recent studies of oil fields have shown that the microbial diversity is represented by bacteria and archaea of wide distribution, and that many of these organisms have potential to metabolize organic and inorganic compounds. Biodegradation processes in oil industry are of great relevance, since it may be related with the loss of petroleum quality and can bring problems during production. The aim of this study was to compare the microbial communities present in biodegraded (GMR75) and non-biodegraded (PIS1) terrestrial oils from the Potiguar Basin (RN, Brazil) by using cultivation (microbial enrichments and isolation) and molecular approaches (16S rRNA gene libraries). The cultivated microorganisms recovered were affiliated with the phyla Actinobacteria, Firmicutes and Proteobacteria. Both bacterial 16S rRNA gene libraries revealed a great diversity, encompassing representatives from 8 different phyla (Actinobacteria, Bacteroidetes, Deferribacteres, Spirochaetes, Firmicutes, Proteobacteria, Thermotogae and Synergistetes) for the GMR75 sample, and from 5 different phyla (Actinobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Proteobacteria and Thermotoga) for the PIS1 sample. The archaeal 16S rRNA gene library was obtained only for GMR75 oil and all phylotypes were affiliated with the family Methanomicrobiaceae. Diversity results suggest that methanogenesis is the dominant terminal process for hydrocarbon degradation in GMR oil field, driven by anaerobic biodegradation.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The ecosystem present in deep terrestrial subsurface appears to be more physiologically and phylogenetically complex than thought before (Amend and Teske, 2005). It is characterized by extreme conditions like high pressure, temperature and salinity, in addition to anoxia. The presence of microorganisms in deep environments is already known and encompasses mesophilic and thermophilic bacteria and archaea of wide distribution, and many of these organisms have potential to metabolize organic and inorganic compounds (Magot et al., 2000)

Many studies are now focusing on deep environments, since the microorganisms inhabiting such niches are supposed to be adapted to harsh conditions and thus harbor enzymatic machineries that might be of great interest for scientific and industrial applications. Petroleum reservoirs and the process of hydrocarbon degradation have attracted great attention of researchers working in the field of

extreme environments and petroleum microbiology (van Hamme et al., 2003).

During the biodegradation process, the hydrocarbon content is transformed, with a consequent increase in oil density, sulfur content, acidity and viscosity. All these factors interfere in the subsequent extraction and refining operations, resulting in significant economic impact for the oil industry (Connan, 1984).

The biodegradation process in shallow subsurface petroleum reservoir has been attributed to aerobic bacterial hydrocarbon degradation stimulated by surface recharge of oxygen-bearing meteoric waters. This hypothesis is empirically supported by the likelihood of encountering biodegraded oils at higher levels of degradation in reservoirs near the surface (Jones et al., 2008). However, low concentration of organic and mineral compounds would be enough to deplete oxygen from an aquifer suggesting that biodegradation in subsurface sedimentary environments may be carried by anaerobic metabolism (Head et al., 2003). Several culture-independent studies developed in the last decade have corroborated the hypothesis of anaerobic metabolism, revealing the large diversity of anaerobic microorganisms in oil fields (Magot et al., 2000; Orphan et al., 2000; Grabowski et al., 2005; Li

* Corresponding author. Tel.: +55 19 2139 2874; fax: +55 19 2139 2852.
E-mail address: vmaia@cpqba.unicamp.br (V.M. Oliveira).

et al., 2007a,b; Dahle et al., 2008) and a possible anaerobic biodegradation mechanism has been proposed by Aitken et al. (2004).

The aim of the present study was to investigate the diversity and composition of microbial communities present in two oil samples from terrestrial fields of the Potiguar Basin (RN, Brazil), using cultivation (microbial enrichments and isolation) and molecular approaches (16S rRNA gene clone libraries), and thus contribute to the knowledge of the biodegradation processes that occur in Brazilian petroleum reservoirs.

2. Materials and methods

2.1. Sampling and geological settings

Oil samples (naturally mixed with formation water) were collected in July 2008 from two production wells, named GMR75 and PTS1, at the onshore Potiguar Basin (Northeast, Brazil), with logistic support from CENPES/Petrobras. Samples were collected at the wellhead after purge of the production lines in order to avoid any kind of contamination and kept in dark bottles with Teflon caps. Samples were shipped to the lab and stored in the dark and at ambient temperature for further analyses (carried out in the subsequent 2–3 weeks). In both cases BSW is variable during the production in both wells, although always high (80–90% of the production in both wells is water).

The oil sample GMR75 was classified as moderately biodegraded and produced from a reservoir with an *in situ* temperature of

42.2 °C at a depth of 535.5–540.5 m. The loss of hydrocarbons in natural reservoirs as a result of biodegradation is highly variable in the Potiguar Basin; however, a recent study suggested that the GMR oil has already lost more than 50% of its light hydrocarbons (Behar et al., 2006). The PTS1 sample was classified as non-biodegraded and collected from a reservoir with an *in situ* temperature of 48.3 °C at a depth of 801–803 m (Fig. 1). Both oils were collected in the same basin, but they are related to different petroleum systems, so different source rocks and reservoirs. Oils of the GMR75 type correlate with marine-evaporitic source rocks and are biodegraded in different levels because they have been trapped in relatively shallow reservoirs with fresh water. Oils of the PTS1 were generated by lacustrine source rocks. When accumulated in sandstones of the same lacustrine sequence, as is the case, they are non-biodegraded. Such reservoirs are deeper and hotter, and have highly saline waters (Santos Neto and Hayes, 1999).

The Potiguar Basin is located in the Brazilian equatorial margin, covering an area of about 120,000 km², with 28% classified as onshore and the remaining part as offshore up to the water depth of 3000 m (Souto Filho et al., 2000).

2.2. Aerobic microbial enrichments and isolation

Crude oil/formation water samples (10% of the medium volume, v/v) were inoculated in the following culture media: nutrient broth (NB, Difco), trypticase soy broth (TSB, Difco), marine broth (MB, Difco), and mineral salt medium Bushnell Haas broth (BHM, Difco). All enrichment cultures were incubated at 42 °C in a rotary shaker

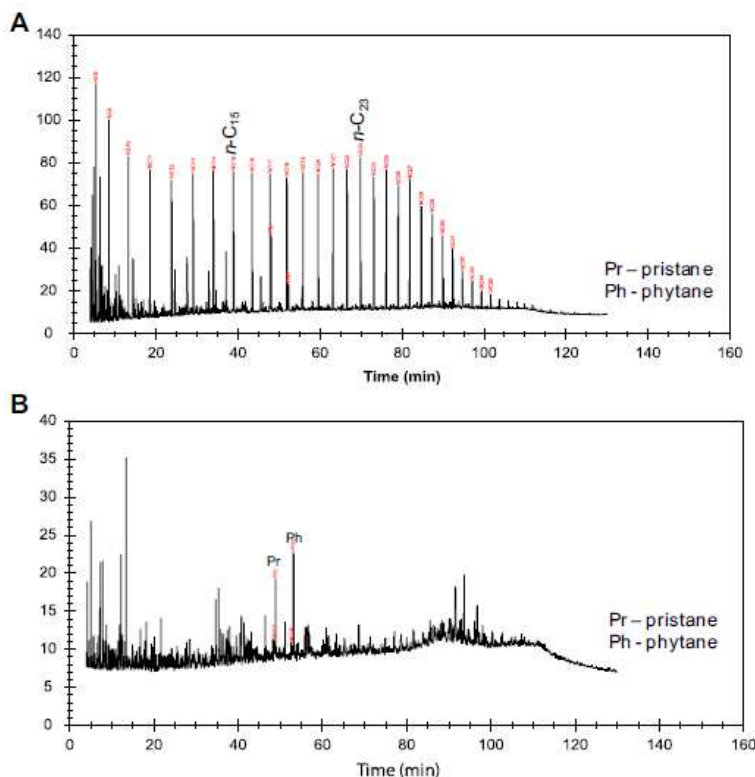


Fig. 1. Whole oil chromatogram of the oil samples PTS1 (A) and GMR75 (B).

at 150 rpm over 7 days. Aliquots (100 μ l) of each microbial enrichment from crude oils were taken and plated over the surface of the same medium used for enrichment, cited above, supplemented with 2% agar. Plates were inoculated in duplicate and incubated at 42 °C, under aerobic conditions, up to 7 days. Colony growth was monitored every 2 days. Isolates obtained were further streaked onto the surface of fresh plates (same medium used for enrichment supplemented with 2% agar) and checked for purity prior to subsequent molecular analyses.

2.3. DNA extraction

Genomic DNA from the pure cultures was obtained according to the protocol described by Pitcher et al. (1989). DNA extraction from oil/formation water samples was carried out using the PowerSoil™ DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories), QIAmp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) and FastDNA SPIN Kit for Soil (Q Biogene), according to the manufacturer's instructions. In the case of the PowerSoil™ DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories), five tubes from the kit were used to start with the DNA extraction. At the end of the procedure, DNA samples obtained from the five tubes were pooled and used for subsequent PCR amplification. Crude oil/formation water samples were not filtered or centrifuged before DNA extraction. The yield and integrity of the environmental DNA obtained were confirmed through electrophoresis in 1% agarose gel.

2.4. PCR amplification

Two bacterial 16S rRNA gene libraries were constructed, one for each of the oil samples GMR75 and PTS1. The 16S rRNA gene library for the archaeal domain was constructed only for the GMR75 sample. PCR amplification was performed from total community DNA isolated from oil samples by using the bacterial primer set 10f and 1100r and the archaeal primers ARCH46f and ARCH915r (Table 1). Twenty-five microliter reaction mixtures contained 5 μ l of total DNA, 2 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 0.2 mM dNTP mix (GE Healthcare), 0.4 μ M of each primer, 1 \times *Taq* buffer and 1.5 mM MgCl₂. The bacterial PCR amplifications were done using an initial denaturation step at 95 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C and 3 min at 72 °C and a final extension step at 72 °C for 3 min using an Eppendorf thermal cycler. Nine replicate PCR reactions were done for the GMR75 sample and 6 replicates were done for the PTS1 sample. The corresponding PCR replicates were then pooled and concentrated in a speed vacuum concentrator 5301 Eppendorf, A-2-VC rotor. Archaeal PCR amplifications were done using an initial denaturation step at 94 °C for 90 s, 9 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 65 °C, decreasing 0.5 °C each cycle, and 90 s at 72 °C, followed by another 25 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 60 °C and 90 s at 72 °C, and a final extension for 10 min at 72 °C in an Eppendorf thermal cycler. A second PCR reaction was performed using 1 μ l of the first archaeal PCR products as template and the same primers and conditions specified for the first PCR reaction.

Table 1
List of 16S rRNA primers used in this study.

Primers	Sequences 5'–3'	Reference
10f	GAG TTT GAT CCT GGC TCA G	Lane (1991)
1100r	AGG GTT GCG CTC GTT G	Lane (1991)
ARCH 46f	YTAAGCCATGCRAGT	Kudo et al. (1997)
ARCH 915r	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	Stahl and Amann (1991)

2.5. Assembly of 16S rRNA gene libraries

PCR replicates of each target gene were pooled, purified using GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare), according to the manufacturer's protocol, and concentrated in a speed vacuum concentrator 5301 Eppendorf, A-2-VC rotor. The purified PCR product (~200 ng) was cloned into a pGEM-T Easy Vector (Promega), according to the manufacturer's instructions, and transformed into *Escherichia coli* JM109 competent cells. Approximately 200 positive clones were selected from each library for subsequent sequencing. The 16S rDNA inserts were amplified from plasmid DNA of selected clones using the universal M13 forward (5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3') and reverse (5'-TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC-3') primers. PCR was performed in a 50- μ l reaction volume, containing 1–2 μ l of an overnight clone culture, 0.4 μ M of each primer, 0.2 mM dNTP mix, 2 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 1 \times *Taq* buffer, and 1.5 mM MgCl₂. The amplification program consisted of an initial denaturation step at 94 °C for 3 min, followed by 30 cycles of 94 °C/20 s, 60 °C/20 s, and 72 °C/90 s. PCR products were purified as previously described for automated sequencing in the MegaBace DNA Analysis System 500 (GE Healthcare). The sequencing was carried out using 10f and 1100r primers for bacterial 16S rRNA, and ARCH46f and ARCH 915r for archaeal 16S rRNA.

2.6. Identification of bacterial isolates

After bacterial growth on agar plates, genomic DNA of pure cultures was isolated using the protocol described by Pitcher et al. (1989). PCR amplification, sequencing and phylogenetic analyses of partial 16S rDNA fragments were carried out as described by Rodrigues et al. (2005), except for the tree reconstruction, which was performed by using the MEGA software v. 4.0 (Tamura et al., 2007). The evolutionary distances were derived from the sequence-pair dissimilarities, calculated as implemented in MEGA using the DNA substitution model reported by Kimura (1980) and the phylogenetic reconstruction was done using the neighbor-joining (NJ) algorithm (Saitou and Nei, 1987), with bootstrap values calculated from 1000 replicate runs.

2.7. Phylogenetic analyses of clone sequences

Partial 16S rRNA sequences obtained from clones were assembled in a contig using the phred/Phrap/CONSED program (Ewing et al., 1998). Identification was achieved by comparing the contiguous 16S rRNA sequences obtained with 16S rRNA sequence data from reference type strains, as well as environmental clones available in the public databases GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and RDP (Ribosomal Database Project – Release 10; <http://rdp.cme.msu.edu/>) using the BLASTn and Classifier routines, respectively. The sequences were aligned using the CLUSTAL X program (Thompson et al., 1997) and analyzed with MEGA software v.4 (Tamura et al., 2007), as described previously.

2.8. Statistical analyses

Diversity index calculations (α -diversity measures) were performed individually for both 16S rRNA gene libraries with the program DOTUR v 1.3 (Schloss & Handelsman, 2005). Bacterial and archaeal 16S rRNA sequences were assigned to OTUs and rarefaction curves were calculated using 4 distance levels among sequences (3, 5, 10 and 20%). In addition, the Shannon (H') diversity index, Simpson index (Magurran, 2004), and the nonparametric richness estimators ACE (abundance-based coverage estimator) (Chao et al., 1993) and Chao1 (Chao, 1984) were calculated for each

community. Chao1 richness estimates were based on singletons and doubletons as described by Chao (1984), and ACE was based on the distribution of abundant (>10) and rare (≤10) species.

Statistical comparisons of coverage of bacterial 16S rRNA libraries from the two oil samples were performed using the LIBSHUFF computer program (Singleton et al., 2001), which used the formula of Good (1953) to generate homologous and heterologous coverage curves from the clone libraries. Sequences were randomly shuffled 999 times between samples prior to the distance between the curves being calculated using the Cramér-von Mises statistical test (Pettitt, 1982). The DNADIST program of PHYLIP (Felsenstein, 1989), using the Kimura's model (Kimura, 1980) for nucleotide substitution, was employed to generate the distance matrix analyzed by LIBSHUFF.

2.9. Nucleotide sequence accession numbers

The 16S rDNA partial sequences determined in this study for the environmental clones were deposited at the GenBank database under the accession numbers JN613845–JN613951.

3. Results

3.1. Isolation and identification of aerobic bacteria

Twenty-three strains of aerobic organotrophic bacteria were isolated from the moderately biodegraded (GMR75) and non-biodegraded (PTS1) oil samples. The strains were firstly differentiated by macroscopic (color, form and colony size) and microscopic (cell morphology and Gram-staining) characteristics (data not shown). They were further identified via molecular taxonomy, based on partial sequencing and phylogenetic analysis of 16S rRNA genes. Among the isolates obtained, six were isolated from the PTS1 oil sample and included three identified as *Curtobacterium* sp., one as *Janibacter* sp., one as *Brevundimonas* sp. and one as *Brachymonas* sp. (Fig. 2). Seventeen strains were isolated from the GMR75 oil sample and were affiliated to the genera *Curtobacterium*, *Georgenia*, *Kocuria*, *Saccharopolyspora*, *Tessaracoccus*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Roseomonas*, *Petrobacter* and *Pseudomonas* (Fig. 2). Isolates were in general highly similar (>98% 16S rRNA sequence similarity) to known cultivated species. TSB medium recovered most of the isolates: GMR4, GMR 16, GMR 15, GMR 6, GMR17, GMR21, PTS 8, PTS 3, PTS 7 and PTS4. MB medium recovered the isolates GMR 14, GMR13, GMR12, PTS6 and PTS5. NB medium recovered GMR8 and GMR9, and finally BHM recovered the isolate GMR19.

3.2. 16S rRNA gene libraries

The bacterial community composition of the biodegraded (GMR75) and non-biodegraded (PTS1) oil samples was determined by analysis of 16S rRNA gene libraries. The DNA template used for PCR reactions and subsequent construction of 16S rRNA gene libraries was a mixture of DNA samples obtained from crude oil by using the three different DNA extraction protocols described earlier. A total of 271 partial sequences obtained from both libraries (130 from GMR75 and 141 from PTS1), each consisting of 700 nucleotides in average, presented good quality for subsequent analyses. These 16S rRNA sequences were compared with sequences from reference and type strains, as well as environmental clones, available at the GenBank and RDP databases.

Eight major bacterial taxa were identified in GMR75 oil sample (Fig. 3). Proteobacteria (31.5%) was the most abundant phylum distributed among the groups Alphaproteobacteria (2.3%), Betaproteobacteria (7.7%), Gammaproteobacteria (15.4%) and

Deltaproteobacteria (6.2%). The second most abundant phylum was Firmicutes, which represented 25.4% of the bacterial library and was represented by the classes Bacilli (21.6%) and Clostridia (3.8%). The third representative group was the phylum Deferribacteres (19.2%), which included the genera *Calditerrivibrio* (6.9%) and uncultured *Deferribacteres* (12.3%). A smaller proportion of bacterial phylotypes belonged to the phyla Actinobacteria (10.0%), Spirochaetes (7.7%), Synergistetes (3.1%), Bacteroidetes (1.5%) and Thermotogae (1.5%).

In the PTS1 oil sample, five major bacterial taxa were identified (Fig. 4). Firmicutes (56.0%) was the most abundant phylum, being the genus *Geobacillus* the most abundant one, accounting for 29.1% of all bacterial clones. The second most abundant was the phylum Proteobacteria (18.4%), which included Alphaproteobacteria (5.7%), Betaproteobacteria (7.1%) and Gammaproteobacteria (5.7%). Thermotoga was the third major group in the PTS1 sample, accounting for 12.8% of all bacterial clones and represented only by the genus *Petrotoga*. The remaining sequences were less numerous, being related with Actinobacteria (11.3%) and Chloroflexi (0.7%). One sequence (0.7%) could not be affiliated to any known taxa.

The assembly of the archaeal clone library was successful only for the GMR75 oil sample. In this case, 100% of sequenced clones were affiliated with members of the family Methanomicrobiaceae. The closest species that matched with the clone sequences were *Methanofollis liminatans* and *Methanofollis tationis*.

The detailed analysis of the genera and their abundance found in the samples revealed an astonishing diversity occurring in the reservoir environment. A total of 44 genera belonging to 9 different phyla were detected in the oil samples, considering both bacterial 16S rRNA gene libraries, besides 9 taxonomic groups that could not be identified at the genus or even phylum level (Table 2). Although the number of genera was similar between the libraries, their composition and abundance differed, suggesting huge discrepancies between the microbial communities from oils GMR75 and PTS1. Nonetheless, only a few genera were significantly abundant in each one of the libraries.

Phylogenetic analysis permitted the identification of many bacterial members from both libraries at the species level (Figs. 5–7). *Leuconostoc*-related clones were abundant in both GMR75 and PTS1 libraries, showing high levels of sequence similarity (Fig. 5; Table 2). Eleven clones from GMR75 sample were related to *Leuconostoc citreum* and *Leuconostoc argentinum*, showing 98% sequence similarity, and 22 clones were closely related to *Leuconostoc lactis* in the PTS1 sample (Fig. 5). The most abundant clones in this oil were identified as *Geobacillus thermoglucosidarius*, with 97–99% sequence similarity (Fig. 5). Representatives of the genus *Petrotoga* were also abundant in the PTS1 oil, but not in the GMR75 sample. These clones were recovered in a cluster, supported by a highbootstrap value (100%), with the type strain of the species *Petrotoga olearia* (98–99% sequence similarity) (Fig. 6).

Sixteen clones were highly related (98–99% sequence similarity) to an uncultured *Deferribacteres* in the GMR75 oil sample, however, they could not be identified at the species level and probably represent a new species (Fig. 6). *Acinetobacter*-related clones were also significantly abundant in the GMR75 oil and all of them were identified as *Acinetobacter johnsonii*, showing 99–100% sequence similarity with this species, except for one clone identified as *Acinetobacter calcoaceticus* (Fig. 7). On the other hand, only one clone identified as *Acinetobacter* sp. was detected in the PTS1 oil sample.

3.3. Diversity analyses

DOTUR analyses of the 16S rDNA bacterial sequences from GMR75 and PTS1 samples allowed the definition of 63 OTUs for

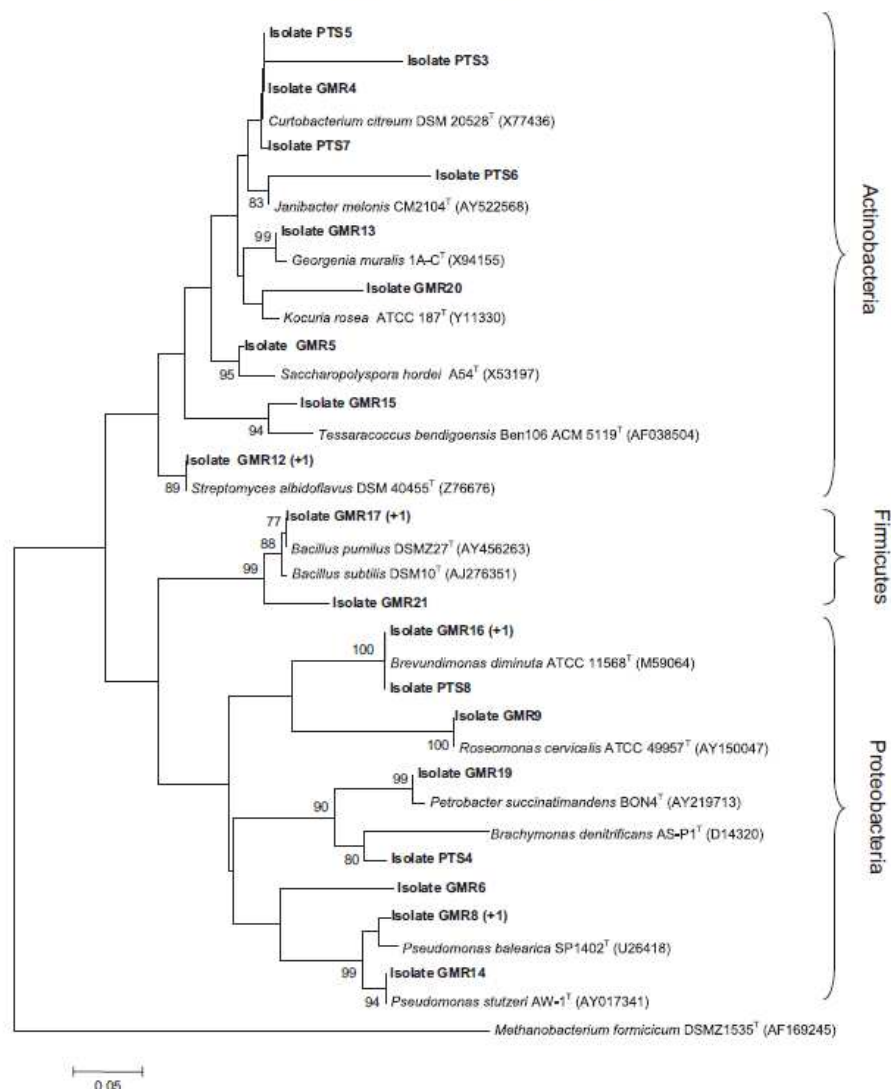


Fig. 2 Phylogenetic analysis based on partial 16S rRNA sequences from bacterial isolates obtained from oil enrichments and related species. Bootstrap values (1000 replicate runs shown as %) greater than 70% are listed. GenBank accession numbers are listed after species names. *Methanobacterium formicicum* was used as outgroup.

GMR75, including 40 singletons and 10 doubletons; and 47 OTUs for PTS1, including 27 singletons and 8 doubletons. Nonparametric richness estimators, such as ACE (abundance-based coverage estimators) and Chao1, were described to estimate total phylotype richness from the frequency of phylotypes in a clone library (Hughes et al., 2001). These indices were used in this study to estimate the total number of OTUs in bacterial communities of the sludge samples. In both libraries, the estimated number of phylotypes at the species level was higher than the observed numbers (Table 3). These data indicated that the diversity that was observed in both libraries at the species level is an underestimate of the total bacterial diversity present in the environment and further sampling would yield an increased observed diversity.

The calculation of Shannon diversity index showed very similar diversity values for both oil libraries, being slightly higher for the

GMR75 sample (Table 3). Magurran (2004) described that Shannon index value obtained from empirical data generally falls between 1.5 and 3.5 and rarely exceeds 4. In that sense, the Shannon diversity indices of GMR75 and PTS1 libraries were considered high (distance = 0.03).

The computer program LIBSHUFF was used to compare the genetic coverage obtained in the GMR75 and PTS1 16S rRNA libraries. Two gene libraries are assumed to be different if their homologous and heterologous coverage curves differ significantly (Singleton et al., 2001). These analyses showed statistically significant differences between the genetic coverage obtained in libraries GMR75 and PTS1, with low *P* values for both analyses (*P* = 0.001) (Fig. 8a and b).

More information on these differences was obtained by examination of the distribution of $(C_x - C_{xy})^2$ with *D*, which revealed that

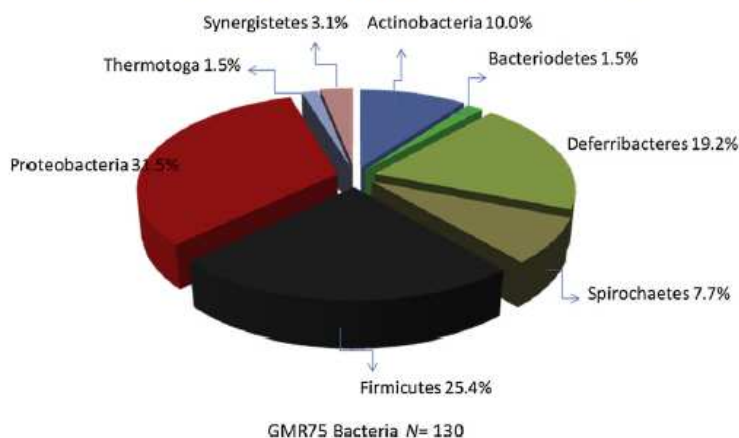


Fig. 3. Relative abundance of bacterial phyla detected in GMR75 16S rRNA clone library.

the values calculated for the real data exceeded the values calculated by using randomized data (at a P value of 0.05) at taxonomic distances lower than 0.23. These results showed that the GMR75 and PTS1 libraries differed greatly at the level of closely related sequences, but shared most deep taxa. Homologous coverage curves indicated that the GMR75 library had high coverage estimates at taxonomic distances correspondent to deeply branched taxa, such as phylum ($D \geq 0.20$). The PTS1 library, on the other hand, had high coverage estimates at $D \geq 0.13$, suggesting that higher taxa such as orders and classes have been fully sampled in the library. However, when $D \leq 0.03$ (species level), it is clear that an additional sampling effort is needed to fully cover the diversity of both samples, GMR75 and PTS1, i.e., if a larger amount of clones were sequenced, new operational taxonomic units (UTO's) or "species" would still be found.

4. Discussion

The analysis of the microbial composition by using 16S rRNA gene libraries allowed the comparison between the dominant

populations, at both high and low taxonomic ranks, from a biodegraded and a non-biodegraded oil sample from the Potiguar Basin (Brazil).

4.1. Bacterial diversity

Proteobacteria was the most abundant phylum in the GMR75 oil sample, and the second most abundant in the PTS1 oil. The classes Alpha, Beta, Gamma and Deltaproteobacteria were detected in this study, the latter being found only in the biodegraded oil sample GMR75. Five genera, *Thauera*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* and *Rahnella* were common to both samples. *Thauera*, a denitrifying facultative anaerobe, oxidizes toluene in benzoyl-CoA, which is a main intermediate component of the anaerobic catabolism of aromatic compounds (Leuthner and Heider, 1999). *Pseudomonas* and *Acinetobacter* are often aerobic organisms and have been well known for oil degrading capacity (Bachoon et al., 2001; van Beilen et al., 1994; Bach et al., 2003). The genus *Rahnella* was detected recently in petroleum enrichment cultures (Vasconcelos et al., 2010).

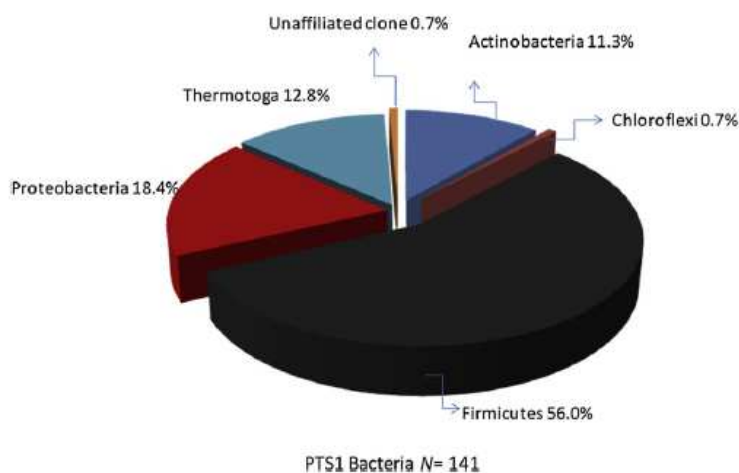


Fig. 4. Relative abundance of bacterial phyla detected in PTS1 16S rRNA clone library.

Table 2

Closely related bacterial taxa detected in GMR75 and PTS1 clone libraries, number of clones and % similarity of 16S rRNA sequences in Blastn analyses.

Phylogeny	Genus or group	GMR75	PTS1	% Similarity
Actinobacteria	<i>Actinomyces</i>	0	1	93
Actinobacteria	<i>Brevibacterium</i>	1	0	99
Actinobacteria	<i>Corynebacterium</i>	0	1	99
Actinobacteria	<i>Curtobacterium</i>	0	2	99
Actinobacteria	<i>Dietzia</i>	3	0	97–100
Actinobacteria	<i>Kocuria</i>	2	6	99–100
Actinobacteria	<i>Propionibacterium</i>	1	5	98–99
Actinobacteria	<i>Rubrobacter</i>	2	0	99
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	4	1	98–99
Bacteroidetes	<i>Petrimonas</i>	2	0	99
Chloroflexi	<i>Chloroflexi</i>	0	1	95
Deferribacteres	<i>Caldivivibrio</i>	9	0	94–95
Deferribacteres	<i>Deferribacteres</i>	16	0	98–99
Firmicutes	<i>Acetivibrio</i>	0	1	99
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	0	1	99
Firmicutes	<i>Clostridium</i>	0	1	99
Firmicutes	<i>Desulfotomaculum</i>	1		99
Firmicutes	<i>Geobacillus</i>	0	41	97–99
Firmicutes	<i>Lactobacillus</i>	0	2	98
Firmicutes	<i>Lactococcus</i>	4	1	99
Firmicutes	<i>Leuconostoc</i>	11	22	98–99
Firmicutes	<i>Oxobacter</i>	2	0	91
Firmicutes	<i>Paenibacillus</i>		7	99
Firmicutes	<i>Staphylococcus</i>	1	2	99–100
Firmicutes	<i>Streptococcus</i>	2	1	97–99
Firmicutes	Uncultured Firmicutes	1	0	95
Firmicutes	<i>Veillonella</i>	1	0	99
Firmicutes	<i>Weissella</i>	10	0	97–99
Spirochaetes	Uncultured	10	0	98–99
Synergistetes	Uncultured	4	0	96–99
Thermotoga	<i>Petrotoga</i>	1	18	98–99
Thermotoga	Uncultured	1	0	97
Thermotoga	Thermotogae			
Alpha proteobacteria	<i>Rhizobium</i>	2	3	99
Alpha proteobacteria	<i>Methylobacterium</i>	0	3	99
Alpha proteobacteria	<i>Paracoccus</i>	0	1	99
Alpha proteobacteria	<i>Pseudovibrio</i>	0	1	99
Alpha proteobacteria	<i>Xanthobacter</i>	1	0	99
Betaproteobacteria	<i>Achromobacter</i>	0	4	99
Betaproteobacteria	<i>Dechlorosoma/Azospira</i>	8	0	99
Betaproteobacteria	<i>Petrobacter</i>	0	1	96
Betaproteobacteria	<i>Thauera</i>	2	5	99
Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	14	1	96–100
Gammaproteobacteria	<i>Citrobacter</i>	0	1	99
Gammaproteobacteria	<i>Lysobacter</i>	0	1	100
Gammaproteobacteria	<i>Rahnella</i>	1	4	97–99
Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	4	1	99
Gammaproteobacteria	<i>Stenotrophomonas</i>	1	0	99
Deltaproteobacteria	<i>Geobacter</i>	1	0	98
Deltaproteobacteria	<i>Pelobacter</i>	1	0	98
Deltaproteobacteria	Syntrophorhabdaceae	1	0	98
Deltaproteobacteria	Uncultured	1	0	98
Deltaproteobacteria	Syntrophaceae			
Deltaproteobacteria	Uncultured	4	0	95–97
Deltaproteobacteria	deltaproteobacterium			
Unaffiliated	Unaffiliated clone	0	1	99
Total		130	141	

Besides Deltaproteobacteria, clones related with *Xanthobacter* (Alpha proteobacteria), *Stenotrophomonas* (Gammaproteobacteria) and *Dechlorosoma/Azospira* (Betaproteobacteria) were exclusive to the GMR75 oil. *Xanthobacter polyaromaticivorans* has been described as being able to degrade heterocyclic aromatic sulfur-containing petroleum in refinery sludge (Hirano et al., 2004). *Stenotrophomonas* spp. have been previously described in oil-polluted environments (Yoshida et al., 2005). Bacteria related to the genera *Dechlorosoma/Azospira* are known to be capable of reducing perchlorate, yielding molecular oxygen (Song and Logan,

2004). It may thus represent a source of biogenic oxygen in anaerobic environments, supporting the hypothesis of the possible formation of islands of aerobic respiration in oil communities.

Methylobacterium, *Paracoccus*, *Pseudovibrio*, *Achromobacter*, *Petrobacter*, *Citrobacter* and *Lysobacter* were detected exclusively in the PTS1 sample. *Methylobacterium* spp. have already been detected in petroleum samples from Campos Basin, Brazil (Sette et al., 2007) and in non-biodegraded petroleum from the Middle East (Yamane et al., 2008). *Paracoccus* spp. were detected in petroleum contaminated soil, and have been described to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons (Davis et al., 1969; Zhang et al., 2004). Two clone sequences were affiliated with *Petrobacter*, previously described as a moderately thermophilic, nitrate-reducing bacteria isolated from oil pad in Australia (Salinas et al., 2004). Five clones were affiliated with the genus *Achromobacter*. Vasconcellos et al. (2009) also detected *Achromobacter* in petroleum samples from reservoirs with different levels of biodegradation, suggesting the widespread distribution of these bacteria in oil fields. One clone was related to the denitrifying-bacterium *Pseudovibrio*, previously isolated in marine sponge in south China sea (Accession No. JN128253.1 in Genbank). No previous reports about *Lysobacter* and *Citrobacter* in petroleum samples were found in the literature.

The phylum Firmicutes was represented in both oil samples. The genera *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus* and *Streptococcus*, belonging to the class Bacilli, are facultative anaerobic Gram positive cocci and were common to both samples. *Leuconostoc* and *Staphylococcus* have already been detected in petroleum samples in previous studies (Sette et al., 2007). Behlülil and Mehmetoglu (2002) have already described the use of *Leuconostoc* in Microbial Enhancement Oil Recovery (MEOR). Clones affiliated with *Geobacillus*, *Paenibacillus* and *Lactobacillus* were detected only in the PTS1 oil sample. *Geobacillus*-like clones were the most abundant in this oil, accounting with 41 sequences. These bacteria have been described as thermophilic hydrocarbon degraders in high temperature oil field, and other strains may be associated with paraffin degradation (Chamkha et al., 2008; Sood and Lal, 2008; Liu et al., 2008). The clostridia *Oxobacter* and clones closely related to *Desulfotomaculum* were detected only in the GMR75 oil sample, whereas representatives of the genera *Acetivibrio* and *Clostridium* were detected only in the PTS1 sample. Clostridia-like strains have already been detected in petroleum samples and seem to be adapted to thrive in deep subsurface reservoirs, suggesting they might be indigenous to petroleum reservoir (Yamane et al., 2008).

Actinobacteria representatives were detected in both oil fields under study. This group has a widespread distribution in different petroleum reservoirs around the world and has been described as hydrocarbon degraders (Nazina et al., 2002; Zrafi-Nouira et al., 2009; Rouvière and Chen, 2003; Salinas et al., 2004). The genus *Dietzia* has been isolated and characterized by our research team in a previous study from Campos Basin and exhibited activity of lipase, esterase and monooxygenase (Vasconcellos, 2006; Vasconcellos et al. 2009). *Streptomyces* spp. have already been characterized as a potential aerobic hydrocarbon degrader (Radwan et al., 1995, 1998). However, Sette et al. (2007) detected this genus in non-biodegraded oil, suggesting that these bacteria may not be the primarily responsible for the degradation of hydrocarbons in oil fields.

The phylum Thermotogae was detected in both oil fields and *Petrotoga* was the represented genus. These bacteria are anaerobic, thermophilic, fermentative, moderately halophilic and considered by many authors as indigenous in petroleum fields (Miranda-Tello et al., 2004, 2007). *Petrotoga olearia* was most closely related to the clones obtained from PTS1 and GMR75 oils, and has been isolated from a deep, continental petroleum reservoir in Western Siberia (L'Haridon et al., 2002).

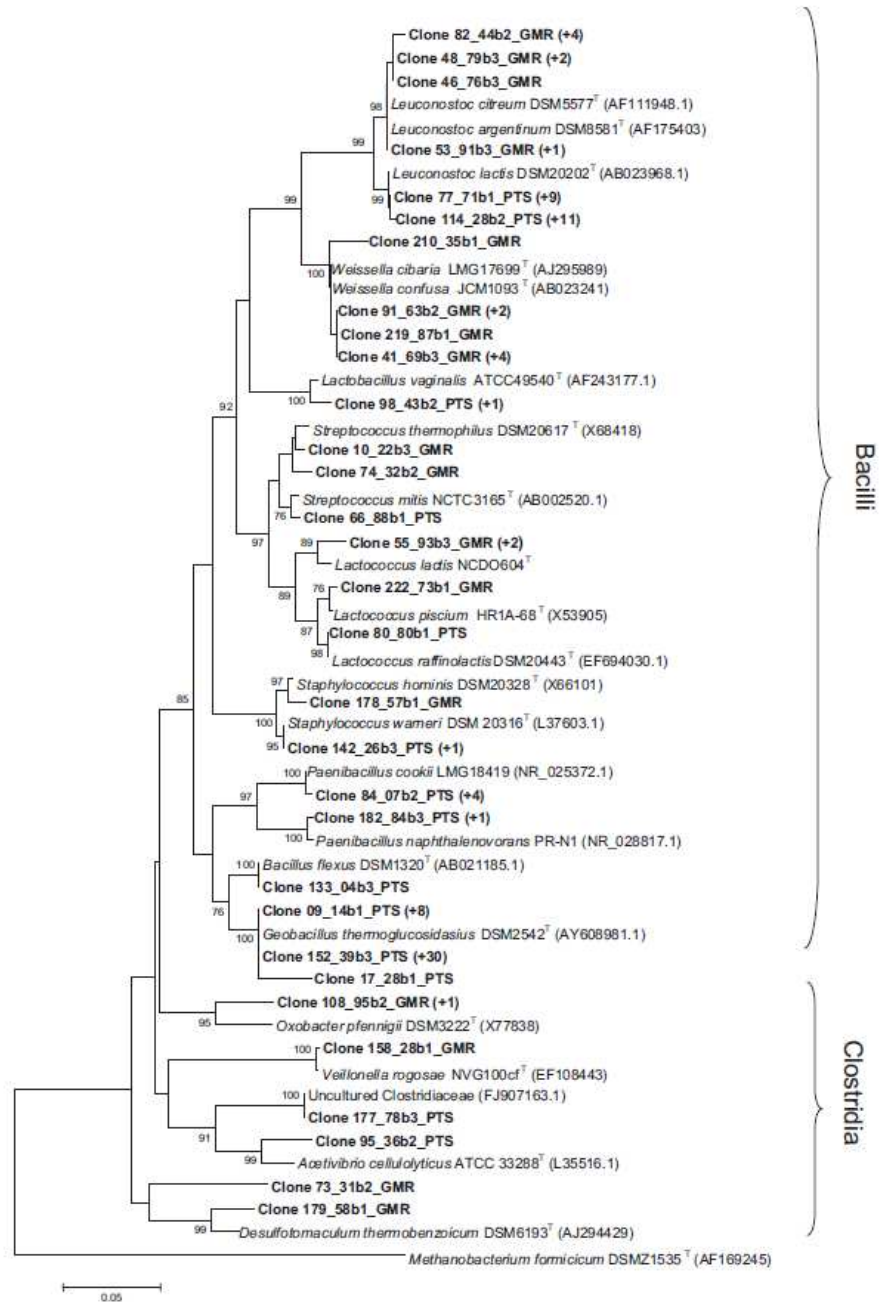


Fig. 5. Phylogenetic analysis based on partial 16S rRNA sequences from GMR75 and PTS1 clones representing members of the Phylum Firmicutes (Classes Bacilli and Clostridia) and related species. Bootstrap values (1000 replicate runs, shown as %) greater than 70% are listed. GenBank accession numbers are listed after species names. *Methanobacterium formicicum* was used as outgroup. Numbers in parentheses indicate additional clones with 97% sequence similarity with the clone represented in the tree.

The phyla Bacteroidetes, Spirochaetes, Synergistetes and Deferribacteres were detected only in the GMR75 sample. Bacteroidetes and Spirochaetes have been described in oil rig environment and enrichment cultures inoculated with oil. Their metabolism consists on fermenting products such as short chain

organic acids and releasing acetate and H_2 (Schink, 1997; Grabowski et al., 2005; Zrafi-Nouira et al., 2009; Dahle et al., 2008; Wrighton, 2005). However, this fermentation is only energetically favorable only when the concentration of acetate and hydrogen are kept low by the acetotrophic and hydrogenotrophic organisms

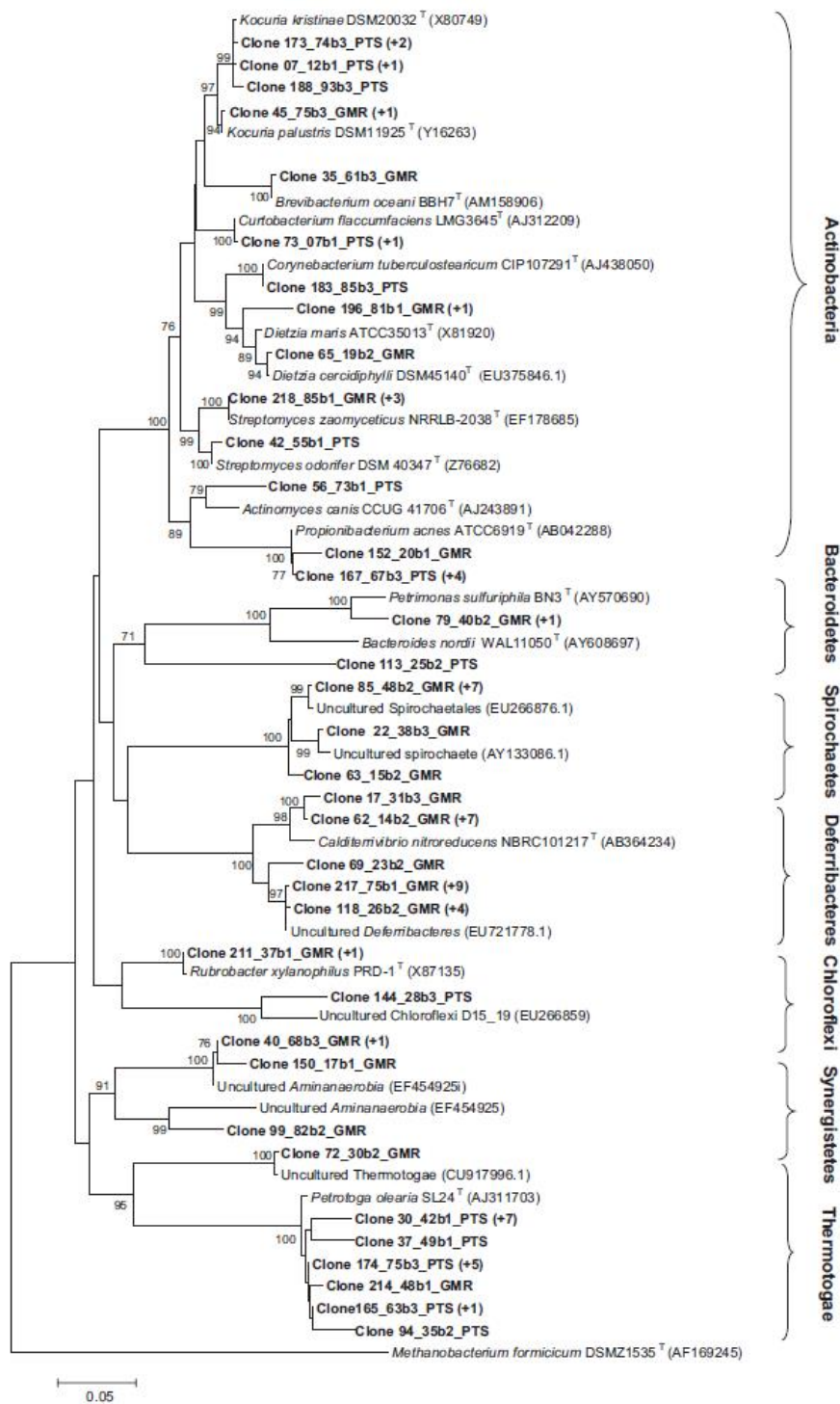


Fig. 6. Phylogenetic analysis based on partial 16S rRNA sequences from GMR75 and PTS1 clones representing members of the Phyla Actinobacteria, Bacteroidetes, Spirochaetes, Deferribacteres, Chloroflexi, Synergistetes and Thermotogae and related species. Bootstrap values (1000 replicate runs, shown as %) greater than 70% are listed. GenBank accession numbers are listed after species names. *Methanobacterium formicicum* was used as outgroup. Numbers in parentheses indicate additional clones with 97% sequence similarity with the clone represented in the tree.

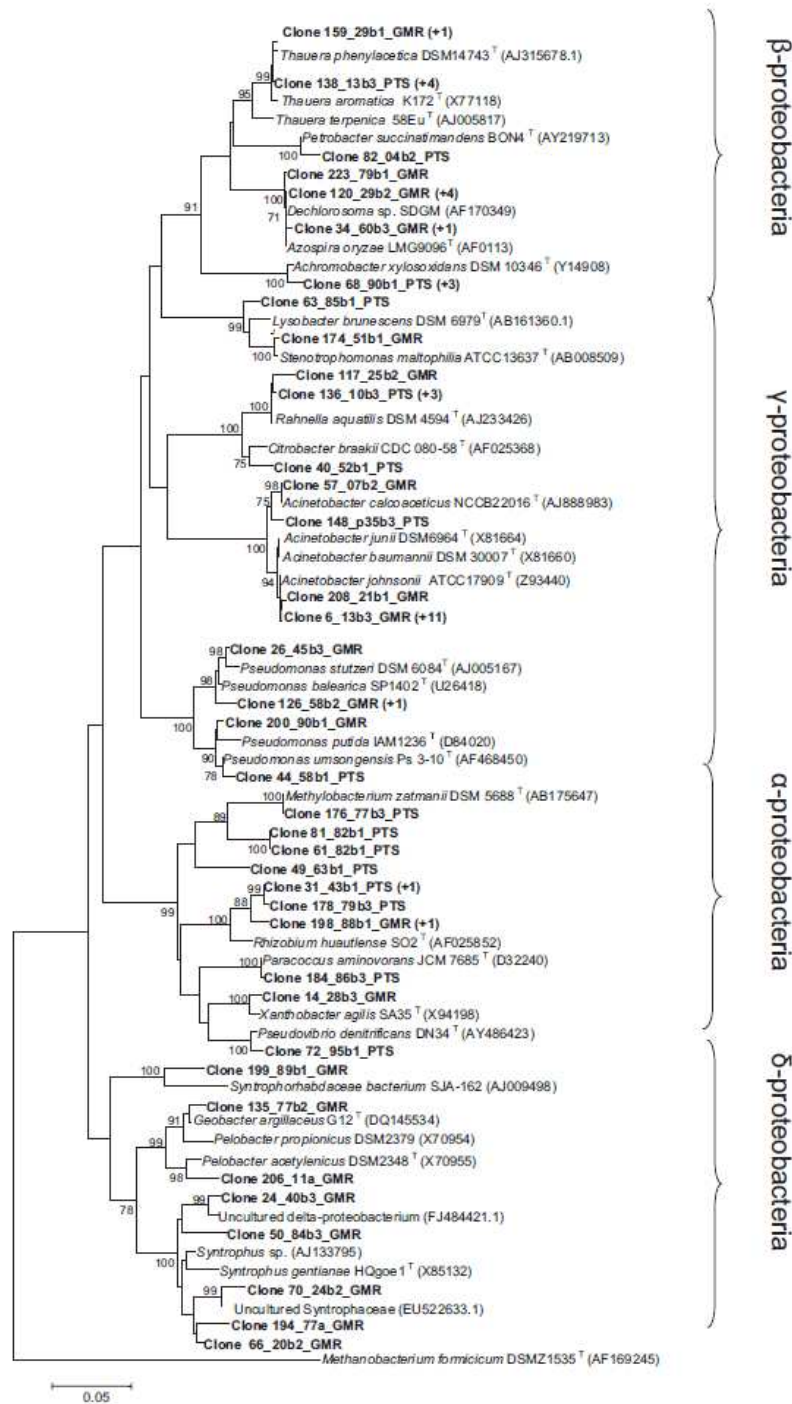


Fig. 7. Phylogenetic analysis based on partial 16S rRNA sequences from GMR75 and PTS1 clones representing members of the Phylum Proteobacteria and related species. Bootstrap values (1000 replicate runs, shown as %) greater than 70% are listed. GenBank accession numbers are listed after species names. *Methanobacterium formicicum* was used as the outgroup. Numbers in parentheses indicate additional clones with 97% sequence similarity with the clone represented in the tree.

Table 3

Richness and diversity estimates for bacterial 16S rRNA gene clone libraries from GMR75 and PTS1 oil samples (sequence classification was based on the cutoff value $D=0.03$ determined by DOTUR).

Sample (n^a)	Richness ^b	ACE ^c	Chao ^d	Shannon ^e
GMR75 (130)	63	179.136	153.214	3.9925
PTS1 (141)	47	135.041	104.375	3.5952

^a Number of gene sequences analyzed.

^b Richness is based on observed unique OTUs.

^c Nonparametric statistical prediction of total richness of different OTUs based on distribution of abundant (10) and rare (10) OTUs.

^d Nonparametric statistical predictions of total richness of OTUs based on distribution of singletons and doubletons.

^e Shannon diversity index. A higher number represents more diversity.

(Schink, 1997; Dojka et al., 1998). The Synergistetes include bacteria recently described by Yamane et al. (2008) in samples of crude oil from China. Finally, Deferribacteres, that are acetoclastic iron-reducing bacteria, have been described in production water from mesothermic petroleum reservoir (Pham et al., 2009). Nine clones among the Deferribacteres were affiliated with the genus *Calditerrivibrio*. No previous report about the occurrence of this genus in

petroleum samples was found, being the unique description in hot springs in Japan (Iino et al., 2008). All *Calditerrivibrio*-like clones found showed less than 95% similarity with sequences deposited in the Genbank database, suggesting that they may represent a new species.

The phylum Chloroflexi was detected only in the PTS1 oil sample and was represented by only one clone closely related to an environmental clone detected in zones of a tar oil contaminant plume (Winderl et al., 2008). These bacteria were previously described as green nonsulfur bacteria, they are ubiquitous and play an important role in the degradation of macromolecules (Schink, 1997; Wrighton, 2005).

4.2. Archaeal diversity

Methanogenic archaea, found only in the GMR75 sample, have been detected in many oil samples around the world (Dahle et al., 2008; Grabowski et al., 2005; Yamane et al., 2008). Li et al. (2007a) described methanogenic archaea in formation water sample of a high temperature petroleum reservoir. Pham et al. (2009) detected those microorganisms in mesothermic formation water samples. The methanogenic archaea play an important role in terminal degradation of hydrocarbons in oil reservoirs (Zengler et al., 1999).

4.3. Culture-dependent and independent analyses

The cross-evaluation of culture-dependent and independent techniques employed in this study for the investigation of microbial diversity in oil samples indicates that some bacterial genera, such as *Janibacter*, *Georgenia*, *Saccharopolyspora*, *Tessaracoccus*, *Brevundimonas*, *Roseomonas* and *Brachymonas* were not detected using the 16S rRNA clone library approach. This could be explained by the fact that these microorganisms recovered by enrichment cultures and not detected by molecular methods are not major components of the *in situ* reservoir microbiota, suggesting that additional clones should be sequenced in order to fully cover the diversity present in the sample. Alternatively, they may have been missed due to DNA extraction or PCR biases, such as differential lysis efficiency or preferential amplification. On the other hand, the majority of the bacterial groups detected by 16S rRNA clone libraries was not recovered by cultivation techniques. This is easily explained by the fact that traditional cultivation techniques select those microorganisms which are able to grow under the specific nutritional and physical conditions used in the study. Only five genera were recovered using both strategies.

These discrepancies between microbial groups recovered using the two strategies have been observed before by other authors in different environments (Chandler et al., 1997; Stephen et al., 1996), suggesting that a more comprehensive assessment of microbial diversity in oil or other environments can be obtained by using a combination of culture- and molecular-based techniques.

4.4. Biodegradation: functional role of the community members

Richness estimates calculated for the oil samples revealed a complex microbial community, which was unexpected due to the nature of the sample and the extreme *in situ* conditions of the oil reservoirs. Diversity indices were considered high when comparable to the ones found in the literature for complex samples, such as sludge (Lin et al., 2009; Silva et al., 2010), soil (Gremion et al., 2003) and marine sponges (Mohamed et al., 2008).

The high diversity and complexity of the microbial communities present in the biodegraded and non-biodegraded oil samples from the Potiguar Basin allowed the authors to infer how intricate are

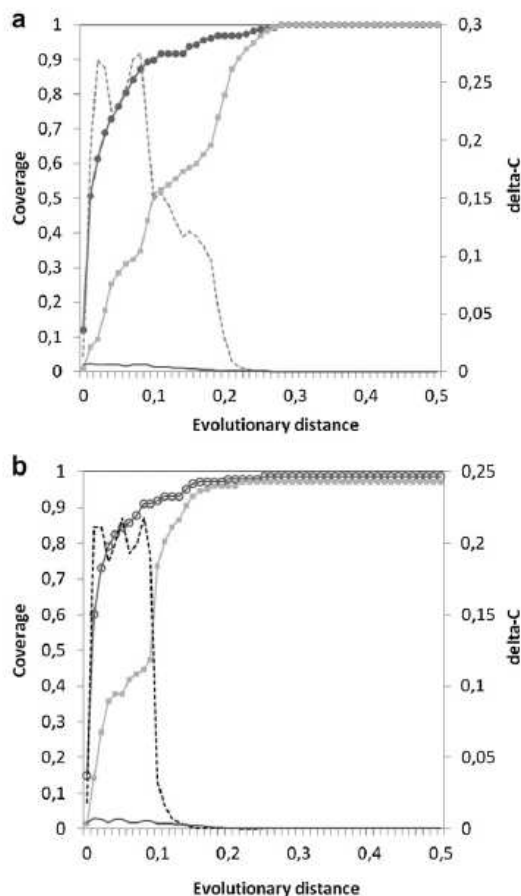


Fig. 8. Genetic coverage comparison between libraries GMR75 and PTS1. (a) GMR75 homologous coverage (filled circle) and (b) PTS1 homologous coverage (open circle). Heterologous coverages are represented by gray squares. Broken lines indicate the value of $(C_x - C_{xy})^2$ for the original samples and solid lines show $P=0.001$ value of $(C_x - C_{xy})^2$ for the randomized samples.

hydrocarbon biodegradation processes that take place in such environments.

According to Stams (1994), the possible sequence of events that could explain anaerobic biodegradation of organic molecules into carbon dioxide and methane requires three major metabolic groups of bacteria: fermentative, syntrophic acetogenic and methanogenic.

Fermentative bacteria were detected in both oil fields under study and were represented by different genera, such as *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Petrotoga*. However, it is not well understood which molecules they are able to use in the fermentation processes that take place in oil reservoirs.

There are some hypotheses to explain anaerobic hydrocarbon biodegradation, and all of them consider nitrate, iron or sulfate as final electron acceptors. Widdel and Rabus (2001) and Aitken et al. (2004) demonstrated different anaerobic biodegradation steps, as well as some bacteria involved in the process. A common step for biodegradation described by those authors was the reaction involving the incorporation of fumarate in the hydrocarbon chain that would produce a molecule with succinate, which could be used in the beta oxidation process.

On the other hand, Slobodkin et al. (1999) described some chemolithotrophic lineages that are able to grow with molecular hydrogen and ferric iron. Therefore those microorganisms are independent of the hydrocarbon source but are possibly associated with the petroleum mixture, contributing to the consortium maintenance.

The fermentation products from polymers (polysaccharides, proteins, nucleic acids and lipids) are first converted to oligomers and monomers (sugars, amino acids, purines, pyrimidines, fatty acids and glycerol), typically through the action of extracellular hydrolytic enzymes. These enzymes are produced by the "classical" primary fermenting bacteria, which ferment the resulting monomers further to fatty acids, succinate, lactate, alcohols, etc. These products would be the pyramid basis for the next bacterial group in the consortium (Schink, 1997).

In methanogenic environments hydrocarbon degradation presumably occurs through syntrophic association (a process in which one species uses the products of another species as a source of energy) between acetogenic bacteria (*Syntrophus*) and methanogenic microorganisms. The first ones metabolize hydrocarbon into acetate and H₂ and the last ones use these compounds to form methane as the final product. This mechanism was proposed for the anaerobic degradation of alkanes and monoaromatic compounds (Zengler et al., 1999). Recently, Jones et al. (2008) confirmed the hypothesis of crude oil anaerobic biodegradation, which was named methanogenic alkane degradation dominated by CO₂ reduction (MADCOR). The authors observed that most of the degradation of hydrocarbons occurred through hydrogenotrophic methanogenesis (75–92%), which uses H₂ instead of acetate for methane production, indicating that the acetate must be oxidized syntrophically to CO₂ and hydrogen, before being converted into methane.

In the present study, microorganisms belonging to the three major metabolic groups cited by Stams (1994) were detected in the biodegraded oil (GMR75), while only fermenters were detected in the non-biodegraded oil (PTS1). Eight clones affiliated with syntrophic acetogens (Deltaproteobacteria) were detected in the GMR75 oil sample, being three of them closely related to *Syntrophus* bacteria, similarly to those described by Zengler et al. (1999) and Jones et al. (2008). Another four clones affiliated with Synergistetes were also detected, and they probably play the same ecological role as an acetate producer in this environment (Pham et al., 2009). These bacteria, known as homoacetogenic, are able to catalyze the formation of acetate (CH₃COO⁻) from units of carbon (C1), such as CO₂ (Diekert and Wohlfarth, 1994). They have

also been recently described by Yamane et al. (2008) in crude oil from China. According to these authors, Synergistetes seem to be well adapted to conditions of high temperature, high pressure and anoxia, which may be characteristic to oil reservoirs.

Methanogenic archaea were affiliated with Methanomicrobiaceae and closely related to a *Methanofollis* strain obtained from a primary culture of formation water from an oil tank, Gangxia, Russia (Genbank accession number GU129125). These archaea are irregular cocci, mesophilic and produces methane only by the consumption of H₂, which characterizes the end of the route of anaerobic degradation of hydrocarbons (Zellner et al., 1999).

It is worth to mention the great abundance of iron-reducing bacteria (Deferribacteres) in the biodegraded oil sample. These bacteria are able to use acetate in their metabolism, which supports the hypothesis that there might be a community of intermediate acetogenic bacteria necessary to maintain the acetoclastic bacterial population (Hori et al., 2007). The use of acetate by the iron-reducing bacteria reinforces the idea that methanogenesis in the GMR75 oil reservoir should be hydrogenoclastic, since the reduction of ferric-iron III is more energetic than the acetodlastic methanogenesis and iron reducers could have access to the carbon of the acetate faster than the acetoclastic archaea (Achtmich et al., 1995; Peters and Conrad, 1996).

4.5. *Aerobes* × *anaerobes*

Although the hydrogenoclastic methanogenesis may be the dominant process of hydrocarbon biodegradation in the GMR oil reservoir, it must be noted that representatives related to classical aerobic biodegrading bacteria were detected in both wells, including *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Thauera*, *Dietzia*, *Streptomyces* and *Pseudomonas*. A possible explanation for the presence of aerobic bacteria in such deep environments could be the *in situ* oxygen production through anaerobic bacterial metabolism. Bacteria related to the genera *Dechlorosoma* known to be capable of reducing perchlorate and producing molecular oxygen (Song and Logan, 2004), were found in the GMR75 oil. These results corroborate previous hypothesis on the existence of a consortium between aerobic and anaerobic microorganisms in oil fields responsible for the *in situ* petroleum degradation (Rozanova et al., 1997). Actually, a wide variety of aerobic bacteria have been previously found by other researches in oil fields located in distinct regions of the world, using isolation and/or molecular methods (Borzenkov et al., 2006; Orphan et al., 2000; Nazina et al., 2001; Bonch-Osmolovskaya et al., 2003; Sette et al., 2007; Vasconcelos et al., 2009, 2010). A study conducted by Cunha et al. (2006) recovered *Bacillus cereus* strains from core samples originated from the rock of a virgin oil reservoir located in a deep-water production basin in the Atlantic Ocean (RJ, Brazil), suggesting that these bacteria are autochthonous in such environments. Generally, the lack of details on sample recovery and possible influx of surface water from injection or naturally due to local geological characteristics, often make the interpretation of the presence of aerobic bacteria in such anaerobic ecosystems quite difficult.

5. Conclusions

In this study, a broad characterization of the microbial assemblages in biodegraded and non-biodegraded oil reservoirs from the Potiguar Basin was achieved. Comparison of the use of traditional isolation techniques with cultivation-independent methods revealed that, in general, distinct microbial taxa were recovered with each technique, corroborating previous findings that suggest a combination of culture- and molecular-based techniques to achieve a more comprehensive assessment of the microbial diversity in

the environment. Diversity indices and richness estimates unraveled an astonishing diversity in the oil reservoirs under study and the detailed analysis of the metabolism of the microbial groups suggest that methanogenesis is the dominant terminal process for hydrocarbon degradation in GMR oil field, driven by anaerobic biodegradation. The combined data gathered in this work allowed the authors to raise a substantial piece of information that certainly contribute to improve the knowledge of the microbial diversity and biogeochemical processes occurring in oil field ecosystems.

Acknowledgments

We thank PETROBRAS for the financial support, donation of samples and authorization to publish this work. T. R. S. was supported by grants from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil).

References

- Achtinich, C., Bak, E., Conrad, R., 1995. Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biology and Fertility of Soils* 19, 65–72.
- Amend, J.P., Teske, A., 2005. Expanding frontiers in deep subsurface microbiology. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 219, 131–155.
- Aitken, C.M., Jones, D.M., Larter, S.R., 2004. Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs. *Nature* 431, 291–294.
- Bach, H., Berdichevsky, Y., Gutnick, D., 2003. An exocellular protein from the oil-degrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier emulsan. *Applied Environmental Microbiology* 69, 2608–2615.
- Bachoon, D.S., Araujo, R., Molina, M., Hodson, R.E., 2001. Microbial community dynamics and evaluation of bioremediation strategies in oil-impacted salt marsh sediment microcosms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 27, 72–79.
- Behar, F., Penteado, H.L.P., Lorant, F., Budzinski, H., 2006. Study of biodegradation processes along the Carnaubais trend, Potiguar Basin (Brazil) – Part I. *Organic Geochemistry* 37, 1042–1051.
- Behlülgl, K., Mehmetoglu, M.T., 2002. Bacteria for improvement of oil recovery: a laboratory study. *Energy Sources* 24, 413–421.
- Bonch-Osmolovskaya, E.A., Miroshnichenko, M.L., Lebedinsky, A.V., Chernyh, N.A., Nazina, T.N., Ivailov, V.S., Belyaev, S.S., Boulygina, E.S., Lysov, Y.P., Perov, A.N., Mirzabekov, A.D., Hippe, H., Stackebrandt, E., L'Haridon, S., Jeanthon, C., 2003. Radioisotopic, culture-based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir. *Applied Environmental Microbiology* 69, 6143–6151.
- Borzenkov, I.A., Milekhina, E.I., Gotoeva, M.T., Rozanova, E.P., Beliaev, S.S., 2006. The properties of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from the oilfields of Tatarstan, Western Siberia, and Vietnam. *Mikrobiologia* 75, 82–89.
- Chamkha, M., Mnif, S., Sayadi, S., 2008. Isolation of a thermophilic and halophilic tyrosol-degrading *Geobacillus* from a Tunisian high-temperature oil field. *FEMS Microbiology Letters* 283, 23–29.
- Chandler, D.P., Shu-Mei, L., Spadoni, C.M., Drake, G.R., Balkwill, D.L., Fredrickson, J.K., Brockman, F.J., 1997. A molecular comparison of culturable aerobic heterotrophic bacteria and 16S rDNA clones derived from a deep subsurface sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 23, 131–144.
- Chao, A., 1984. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* 11, 265–270.
- Chao, A., Ma, M.C., Yang, M.C.K., 1993. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. *Biometrika* 80, 193–201.
- Connan, J., 1984. In: Brooks, J., Welte, D.H. (Eds.), 1984. *Advances in petroleum geochemistry*, vol. 1. Academic, London, pp. 299–335.
- Cunha, C.D., Rosado, A.S., Sebastián, G.V., Seldin, L., von der Weid, I., 2006. Oil biodegradation by *Bacillus* strains isolated from the rock of an oil reservoir located in a deepwater production basin in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, 949–959.
- Dahle, H., Garshol, F., Madsen, M., Birkeland, N., 2008. Microbial community structure analysis of produced water from a high-temperature North Sea oil-field. *Antonie van Leeuwenhoek* 93, 37–49.
- Davis, D.H., Daudoroff, M., Stanier, R.Y., Mandel, M., 1969. Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: taxonomic implications. *International Journal of Systematic Bacteriology* 19, 375–390.
- Diekert, G., Wohlfarth, G., 1994. Metabolism of homocetogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66, 209–221.
- Dojka, M.A., Hugenholtz, P., Haack, S.K., Pace, N.R., 1998. Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Applied Environmental Microbiology* 64, 3869–3877.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendt, M.C., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8, 175–185.
- Felsenstein, J., 1989. PHYLIP-phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* 5, 164–166.
- Good, I.J., 1953. The population frequency of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40, 237–264.
- Grabowski, A., Blanchet, D., Jeanthon, C., 2005. Characterization of long-chain fatty-acid-degrading syntrophic associations from a biodegraded oil reservoir. *Research in Microbiology* 156, 814–821.
- Gremion, F., Chatzinotas, A., Harms, H., 2003. Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicates that *Acinetobacteria* might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil. *Environmental Microbiology* 5, 896–907.
- Head, I.M., Jones, D.M., Larter, S.R., 2003. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature* 426, 344–352.
- Hirano, S., Kitauchi, E., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M., Kanaya, S., 2004. Isolation and characterization of *Xanthobacter polyaromaticivorans* sp. nov. 127W that degrades polycyclic and heterocyclic aromatic compounds under extremely low oxygen conditions. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 68, 557–564.
- Hori, T., Noll, M., Igarashi, Y., Friedrich, M.W., Conrad, R., 2007. Identification of Acetate-Assimilating Microorganisms under Methanogenic Conditions in Anoxic Rice Field Soil by Comparative Stable Isotope Probing of RNA. *Applied Environmental Microbiology* 73, 101–109.
- Hughes, J.B., Hellmann, J.J., Ricketts, T.H., Bohannon, B.J.M., 2001. Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied Environmental Microbiology* 67, 4399–4406.
- Iino, T., Nakagawa, T., Mori, K., Harayama, S., Suzuki, K., 2008. *Calditerrivibrio nitroreducens* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, nitrate-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 1675–1679.
- Jones, D.M., Head, I.M., Gray, N.D., Adams, J.J., Rowan, A.K., Aitken, C.M., Bennett, B., Huang, H., Brown, A., Bowler, B.F.J., Oldenburg, T., Erdmann, M., Larter, S.R., 2008. Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs. *Nature* 451, 176–180.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16, 111–120.
- Kudo, Y., Shibata, S., Miyaki, T., Aono, T., Oyaizu, H., 1997. Peculiar archaea found in Japanese paddy soils. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 61, 917–920.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, United Kingdom, pp. 115–175.
- Leuthner, B., Heider, J., 1999. Anaerobic toluene catabolism of *Thauera aromatica*: the bbs operon codes for enzymes of beta-oxidation of the intermediate benzylsuccinate. *Journal of Bacteriology* 182, 272–277.
- L'Haridon, S., Miroshnichenko, M.L., Hippe, H., Fardeau, M.L., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Stackebrandt, E., Jeanthon, C., 2002. *Petrogoba olearia* sp. nov. and *Petrogoba sibirica* sp. nov., two thermophilic bacteria isolated from a continental petroleum reservoir in Western Siberia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1715–1722.
- Li, H., Yang, S., Um, B., 2007a. Phylogenetic diversity of the archaeal community in a continental high-temperature water-flooded petroleum reservoir. *Current Microbiology* 55, 382–388.
- Li, H., Yang, S., Um, B., Rong, Z., Zhang, J., 2007b. Molecular phylogenetic diversity of the microbial community associated with a high-temperature petroleum reservoir at an offshore oil field. *FEMS Microbiology Ecology* 60, 74–84.
- Lin, S., Jin, S., Fu, L., Quan, C., Yang, Y.S., 2009. Microbial community variation and functions to excess sludge reduction in a novel gravel contact oxidation reactor. *Journal of Hazardous Materials* 165, 1083–1090.
- Liu, Q.K., Wang, J., Li, G.Q., Ma, T., Liang, F.L., Liu, R.L., 2008. Characterization of a thermophilic *Geobacillus* strain DM-2 degrading hydrocarbons. *Huan Jing Ke Xue* 29, 3554–3560.
- Magot, M., Ollivier, B., Patel, B.K.C., 2000. *Microbiology of petroleum reservoirs*. Antonie van Leeuwenhoek 77, 103–116.
- Magurran, A.E., 2004. *Measuring Biological Diversity*. Blackwell Science Ltd, USA, pp. 256.
- Miranda-Tello, E., Fardeau, M.L., Joulain, C., Magot, M., Thomas, P., Tholozan, J.L., Ollivier, B., 2007. *Petrogoba halophila* sp. nov., a thermophilic, moderately halophilic, fermentative bacterium isolated from an offshore oil well in Congo. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 40–44.
- Miranda-Tello, E., Fardeau, M.L., Thomas, P., Ramirez, F., Casalot, L., Cayol, J.L., Garcia, J.L., Ollivier, B., 2004. *Petrogoba mexicana* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic and xylanolytic bacterium isolated from an oil-producing well in the Gulf of Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 169–174.
- Mohamed, N.M., Enticknap, J.J., Lohr, J.E., McIntosh, S.M., Hill, R.T., 2008. Changes in bacterial communities of the marine sponge *Mycale laxissima* on transfer into aquaculture. *Applied Environmental Microbiology* 74, 1209–1222.
- Nazina, T.N., Touroua, T.P., Poltarus, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., Lysenko, A.M., Petrunyaka, V.V., Osipov, G.A., Belyaev, S.S., Ivanov, M.V., 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothersophilus*, *Bacillus thermocatenuatus*, *Bacillus thermoleovonans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucoacidastus* and *Bacillus thermodentificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothersophilus*, *G. thermocatenuatus*, *G.*

- thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermofucosidastus* and *G. thermodenitrificans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 433–446.
- Nazina, T.N., Grigor'ian, A.A., Sue, K.F., Sokolova, D.Sh., Novikova, E.V., Turova, T.P., Poltarau, A.B., Beliaev, S.S., Ivanov, M.V., 2002. Phylogenetic diversity of aerobic saprotrophic bacteria isolated from the Daqing oil field. *Mikrobiologiya* 71, 103–110.
- Orphan, V.J., Taylor, L.T., Hafenbradl, D., Delong, E.F., 2000. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblage associated with high temperature petroleum reservoirs. *Applied Environmental Microbiology* 66, 700–711.
- Peters, V., Conrad, R., 1996. Sequential reduction processes and initiation of CH₄ production upon flooding of oxic upland soils. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 371–382.
- Pettitt, A.N., 1982. Cramer-von Mises statistic. In: Kotz, S., Johnson, N.L. (Eds.), *Encyclopedia of Statistical Sciences*. Wiley-Interscience, New York, N.Y., pp. 220–221.
- Pham, V.D., Hnatow, L.L., Zhang, S., Fallon, R.D., Jackson, S.C., Tomb, J.F., Delong, E.F., Keeler, S.J., 2009. Characterizing microbial diversity in production water from an Alaskan mesothermic petroleum reservoir with two independent molecular methods. *Environmental Microbiology* 11, 176–187.
- Pitche, D.G., Saunders, N.A., Owen, R.J., 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology* 8, 151–156.
- Radwan, S.S., Sorkhoh, N.A., Fardoun, F., Al-Hasan, R.H., 1995. Soil management enhancing hydrocarbon biodegradation in the polluted Kuwaiti desert. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44, 265–270.
- Radwan, S.S., Barabas, G., Sorkhoh, N.A., Damjanovich, S., Szabo, I., Szollosi, J., Matko, J., Penyige, A., Hirano, T., Szabo, I.M., 1998. Hydrocarbon uptake by *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters* 169, 87–94.
- Rodrigues, D.C., Vasconcelos, S.P., Alves, P.B., Nascimento, L.R., Abreu Filho, B.A., Oliveira, V.M., Manfio, G.P., Santos Neto, E.V., Marsaioli, A.J., 2005. Relationship between cyclohexyl alkanolic acids and the acidothermophilic bacterium. *Organic Geochemistry* 36, 1443–1453.
- Rouvière, P.E., Chen, M.W., 2003. Isolation of *Brachymonas petroleovorans* CHX, a novel cyclohexane-degrading beta-proteobacterium. *FEMS Microbiology Letters* 227, 101–106.
- Rozanova, E.P., Savvichev, A.S., Miller, Y.M., Ivanov, M.V., 1997. Microbial process in a West Siberian oil field flooded with waters containing a complex of organic compounds. *Microbiology* 66, 718–725.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406–425.
- Salinas, M.B., Fardeau, M., Cayol, J., Casalot, L., Patel, B.K.C., Thomas, P., Garcia, J., Olivier, B., 2004. *Perrhotobacter succinatimandens* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic, nitrate-reducing bacterium isolated from an Australian oil well. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 645–649.
- Santos Neto, E.V., Hayes, J.M., 1999. Use of hydrogen and carbon stable isotopes characterizing oils from the Potiguar Basin (Onshore), Northeastern Brazil. *AAPG Bulletin* 83, 496–518.
- Schink, B., 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61, 262–280.
- Schloss, P.D., Handelsman, J., 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied Environmental Microbiology* 71, 1501–1506.
- Sette, L.D., Simioni, K.C.M., Vasconcelos, S.P., Dussán, L.J., Marsaioli, A.J., Santos Neto, E.V., Oliveira, V.M., 2007. Analysis of composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Antonie van Leeuwenhoek* 91, 253–266.
- Silva, C.C., Jesus, E.C., Sousa, M., Torres, A.P.R., Santiago, V.M.J., Oliveira, V.M., 2010. Investigation of bacterial diversity in membrane bioreactor and conventional activated sludge processes from petroleum refineries using phylogenetic and statistical approaches. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20, 48–57.
- Singleton, D.R., Furlong, M.A., Rathbun, S.L., Whitman, W.B., 2001. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Applied Environmental Microbiology* 67, 4374–4376.
- Slobodkin, A.I., Jeanthon, C., L'Haridon, S., Nazina, T., Mirmshnichenko, M., Bonch-Osmolovskaya, E., 1999. Dissimilatory reduction of Fe(III) by thermophilic bacteria and archaea in deep subsurface petroleum reservoirs of western Siberia. *Current Microbiology* 39, 99–102.
- Song, Y., Logan, B.E., 2004. Effect of O₂ exposure on perchlorate reduction by *Dechloromonas* sp. *KJ Water Research* 38, 1626–1632.
- Sood, N., Lal, B., 2008. Isolation and characterization of a potential paraffin-wax degrading thermophilic bacterial strain *Geobacillus kaustophilus* TERI NSM for application in oil wells with paraffin deposition problems. *Chemosphere* 70, 1445–1451.
- Souto Filho, J.D., Correa, A.C.F., Santos Neto, E.V., Trindade, L.A.F., 2000. Alagamar-Açu petroleum system onshore Potiguar Basin, Brazil: a numerical approach for secondary migration. AAPG Memoir 73, Chapter 12, AAPG Special Volumes. In: *Petroleum Systems of South Atlantic Margins*, pp. 151–158.
- Stahl, D.A., Amann, R., 1991. Development and application of nucleic acid probes. In: *Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, United Kingdom, pp. 205–248.
- Stams, A.J., 1994. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie van Leeuwenhoek* 66, 271–294.
- Stephen, J.R., McCaig, A.E., Smith, Z., Prosser, J.L., Embley, T.M., 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 62, 4147–4154.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA: Molecular Evolutionary genetics analysis. (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596–1599.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25, 4876–4882.
- van Beilen, J.B., Wubbols, M.G., Witholt, B., 1994. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation* 5, 161–174.
- van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, Q.P., 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 503–549.
- Vasconcelos, S.P., 2006. *Atividades Enzimáticas e de Biodegradação de Microorganismos do Petróleo da Bacia de Campos (Pampo Sul)*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas.
- Vasconcelos, S.P., Crespin, E., Cruz, G.F., Simioni, K.C.M., Santos Neto, E.V., Marsaioli, A.J., Oliveira, V.M., 2009. Isolation, biodegradation ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. *Organic Geochemistry* 40, 574–588.
- Vasconcelos, S.P., Angolini, C.F.F., Sierra-García, I.N., Dellagente, B.M., Silva, C.C., Marsaioli, A.J., Santos Neto, E.V., Oliveira, V.M., 2010. Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs. *Organic Geochemistry* 41, 675–681.
- Widdel, F., Rabus, R., 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* 12, 259–276.
- Winderl, C., Anneser, B., Griebler, C., Meckenstock, R.J., Lueders, T., 2008. Depth-resolved quantification of anaerobic toluene degraders and aquifer microbial community patterns in distinct redox zones of a tar oil contaminant plume. *Applied Environmental Microbiology* 74, 792–801.
- Wrighton, K.C., 2005. *The search for bacteria involved in anaerobic petroleum degradation*. Master thesis, California Polytechnic State University.
- Yamane, K., Maki, H., Nakayama, T., Nakajima, T., Nomura, N., Uchiyama, H., Kitaoka, M., 2008. Diversity and similarity of microbial communities in petroleum crude oils produced in Asia. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 72, 2831–2839.
- Yoshida, N., Yagi, K., Sato, D., Watanabe, N., Kuroishi, T., Nishimoto, K., Yanagida, A., Katsuragi, T., Kanagawa, T., Kurane, R., Tani, Y., 2005. Bacterial communities in petroleum oil in stockpiles. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99, 143–149.
- Zellner, G., Boone, D.R., Keswani, J., Whitman, W.B., Woese, C.R., Hagelstein, A., Tindal, B.J., Stackebrandt, E., 1999. Reclassification of *Methanogenium tatonis* and *Methanogenium liminatans* as *Methanofollis tatonis* gen. nov., comb. nov. and *Methanofollis liminatans* comb. nov. and description of a new strain of *Methanofollis liminatans*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 247–255.
- Zhang, H., Kallimanis, A., Koukoulou, A.I., Drinas, C., 2004. Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 124–131.
- Zengler, K., Richnow, H.H., Rossello-Mora, R., Michaelis, W., Widdel, F., 1999. Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature* 401, 266–269.
- Zrafi-Nouira, I., Guerzazi, S., Chouari, R., Safi, N.M., Pelletier, E., Bakrouf, A., Saïdane-Mosbahi, D., Sghir, A., 2009. Molecular diversity analysis and bacterial population dynamics of an adapted seawater microbiota during the degradation of Tunisian zazzatine oil. *Biodegradation* 20, 467–486.