

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



BRUNA MARTINS DELLAGNEZZE

**“BIOPROSPECÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DE
BIOSSURFACTANTES A PARTIR DE MICROBIOTA DE
RESERVATÓRIOS DE PETRÓLEO”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
BRUNA MARTINS DELLAGNEZZE
Valéria Merzel
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética de
Microorganismos.

Orientadora: Dra. Valéria Maia Merzel

Co-Orientadora: Profa. Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

D38b

Dellagnezze, Bruna Martins

Bioprospecção de genes envolvidos na síntese de biossurfactantes a partir de microbiota de reservatórios de petróleo / Bruna Martins Dellagnezze. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadoras: Valéria Maia de Oliveira, Suzan Pantaroto de Vasconcellos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Petróleo. 2. Biossurfactantes. 3. Metagenômica. 4. Bioemulsificante. 5. Substâncias exopoliméricas. I. Oliveira, Valéria Maia de. II. Vasconcellos, Suzan Pantaroto de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(rodt/ib)

Título em inglês: Bioprospection of genes involved in the synthesis of biosurfactants from brazilian petroleum reservoirs microbial communities.

Palavras-chave em inglês: Petroleum; Biosurfactants; Metagenomics; Bioemulsifiers; Exopolymeric substances.

Área de concentração: Genética de Microorganismos.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Valéria Maia de Oliveira, Anete Pereira de Souza, Fernando Dini Andreote.

Data da defesa: 14/07/2010.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 14 de julho de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Valéria Maia Merzel
(orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza


Assinatura

Prof. Dr. Fernando Dini Andreote


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Assinatura

Prof. Dr. Wellington Luiz Araújo

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me conduzido em todos os momentos deste trabalho, inclusive nos mais difíceis;

À minha orientadora Dra. Valéria, pela oportunidade, incentivo, ensinamentos e por toda a compreensão e paciência, auxílio e empenho na realização deste trabalho;

A minha co-orientadora Dra. Suzan, uma amiga com a qual pude contar, por toda a paciência e incentivo, ensinamentos, auxílio e força nas horas de desânimo;

A FAPESP e a PETROBRÁS pelo apoio financeiro e logístico fornecido para a realização deste trabalho;

À Profa. Dra Lucia Regina Durrant, do Laboratório de Fisiologia Microbiana (FEA-UNICAMP), assim como à Dra. Isis, e à Dra. Andrea, pela disponibilização do seu laboratório e equipamento para a realização de uma etapa do trabalho. Obrigada pela paciência e atenção sempre!

Aos meus queridos pais que eu amo tanto, Rene e Silvana, e minha querida irmã Beatriz, pelo infinito apoio, amor e conforto que me ajudaram na realização deste trabalho;

A minha família, tios, tias, primos e primas pelo apoio e incentivo;

Aos meus queridos amigos de longa data, Vanessa (Vanza) e Paulo, pelo apoio, todas as risadas e incentivo sempre;

Ao pessoal do lab. de Genética Humana (CBMEG-UNICAMP), meus amigos Flávia (Florzinha) e Reginaldo, companheiros de início e final de mestrado, obrigada pelo apoio sempre! Aos meus colegas Sueli, Frau e a Dra. Edi Sartorato, pelo apoio e pela oportunidade inicial dentro da Unicamp para a realização do meu mestrado!

Aos meus colegas da DRM por todo o companheirismo, auxílio e bons momentos de convivência no laboratório, todos contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho!!!

Aos meus novos amigos João e Milena, com os quais também pude contar sempre!

Ao Eduardo, uma pessoa especial para mim, obrigada por estar comigo sempre, pela paciência e apoio.

RESUMO

Bioemulsificantes ou biossurfactantes são compostos sintetizados por micro-organismos que aumentam a biodisponibilidade de hidrocarbonetos, promovendo a estabilização de substâncias com diferentes polaridades, como por exemplo, emulsões água-óleo existentes nos reservatórios de petróleo. As amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas na Bacia Potiguar (RN), e empregadas como inóculo para a realização de enriquecimentos anaeróbios e aeróbios da microbiota do petróleo. A amostra de óleo selecionada (GMR 75) foi obtida a partir de um poço com nível de biodegradação moderado. Após o período de incubação dos enriquecimentos, foi realizada a extração de DNA dos mesmos e a construção das bibliotecas de fosmídios, utilizando-se kit de clonagem comercial. A avaliação da produção de emulsificantes pelos clones fosmidias provenientes das bibliotecas metagenômicas foi realizada através de dois tipos de ensaios de triagem, um teste baseado em atividade biológica e outro em similaridade de sequência. O teste funcional, denominado “colapso da gota”, apresenta caráter qualitativo e foi utilizado para a triagem preliminar de 2.880 clones, gerando 2.104 resultados positivos. Para o teste baseado em sequência, os clones que se mostraram positivos no teste funcional foram avaliados através de reações de PCR utilizando primers homólogos a regiões conservadas de genes para a síntese de biossurfactantes. Entretanto, nenhum sinal positivo de amplificação foi observado com os primers utilizados. Ensaio de tensiometria, utilizando meio mineral e hexadecano como única fonte de carbono e energia, foram realizados para a confirmação da produção dos emulsificantes pelos clones. Nove clones capazes de reduzir a tensão interfacial de 45 mN/m para 30 mN/m foram selecionados e submetidos aos ensaios de emulsificação utilizando petróleo, óleo diesel e hexadecano. Os resultados demonstraram a formação de emulsão, principalmente em óleo diesel, sugerindo poder emulsificante sobre este composto. As análises colorimétricas dos biossurfactantes produzidos pelos nove clones revelaram proporções similares de carboidratos, proteínas e ácidos urônicos, não permitindo resultados conclusivos sobre a composição destes compostos.

Palavras-chave: petróleo, bibliotecas metagenômicas, enriquecimentos microbianos, triagens funcionais, substâncias exopoliméricas, bioemulsificantes

ABSTRACT

Bioprospection of genes involved in the synthesis of biosurfactants from petroleum reservoir microbial communities

Bioemulsifiers or biosurfactants are compounds produced by microorganisms which enhance the bioavailability of hydrophobic substances promoting the stabilization of substances with different polarities, like oil-in-water emulsion occurring in petroleum reservoirs. The samples used in this work were collected in the Potiguar Basin (RN, Brazil), and employed as inoculum for aerobic and anaerobic enrichments of the petroleum microbiota. The selected oil sample (GMR 75) was obtained from a reservoir presenting a moderate biodegradation level. After the incubation period of the microbial enrichments, total DNA was extracted and used for the assembly of the metagenomic libraries by using a commercial kit. The evaluation of the potential for emulsifier production by the fosmid clones derived from the metagenomic libraries was performed by means of two screening assays, one based on biological activity and another based on sequence similarity. The functional assay, named "drop collapse", has a qualitative character and was used for the preliminary screening of 2,880 clones, yielding 2,104 positive results. For the sequence-based assay, clones shown to be positive in the functional assay were evaluated through PCR reactions using primers homologous to conserved regions of genes for biosurfactant synthesis. However, no positive amplification signal was observed with the primers used. Tensitometric assays, using mineral medium and hexadecane as sole carbon and energy source, were performed to confirm the production of the biosurfactants by the clones. Nine clones able to reduce the interfacial tension from 45 mN/m to 30 mN/m were selected and subsequently submitted to emulsification assays using petroleum, diesel oil and hexadecane. Results demonstrated the formation of an emulsion, mainly in diesel oil, suggesting the emulsifier power of the biosurfactants over this substance. Colorimetric analyses of the biosurfactants produced by the clones revealed similar proportion of carbohydrates, proteins and uronic acids, not allowing conclusive characterization of their composition.

Key-words: petroleum, metagenomic libraries, microbial enrichments, functional assays, exopolymeric substances, bioemulsifiers.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1. Petróleo.....	13
2.2. Microbiologia do petróleo.....	14
2.3. Metagenômica.....	17
2.4. Substâncias Poliméricas Extracelulares.....	21
2.5. Biossurfactantes.....	22
2.5.1. Tipos de biossurfactantes.....	25
2.5.2. Aplicações.....	28
2.6. Genes envolvidos na produção de EPS.....	32
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. Objetivos Gerais.....	34
3.2. Objetivos Específicos.....	34
4. ESTRUTURA	34
 CAPÍTULO 1. <i>Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs</i>.....	 35
 CAPÍTULO 2. <i>Avaliação da produção de biossurfactantes através de ensaios de triagem em bibliotecas metagenômicas derivadas de reservatórios de petróleo</i>.....	 44

1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.1. Triagem para detecção de biossurfactantes nas bibliotecas metagenômicas.....	46
2.2. Ensaio de tensiometria.....	49
2.3. Extração e caracterização química dos biossurfactantes através de análises colorimétricas.....	50
2.4. Teste emulsificante.....	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
3.1. Triagem para detecção de biossurfactantes nas bibliotecas metagenômicas.....	53
3.2. Ensaio de tensiometria.....	56
3.3. Caracterização química dos biossurfactantes.....	59
3.4. Teste de emulsificação.....	62
4. CONCLUSÕES.....	65
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXO: Aprovação do Comitê Interno de Biossegurança (CIBio).....	78

1. INTRODUÇÃO

Biossurfactantes ou bioemulsificantes são biopolímeros extracelulares, ou substâncias exopoliméricas (EPS) que podem ser produzidos por micro-organismos procariotos (Dominios *Bacteria* e *Archaea*) e eucariotos (algas, fungos), apresentando em sua molécula, uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica. Substâncias surfactantes apresentam como principal característica a capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de soluções. Emulsificantes, por sua vez, compõem uma subclasse de surfactantes, as quais estabilizam dispersões de um líquido com diferentes polaridades, como emulsões óleo-água (Ron & Rosenberg, 2001). O fato de possuírem porções hidrofóbica e hidrofílica em sua estrutura torna esses compostos responsáveis por aumentar a biodisponibilidade de compostos apolares, como, por exemplo, hidrocarbonetos do petróleo. Nesses ambientes, as bactérias crescem na região de interface entre óleo-água e a produção de EPS promove uma solubilização dos hidrocarbonetos, aumentando a área de acesso às bolhas de óleo, ou seja, ao substrato (Ron & Rosenberg, 2001; Sutherland, 1994).

Estudos envolvendo a produção e as funções dos biossurfactantes principalmente utilizando hidrocarbonetos como fontes de carbono, já são extensos na literatura (Desai & Banat, 2007; Navon-Venezia et al., 1995; Rahman et al., 2003; Zhang & Miller, 1992). Estes compostos apresentam algumas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, como alta biodegradabilidade, baixa toxicidade e funcionalidade em condições extremas de temperatura, salinidade e pH (Muthusamy *et al.*, 2008; Desai & Banat, 1997).

Algumas aplicações já são descritas principalmente em processos de biorremediação de ambientes (solos e águas) contaminados por hidrocarbonetos, promovendo uma maior solubilidade e mobilidade de compostos hidrofóbicos viabilizando assim a sua biodegradação (Tango & Islam, 2002). Além de atuar em processos de biodegradação de hidrocarbonetos, alguns biossurfactantes são capazes de remover metais pesados, como cádmio, cobre, chumbo e zinco em solos contaminados (Mulligan, 2005). Outras aplicações relevantes dos biossurfactantes incluem os processos de recuperação de petróleo (MEOR - *Microbial Enhancement Oil Recovery*), como agentes antimicrobianos e antivirais e até como moléculas imunomoduladoras (Cameotra & Makkar, 2004). Também podem ser amplamente utilizados em indústrias de alimentos e

cosméticos como agentes emulsificantes, espumantes e umectantes (Muthusamy *et al.*, 2008).

Muitos tipos de biossurfactantes são descritos, cada um produzido por um micro-organismo específico. Existem as classes dos glicolipídeos (onde os mais conhecidos são os ramnolipídeos, produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas*), dos lipopeptídeos (mais conhecidos como surfactinas, produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*) e os biossurfactantes poliméricos, moléculas mais complexas e com maior peso molecular, produzidos por *Acinetobacter* sp. (Rahmam & Gapke, 2008; Desai & Banat, 1997; Sullivan, 1998). Existem ainda outros tipos de biossurfactantes produzidos por alguns fungos e leveduras, como, por exemplo, os soforolipídios produzidos por algumas espécies de *Candida*, e os lipídeos manosilertitol (MEL) produzidos por *Ustilago maydis*.

Estudos genéticos de micro-organismos produtores de EPS são importantes ferramentas para a descoberta de novos genes ou grupos de genes envolvidos na produção de polímeros extracelulares (Mukherjee *et al.*, 2006). Entretanto, a maioria dos estudos que envolvem genes produtores de biossurfactantes ou emulsificantes é relacionada a micro-organismos isolados em cultura pura, principalmente dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* (Oschner *et al.*, 1994; Chaves *et al.*, 2005; Hsieh *et al.*, 2004).

Estima-se que uma fração de apenas 1 a 10% dos micro-organismos pode ser hoje cultivada em laboratório (Amann *et al.*, 1995; Hugenholtz *et al.*, 1998), o que torna necessário o uso de novas ferramentas para o estudo e exploração da diversidade microbiana existente no ambiente. O aprimoramento de novas metodologias moleculares nas últimas décadas (extração de ácidos nucleicos, amplificação por PCR, clonagem e seqüenciamento de DNA) tem permitido superar as limitações impostas pela abordagem clássica de estudo de populações microbianas tornando possível uma avaliação mais precisa da diversidade de micro-organismos, nunca antes cultivados. O uso destas metodologias associado à estratégia de bibliotecas metagenômicas possibilita o acesso ao potencial metabólico da comunidade microbiana total presente em uma dada amostra ambiental (Handelsman *et al.*, 1998). Através de uma biblioteca de metagenoma, uma variedade maior de compostos com atividade biológica de interesse pode ser obtida simultaneamente, em comparação ao método tradicional baseado em isolamento, cultivo e triagem de linhagens puras de micro-organismos.

Neste estudo, a construção e triagem de bibliotecas metagenômicas oferecem a possibilidade de descoberta de novos tipos de biossurfactantes, principalmente de micro-organismos que vivem sob a forma de consórcios e em ambientes de difícil acesso, como é o caso dos reservatórios de petróleo. Estudos de investigação da produção e aplicação de biossurfactantes são de extrema relevância, visando sua aplicação futura para biotransformar ou degradar compostos nocivos ao meio ambiente em processos ambientalmente mais sustentáveis.

REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Petróleo

O petróleo se constitui de uma complexa mistura de hidrocarbonetos, ácidos orgânicos, ácidos naftênicos, compostos aromáticos e outros compostos, como vanádio e níquel (Van Hamme, 2003; Magot *et al.*, 2000). Hidrocarbonetos são compostos formados por carbono e hidrogênio e podem ser classificados quanto à sua estrutura em cíclicos ou alifáticos (alcanos, alenos, 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 e fenantreno (Holliger & Zehndert, 1996).

O petróleo brasileiro tem características muito próprias, com uma predominância de óleos pesados, o que exige etapas adicionais de refino para a obtenção de gás, gasolina e óleo diesel. O perfil destes óleos é moldado pela ação de bactérias que atuam na degradação das frações leves do petróleo, consumindo, preferencialmente, hidrocarbonetos lineares e, na seqüência, os hidrocarbonetos ramificados, isoprenóides e ciclanos (Peters e Moldowan, 1993). O Brasil possui mais de 20 bacias petrolíferas e alcançou sua auto-suficiência na produção no ano de 2006. De acordo com dados da Petrobrás, entre os meses de janeiro a setembro desse mesmo ano, foram produzidos em torno de 1.763 milhões de barris por dia, representando 5% a mais do que ano anterior (Goldemberg & Lucon, 2007).

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 Potiguar, em sua parte terrestre, experimentou grande incremento exploratório a partir do final da década de 70, em virtude da inusitada descoberta de óleo durante a perfuração de um poço para abastecimento de água em Mossoró – RN. A partir de então, o cumulativo de trabalhos resultou em reservas que, atualmente, totalizam 283 milhões de

barris de óleo (ANP, 2001). A bacia produz em torno de 77.000 barris de petróleo por dia, constituindo a terceira maior produtora brasileira de petróleo (Lopes *et al.*, 1999).

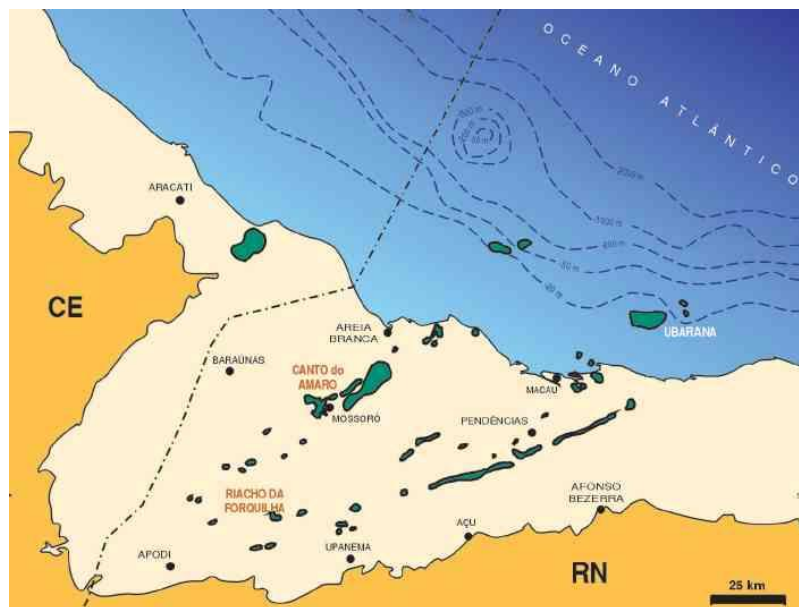


Figura 1: Bacia Potiguar. A área mais clara da figura representa a região de localização dos campos petrolíferos na porção terrestre (ANP, 2001).

A problemática da degradação, deterioração e recuperação de petróleo reside basicamente no esgotamento das reservas mundiais e brasileiras de petróleo, existindo poucas perspectivas para o descobrimento de novos reservatórios. Durante 15 a 20 anos, a produção mundial de petróleo foi de 30 bilhões de barris por ano, no entanto, ao final do século XX, tal número foi reduzido a no máximo 10 bilhões, tendendo à diminuição para 5 bilhões e, finalmente, sua exaustão (White *et al.*, 2003).

2.2. Microbiologia do Petróleo

A capacidade de sobrevivência dos micro-organismos em reservatórios de petróleo depende das características físico-químicas deste ecossistema, como pH, salinidade e temperatura, sendo esta última o principal fator limitante para o crescimento microbiano. Diferentes tipos de dados sugerem que a presença de bactérias indígenas aos reservatórios estaria limitada a um intervalo de temperatura entre 80 e 90°C (Magot *et al.*,

2000).

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 de distribuição geográfica bastante ampla, e que diversos destes organismos têm potencial para transformar compostos orgânicos e inorgânicos, atuando na interface óleo-água dos reservatórios (Coates *et al.*, 1997; Korda *et al.*, 1997). Ao longo das ultimas duas décadas, uma ampla variedade de micro-organismos de reservatórios de petróleo tem sido isolada e/ou identificada, incluindo grupos aeróbios (*Bacillus* sp., *Halomonas* sp., *Acinetobacter* sp.) (Sette *et al.*, 2007; Orphan *et al.*, 2000), anaeróbios facultativos (*Deferribacter*, *Flexistipes*) (Greene *et al.*, 1997), redutores de sulfato (*Desulfovibrio*, *Desulfobacter*) (Kleikemper *et al.*, 2002), metanogênicos (*Methanothermococcus*, *Methanocalculus* sp.) (Takai *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2003) e fermentativos.

Os efeitos da biodegradação ocasionam alterações em algumas propriedades dos óleos presentes nos reservatórios, promovendo um aumento da densidade, acidez, viscosidade e do conteúdo de enxofre e de metais, comprometendo sua qualidade. Estas alterações na qualidade acarretam consequências negativas para produção, através da redução da velocidade de vazão, e refino do petróleo, tornando-se um desafio para sua exploração em todo o mundo (Grishchenkov *et al.*, 2000; Head *et al.*, 2003).

Estudos sobre a degradação ou biotransformação de componentes específicos do óleo por comunidades microbianas são extensos (Leahy & Colwell, 1990; Bressler & Fedorak, 2001). Dados obtidos a partir da caracterização destas comunidades podem ser utilizados como parâmetros para a prospecção e avaliação da qualidade do óleo em novos reservatórios, caracterização do potencial de biodeterioração em poços de produção e depósitos de armazenamento, ou ainda, no monitoramento de processos de biorremediação em casos de derramamentos acidentais de petróleo.

Os processos de biodegradação podem ocorrer tanto sob condições anaeróbias como aeróbias. No entanto, muitos pesquisadores, com base na identificação de diversos micro-organismos anaeróbicos, na descoberta de produtos de biodegradação anaeróbica, e no fato de que as condições aeróbicas nestes ambientes são improváveis, defendem a hipótese de que o processo de degradação em reservatórios de petróleo ocorra pela via

anaeróbia (Aitken *et al.*, 2004). Estudos sobre os metabólitos gerados a partir da biotransformação de hidrocarbonetos aromáticos como naftaleno e fenantreno, identificaram produtos tais como ácido 2-naftóico, e determinaram rotas metabólicas utilizadas por bactérias redutoras de sulfato compatíveis com as condições fisiológicas dos poços de petróleo, corroborando a hipótese de que a microbiota anaeróbia seria a única responsável pela biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo *in situ* (Anmweiller *et al.*, 2002).

Entretanto, geralmente, uma só espécie de micro-organismo não é capaz de promover a degradação completa da mistura de hidrocarbonetos, sendo necessária a atuação de consórcios microbianos munidos de uma ampla variedade enzimática capaz de agir sobre os compostos aromáticos (por exemplo, benzeno, tolueno, naftaleno) (Okerentungba & Ezeronye, 2003; Kanaly & Harayama, 2000). Nesta situação, os produtos de uma biotransformação podem servir como fonte de carbono e energia para outras espécies da comunidade (Röling *et al.*, 2003).

Entre os micro-organismos anaeróbios existem dois grupos principais: os anaeróbios facultativos (redutores de ferro, manganês e nitrogênio) e anaeróbios estritos (redutores de sulfato). 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).

Um dos primeiros estudos microbiológicos em reservatórios de petróleo de águas profundas resultou no isolamento de uma bactéria sulfato-redutora, a partir de amostras de águas de injeção (Bastin, 1926). Águas de injeção podem carrear micro-organismos não indígenas aos reservatórios, tanto aeróbios quanto anaeróbios. Koreblun e colaboradores (2010) verificaram a diversidade bacteriana de águas de formação em três plataformas brasileiras, presentes na Bacia de Campos, demonstrando que mesmo ocorrendo o tratamento para evitar contaminação do reservatório, existem grupos que persistem e continuam seu crescimento, como bactérias do gênero *Marinobacter* e *Achromobacter*. Lysnes e colaboradores (2009) descreveram que águas de injeção ricas em sulfato podem levar ao aumento no número de bactérias sulfato-redutoras no reservatório.

2.3. Metagenômica

Técnicas baseadas em cultivo têm sido tradicionalmente as ferramentas primárias usadas para o estudo da microbiologia de diferentes ambientes (Chandler *et al.*, 1997). Estas metodologias, apesar de serem extremamente importantes para o entendimento do potencial fisiológico de micro-organismos isolados, não fornecem necessariamente informação abrangente sobre a diversidade e abundância de comunidades microbianas (van Hamme *et al.*, 2003). Embora as técnicas de cultivo tenham sido aprimoradas, sabe-se que apenas uma pequena fração da diversidade microbiana na natureza, em torno de 1 a 10%, pode ser hoje cultivada em laboratório (Ward *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1995).

Metodologias moleculares desenvolvidas nas últimas décadas (extração de ácidos nucléicos, amplificação por PCR, clonagem e seqüenciamento de DNA) têm sido otimizadas e adaptadas para superar as limitações impostas pela abordagem clássica de estudo de populações microbianas, evitando o isolamento e cultivo dos micro-organismos. A utilização destas metodologias vem permitindo uma avaliação mais precisa da diversidade microbiana no ambiente e a descoberta de novos grupos de organismos, nunca antes cultivados (Amann *et al.* 1995; Hugenholtz *et al.*, 1998). O uso destas metodologias associado à estratégia de bibliotecas metagenômicas nos permite ter acesso ao potencial metabólico destes novos organismos. Esta estratégia consiste na utilização de vetores do tipo BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*), cosmídeos ou foscídeos para a clonagem de fragmentos grandes de DNA (40 a 100 kb) obtidos diretamente da comunidade microbiana (*metagenoma*) de ambientes como solo, sedimento ou lodo, e análise das bibliotecas resultantes em busca da expressão da atividade biológica de interesse na linhagem hospedeira de *Escherichia coli* (Handelsman *et al.*, 1998; Rondon *et al.*, 1999; Rondon *et al.*, 2000). (Figura 2)

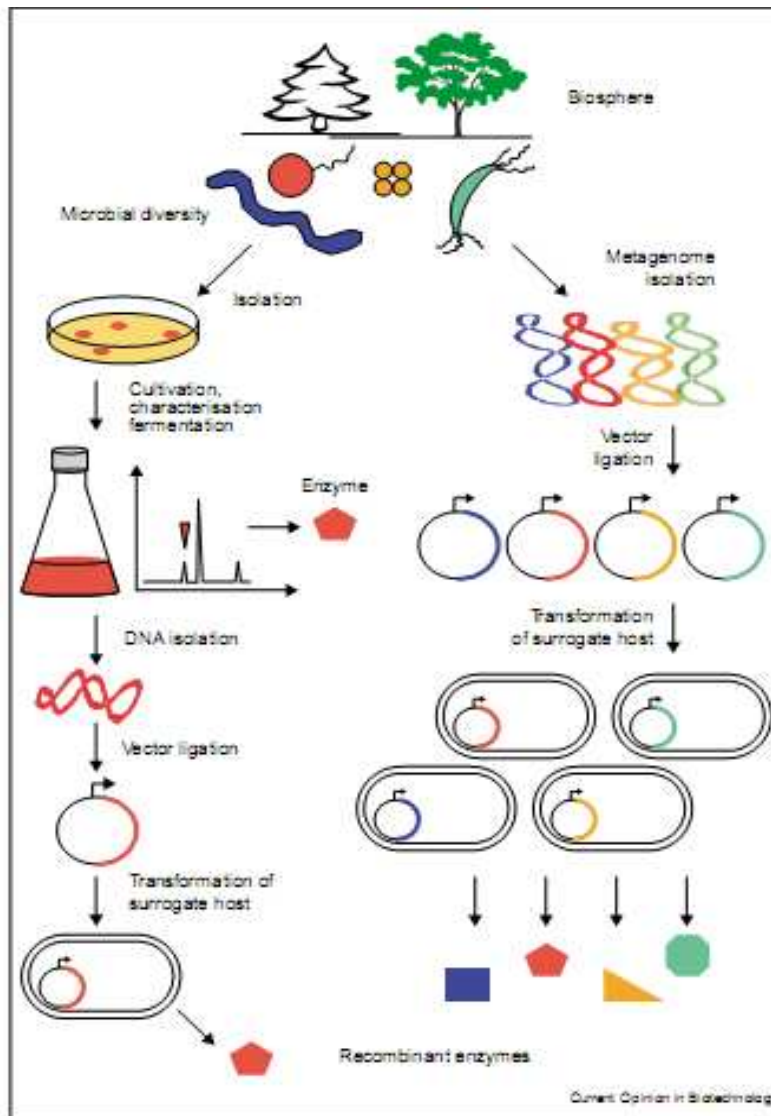


Figura 2. Comparação esquemática das estratégias de cultivo (esquerda) e metagenoma (direita) para obtenção de novos compostos com atividade biológica. Com a estratégia de cultivo, apenas uma fração da diversidade microbiana existente pode ser obtida em cultura pura. Os micro-organismos não cultivados só podem ser acessados através de seus genomas. Assim, com a estratégia de metagenoma, os genomas de todos os micro-organismos em um dado habitat são isolados e clonados em hospedeiros para subsequente seleção e expressão do composto de interesse. **Fonte:** Lorenz *et al.* (2002).

Embora existam outras espécies de hospedeiros empregados em estudos com abordagem metagenômica, *Escherichia coli* é a que vem sendo mais utilizada. No entanto outras espécies como *Streptomyces lividans* e *Pseudomonas putida* vêm sendo

desenvolvidas como hospedeiros alternativos. As técnicas envolvendo metagenômica, por um lado, possibilita a elucidação de genomas de micro-organismos não cultivados para uma melhor compreensão sobre ecologia microbiana. Por outro lado, essa mesma técnica tem sido conduzida pelo aumento da demanda biotecnológica por novas enzimas e biomoléculas (Schmeisser *et al.*, 2007).

Os nichos microbianos investigados são diversos, englobando desde solos de margens de rios (Henne *et al.*, 1999), ambientes marinhos (Hårdeman e Sjöling, 2007) a ambientes extremos, tais como águas profundas (Beja *et al.*, 2000), sedimentos e lagos do continente Antártico (Moreira *et al.*, 2006), reservatórios de petróleo (Vasconcellos *et al.*, 2010; Li & Hendry, 2008).

No caso de comunidades microbianas biodegradadoras, as bibliotecas metagenômicas constituem-se em uma ferramenta que abre a perspectiva de descoberta de novas vias catabólicas a partir de membros da microbiota, principalmente de micro-organismos fastidiosos ou ainda não-cultivados, ou mesmo daqueles que vivem em consórcios e não podem ser recuperados isoladamente. Ainda, a partir de uma biblioteca de metagenoma, uma variedade maior de atividades catabólicas pode ser obtida simultaneamente, em comparação ao método tradicional baseado em isolamento, cultivo e triagem de linhagens puras de microrganismos.

Estudos de genes associados a vias de degradação de componentes do petróleo têm se intensificado, sendo muitas vias catabólicas descritas por diversos autores, como aquelas para os compostos aromáticos tolueno, xileno e benzeno (Zylstra & Gibson, 1991; principais componentes da gasolina e alvo de grande interesse em função da contaminação acidental do ambiente.

A triagem das bibliotecas metagenômicas, com conseqüente seleção de genes de interesse, pode ser feita com base em similaridade de seqüência do inserto ou na expressão da atividade biológica (Lorenz *et al.*, 2002). Esta última estratégia, denominada como triagem funcional, oferece a vantagem de poder acessar seqüências gênicas ainda totalmente desconhecidas e de detectar apenas enzimas que estão ativas.

O método de triagem de bibliotecas metagenômicas baseado em seqüência é mais conservador, uma vez que os oligonucleotídeos necessários para identificar os genes-alvo, utilizando PCR ou métodos de hibridização, são desenhados com base em regiões

conservadas das seqüências de aminoácidos, de forma a garantir uma alta probabilidade de pareamento com seqüências gênicas desconhecidas presentes no ambiente. Esta estratégia é atraente, pois qualquer gene que apresente homologia com a seqüência de DNA utilizada será detectado, independente da sua expressão na célula hospedeira (Lorenz *et al.*, 2002).

A triagem funcional é mais direta e tem tido sucesso na descoberta de genes catabólicos (Galvão *et al.*, 2005). Genes que codificam para funções metabólicas importantes são freqüentemente pouco conservados, tornando difícil a comparação das seqüências dos clones com seqüências homólogas. Ainda, o catabolismo de poluentes específicos pode ser muitas vezes obtido por duas ou mais bactérias, cada espécie contribuindo com parte da via catabólica, como no caso de bifenilas policloradas (Abraham *et al.*, 2002). Portanto, a estratégia funcional de triagem de bibliotecas metagenômicas permite o estudo de consórcios de clones (combinação de múltiplos clones) em meio líquido, na busca da atividade de degradação desejada.

Ainda, é possível a combinação entre a triagem de genes funcionais de bibliotecas metagenômicas com a análise de seqüências de genes de RNA ribossomal 16S, permitindo-se estabelecer relações entre filogenia e função, elucidando assim a atuação dos componentes da microbiota no ambiente.

Estudos envolvendo a bioprospecção de bibliotecas metagenômicas geradas a partir de comunidades microbianas de amostras de petróleo podem contribuir para o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas diversas, tanto na indústria de petróleo como em processos biotecnológicos de biorremediação, incluindo, por exemplo:

- definição de conjuntos de genes biomarcadores com potencial para utilização como “indicadores de biodeterioração” de amostras de petróleo de poços ainda em estágio de perfuração ou reservatórios de armazenamento de longo prazo;
- aplicação de micro-organismos, enzimas ou outros produtos para a biorremediação de resíduos de processamento industrial e exploração;
- monitoramento de processos de biorremediação em derramamentos acidentais de petróleo;
- aplicação em biorrefino de petróleo, incluindo processos de remoção de

enxofre, nitrogênio e metais pesados.

Estes estudos podem revelar, ainda, importantes vias metabólicas microbianas, contribuindo para a compreensão da fisiologia de micro-organismos não-cultivados presentes no reservatório, e possibilitando a identificação de novos genes biocatalíticos e biossintéticos.

2.4. Substâncias Poliméricas Extracelulares

A grande maioria dos micro-organismos sobrevive e cresce como agregados celulares, sendo esta forma de crescimento e organização denominada como biofilme (Flemming *et al.*, 2000). Os biofilmes representam a forma mais comum de crescimento das células microbianas, tanto em ambientes naturais, como em artificiais. Geralmente encontram-se aderidos a uma superfície e são envolvidos por uma matriz polimérica extracelular (EPS) que ele mesmo produz, formando uma estrutura tridimensional, gelatinosa e altamente hidratada, que influencia propriedades físico-químicas e atividade destes agregados celulares (Flemming *et al.*, 2000; Sander & Sturman, 2002).

Gehr & Henry (1983) descreveram que materiais extracelulares são compostos que podem ser removidos dos micro-organismos, particularmente bactérias, sem que haja o rompimento das células, mantendo a viabilidade das mesmas. Esta definição leva à observação de que EPS não são estruturas essenciais à bactéria, e a não produção ou a extração destes exopolímeros não implica na perda do crescimento ou viabilidade celular.

Os EPS podem ser produzidos tanto por micro-organismos procariotos (arqueias e bactérias), como por eucariotos, como fungos e leveduras. Frequentemente, polissacarídeos são citados como os principais componentes dos EPS microbianos (Costerton *et al.*, 1981; 1987) e por esta razão, o termo exopolissacarídeos muitas vezes é utilizado como sinônimo de EPS. Entretanto esses biopolímeros também podem compreender uma grande variedade de proteínas, glicoproteínas, glicolípídeos e ácidos nucleicos (Flemming *et al.*, 2007; Sutherland, 2001), assim como substâncias húmicas. Ácidos urônicos são também descritos como componentes de polímeros extracelulares, sendo muito importantes para a manutenção da estrutura física dos biofilmes, através de interações eletrostáticas com cátions multivalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+}).

De acordo com sua composição específica, os EPS podem apresentar diferentes funções nas células, estando geralmente associados a mecanismos de nutrição ou defesa celular, ou seja, os microrganismos produzem tais substâncias como forma de sobreviverem às condições do meio em que se encontram. A produção, composição e propriedades dos EPS microbianos variam em resposta a fatores ambientais, tais como acesso a nutrientes e pHs variáveis. Os EPS podem contribuir para o ataque celular a hidrocarbonetos, promovendo a adesão microbiana às moléculas e subsequente solubilização das mesmas (Shreve et al., 1995).

Biossurfactantes ou bioemulsificantes são substâncias exopoliméricas (EPS) que podem ser produzidos por micro-organismos procariotos (Dominios *Bacteria* e *Archaea*) e eucariotos (algas, fungos). A formação de biofilmes está intrinsecamente associada à produção de bioemulsificantes no qual os EPS são usualmente produzidos durante a fase estacionária do crescimento microbiano, ou seja, quando a multiplicação celular é diminuída, mantendo-se a densidade celular estável. Em alguns casos, é proposto que a produção de exopolímeros é induzida por sinais moleculares, envolvidos no mecanismo denominado “quorum sensing”, ou comunicação intercelular, o qual emite sinais que promoveriam mudanças fisiológicas nas atividades das células, quando as mesmas atingissem uma determinada densidade populacional. Este mecanismo regulatório parece ser geral, ou seja, o micro-organismo somente produzirá emulsificantes quando houver aumento da densidade celular e conseqüente início da fase estacionária de crescimento (Brint & Ohman, 1995; Decho, 2000; Ron & Rosenberg, 2002).

2.5. Biossurfactantes

Surfactantes são compostos caracterizados pela capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de diferentes substâncias. Emulsificantes compõem uma subclasse de surfactantes, as quais estabilizam dispersões de substâncias com diferentes polaridades, como por exemplo, emulsões óleo-água (Ron & Rosenberg, 2001). São moléculas anfipáticas, apresentando uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica. A parte hidrofóbica é geralmente composta por longas cadeias de ácidos graxos, e a parte hidrofílica pode ser constituída por carboidratos, aminoácidos, fosfato, ácidos carboxílicos, peptídeos e álcoois (Mulligan, 2009; Ron & Rosenberg, 2002).

Os surfactantes se concentram em interfaces (sólido-líquido, líquido-líquido ou vapor-líquido). A interface é formada entre duas fases imiscíveis, sendo que a porção hidrofóbica do surfactante se volta para a superfície, enquanto que a porção hidrofílica está em contato com a solução (Mulligan, 2005).

Como já descrito, biossurfactantes são surfactantes produzidos por micro-organismos. A atividade biossurfactante pode ser determinada através de mudanças nas tensões interfaciais e superficiais de alguns “sistemas”, ou interfaces, como, por exemplo, água/óleo e ar/água e essas mudanças podem ser medidas com auxílio de tensiômetro (Desai & Banat, 1997). Devido à sua estrutura anfifílica, as moléculas dos biossurfactantes tendem a se aglomerar e formar pequenas estruturas como vesículas, lamelas ou micelas quando adicionados a esses sistemas e, deste modo, reduzem a tensão superficial até um nível crítico (Figura 3). Esta medida é conhecida como “concentração micelar crítica” (CMC) e é utilizada para definir a qualidade e eficiência do biossurfactante de acordo com suas propriedades como detergência, formação de espuma, emulsificação e dispersão. Esse processo dinâmico é baseado na habilidade dos biossurfactantes de reduzir a tensão superficial pelo rearranjo molecular, pelo qual ocorre o acúmulo na superfície de compostos insolúveis, influenciando as ligações de hidrogênio e outras interações hidrofóbico-hidrofílicas.

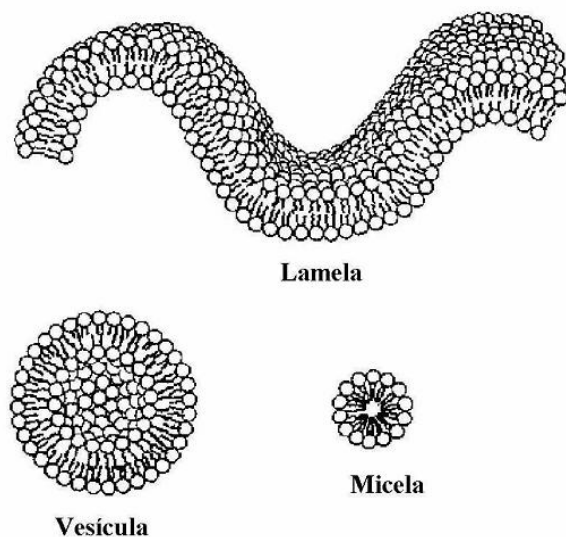


Figura 3: Esquemas representando as estruturas formadas por biossurfactantes quando em contato com interfaces (Fonte: Champion *et al.*, 1995).

Surfactantes considerados eficientes apresentam baixa concentração micelar crítica (ou seja, menos surfactante é necessário para reduzir a tensão superficial). Um surfactante ideal seria aquele que apresenta baixa concentração micelar crítica e tensão superficial com valores menores que 30 mN/m (Ashby *et al.*, 2008; Desai & Banat, 1997; Mulligan, 2005). As interações de surfactantes nas interfaces são objetos de muitos estudos. Essas reações não ocorrem somente em relação à porção hidrofóbica dessas moléculas, mas também com a parte hidrofílica, que pode apresentar carga elétrica, podendo ser aniônica, catiônica, anfotérica ou não-iônica (Neu, 1996).

No ano de 2000, a produção mundial de surfactantes totalizou entre 17 e 19 milhões de toneladas, com um crescimento previsto entre 3 a 4% por ano. Isso ocorre devido à crescente demanda em detergentes, setor que utiliza mais de 50% da produção de surfactantes. Entre os principais setores que utilizam surfactantes estão incluídos os detergentes para uso doméstico, produtos para uso pessoal (cosméticos, sabonetes, creme dentais), indústrias têxtil e petrolífera (Deleu *et al.*, 2004).

No entanto, não são somente surfactantes sintéticos que são comercializados. Nos Estados Unidos, um dos tipos mais importantes e estudados de biossurfactantes está no mercado através da empresa *Jeneil Biosurfactant* que é responsável pela venda de ramnolipídeos provenientes de *P. aeruginosa*, vendidos principalmente como fungicida agrícola ou como aditivo para atividades de biorremediação (Banat *et al.*, 2010).

Os biossurfactantes começaram a ganhar destaque e atrair a atenção em estudos como agentes degradadores de hidrocarbonetos no final da década de 1960. Suas aplicações têm sido amplamente disseminadas ao longo dos últimos 50 anos como uma boa alternativa para a substituição dos surfactantes sintéticos (Cameotra & Makkar, 2004). Eles apresentam algumas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, como por exemplo, são altamente biodegradáveis, possuem baixa toxicidade, são funcionais em extremos de temperatura, salinidade e pH e podem ser produzidos a partir de substratos economicamente viáveis, como resíduos de refinarias e óleos de soja e girassol, diminuindo assim o custo de produção. Apresentam também uma maior diversidade e disponibilidade em vista da quantidade de micro-organismos produtores (Muthusamy *et al.*, 2008; Mukherjee *et al.*, 2006; Cameotra & Makkar, 2010).

2.5.1. Tipos de biossurfactantes

Diferentes dos surfactantes sintéticos, que são caracterizados de acordo com o grupo polar, os biossurfactantes são caracterizados por sua composição química e sua origem microbiana (Gautam & Tyagi, 2006). Há vários tipos de biossurfactantes, cada um sendo produzido por um micro-organismo específico. São divididos em duas classes principais: os de baixo peso molecular que incluem os lipopeptídeos, glicolipídeos e proteínas; e os de alto peso molecular que incluem polissacarídeos, lipopolissacarídeos, ou lipoproteínas que são denominadas bioemulsan ou bioemulsificantes. O primeiro grupo inclui moléculas que podem eficientemente reduzir as tensões superficial e interfacial, enquanto que o último é composto por polímeros anfifílicos e polifílicos que usualmente apresentam maior eficiência para o estabelecimento de emulsões (óleo-água), mas não são tão eficientes na redução da tensão interfacial e superficial (Banat *et al.*, 2010).

As classes principais estão descritas abaixo e sumarizadas na Tabela 1.

A) Glicolipídeos: moléculas de baixo peso molecular, compostos de carboidratos como, glicose, manose, galactose e ramnose, ligados a uma longa cadeia de ácidos alifáticos. Dentre os glicolipídeos, os tipos mais estudados são os ramnolipídeos, trealolipídeos e soforolipídeos.

Ramnolipídeos: mais descritos na literatura como sendo produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas*. Possuem moléculas de ramnose ligadas a moléculas de ácido hidroxidecanóico (Gautam & Tyagi, 2006). Mais de sete homólogos foram identificados e são os mais estudados em relação à remoção de hidrocarbonetos (Abalos *et al.*, 2001; Mulligan, 2009).

Trealolipídeos: possuem ácido micólico em sua composição ligado a moléculas de trealose e variam de tamanho e estrutura de acordo com os micro-organismos que os produzem. Estão relacionados com vários micro-organismos como dos gêneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* e *Arthrobacter* (Rahman & Gapke, 2008).

Soforolipídeos: são produzidos principalmente por leveduras das espécies *Torulopsis bombicola*, *T. petrophilum* e *Candida bombicola*. Consistem do carboidrato soforose ligado a uma longa cadeia de ácidos graxos. Embora os soforolipídeos possam

reduzir a tensão interfacial e superficial, não são efetivos como agentes emulsificantes (Amaral *et al.*, 2008).

Manosileritrol lipídeo (MEL): produzido por fungos como *Ustilago maydis*, *Candida antarctica* e *Schizonella melanogramma*. A molécula consiste de um dissacarídeo formado por manose e eritrol, à qual estão ligados ácidos graxos de diferentes comprimentos (Hewald *et al.*, 2005).

B) Lipopeptídeos: Estão incluídos alguns lipopeptídeos cíclicos, como surfactina, produzida por bactérias do gênero *Bacillus subtilis*, gramicidina, produzida por *Bacillus brevis*, e polimixinas, produzidas por *Bacillus polymyxa*.

Surfactinas: são os biossurfactantes mais descritos na literatura com ótima atividade surfactante, sendo produzidos por bactérias da espécie *Bacillus subtilis*. Contém sete aminoácidos ligados a grupos hidroxilas ou carboxilas. As aplicações da surfactina também são extensamente estudadas, como efetivos em processos de biorremediação e aplicações medicinais.

Gramicidinas e polimixinas: a gramicidina produzida por *Bacillus brevis*, chamada de gramicidina S é um decapeptídeo e em solução existe na forma de um anel rígido com duas moléculas de ornitina. Polimixina se constitui em um decapeptídeo, pelo qual 3 a 10 aminoácidos formam um peptídeo cíclico e uma cadeia de ácidos graxos está interligada (Rosenberg & Ron, 1999).

Lichenisinas: são produzidas por *Bacillus licheniformis* e semelhantes em estrutura e propriedades físico-químicas às surfactinas.

C) Ácidos Graxos e Fosfolipídeos: Ácidos graxos derivados de alcanos apresentam capacidade surfactante. Alguns fungos e bactérias sintetizam ácidos graxos quando crescem em meio com n-alcanos como substrato. Fosfolipídeos, por sua vez, são em sua maioria componentes de membranas em micro-organismos. Do mesmo modo, quando alguns micro-organismos crescem na presença de alcanos, o nível de fosfolipídios aumenta. *Acinetobacter* sp. linhagem HO1-N e *Rhodococcus erythropolis* são descritos como produtores de fosfolipídeos com capacidade surfactante (Muthusamy *et al.*, 2008; Rosenberg & Ron, 1999).

D) Biossurfactantes poliméricos: São moléculas mais complexas e com maior peso molecular (Sullivan, 1998, Banat *et al.*, 2010). Uma ampla variedade de micro-organismos inclusive grupos do Domínio Archaea, podem produzir esses polímeros de alto peso molecular. Os mais estudados são emulsan, liposan e outros complexos de polissacarídeos-proteínas. Emulsan é um lipossacarídeo isolado de *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, com capacidade emulsificante. O bioemulsificante de *Acinetobacter radioresistens* KA53, é denominado alasan, um complexo de polissacarídeo e proteína. Liposan é um emulsificante extracelular produzido por *Candida lipolytica*, composto por 83% de carboidrato e 17% de proteína (Lang *et al.*, 2002; Rosenberg & Ron, 1999).

A maioria dos micro-organismos descritos como produtores de biossurfactantes é aeróbia. No entanto, *Bacillus licheniformis* tem sido descrito em processos de recuperação de petróleo na ausência de oxigênio, produzindo o lipopeptídeo denominado lichenisina (Mulligan, 2005; McInerney *et al.*, 2007). *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp já foram descritos produzindo biossurfactante em condições de anaerobiose facultativa (Grishchenkov *et al.*, 2000).

Tabela 1. Principais tipos de biossurfactantes e micro-organismos produtores (Fonte: Van Hamme *et al.*, 2006; Desai & Banat, 1997).

BIOSURFACTANTE	MICRO-ORGANISMO
Glicolipídeos	
Ramnolipídeo	<i>Pseudomonas</i> sp./ <i>P. aeruginosa</i> / <i>P. putida</i>
Trealolipídeo	<i>Rhodococcus</i> sp./ <i>Rhodococcus erithropolis</i> <i>Arthobacter</i> sp.
Soforolipídeo	<i>Candida lipolytica</i> / <i>Torulopsis bombicola</i>
Manosileritrol Lipídeo (MEL)	<i>Ustilago maydis</i> / <i>Candida antarctica</i> <i>Schizonella melanogramma</i> ,
Lipopeptídeos	
Polimixina	<i>Bacillus polymixa</i>
Gramicidina S	<i>Bacillus brevis</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>Bacillus pumilus</i>

BIOSSURFACTANTE	MICRO-ORGANISMO
Ácidos Graxos e Fosfolipídeos	<i>Nocardia erythropolis</i> / <i>Arthrobacter parafineus</i> <i>Corynebacterium lepus</i> / <i>Penicillium spiculisporum</i> <i>Acinetobacter</i> sp. / <i>Rhodococcus erythropolis</i>
Moléculas de Alto Peso	
Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>

2.5.2. Aplicações

Os diferentes grupos de biossurfactantes descritos acima podem apresentar aplicações diversas, as quais incluem processos de biorremediação de ambientes contaminados, recuperação de petróleo, utilização em indústrias de cosméticos e farmacêuticos, e até mesmo como agentes antimicrobianos.

MEOR (*Microbial Enhanced Oil Recovery*)

Alguns fatores como a baixa permeabilidade de alguns reservatórios ou alta viscosidade de alguns óleos podem resultar em uma pobre recuperação de petróleo. O processo de recuperação terciária de petróleo (MEOR - *Microbial Enhanced Oil Recovery*) consiste na utilização de micro-organismos, indígenas ou injetados, capazes de sintetizar moléculas que auxiliem na recuperação do óleo, como metano, dióxido de carbono, polissacarídeos e biossurfactantes (Singh *et al.*, 2007). Esses compostos podem reduzir a viscosidade dos óleos, aumentar o fluxo através dos dutos e estabilizar emulsões óleo e água (Batista *et al.*, 2006).

De acordo com Bordoloi e Konwar (2008), existem três principais estratégias adotadas para o uso de biossurfactantes neste processo:

(1) Injeção de micro-organismos produtores dentro do reservatório, com conseqüente multiplicação destes *in situ* nas rochas do reservatório;

(2) Injeção de nutrientes dentro do reservatório estimulando o crescimento de micro-organismos indígenas produtores de biossurfactantes;

(3) Produção de biossurfactantes *ex situ* para injeção dentro do reservatório.

Alguns trabalhos mencionam a aplicação de biossurfactantes em processos de MEOR (Wang *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2008). No trabalho de Dastgheib e sua equipe (2008), foi avaliado um tipo de bioemulsificante proveniente de uma linhagem halotermotolerante de *Bacillus* sp. para aplicação *in situ*. Do mesmo modo, McInerney e colaboradores (2007) utilizaram bioemulsificantes testados em laboratório para aplicação *in situ*.

Biorremediação

A biorremediação implica na aceleração dos processos naturais de biodegradação de compostos poluentes em ambientes contaminados. Em situações em que os poluentes apresentam baixa solubilidade em água, a adição de emulsificantes e surfactantes aumenta a taxa de biodegradação por promover uma maior biodisponibilidade desses poluentes (Calvo *et al.*, 2009).

Existem muitas substâncias que são nocivas ao meio ambiente, tornando-se fontes poluidoras. Na categoria dos resíduos químicos orgânicos estão incluídos os pesticidas, solventes e óleos. Metais pesados como chumbo (Pb), cádmio (Cd), mercúrio (Hg), zinco (Zn) e ferro (Fe) também são poluentes e geralmente estão associados a atividades antrópicas, como a eliminação de resíduos em aterros sanitários, geração de resíduos químicos e lodo.

Os hidrocarbonetos de petróleo e de outros óleos pesados quando em contato com o meio ambiente se aderem fortemente a partículas de solo. Dentre os hidrocarbonetos, a classe dos HPA (Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos) são os maiores contaminantes (Mulligan, 2005; Bordoloi & Konwar, 2009). A biodegradação de hidrocarbonetos torna-se mais eficiente com a adição de biossurfactantes, os quais podem acelerar a biorremediação de solos e águas contaminadas por petróleo através da diminuição da tensão superficial óleo – água, aumentando a solubilidade e assim a mobilidade de compostos hidrofóbicos, tais como os hidrocarbonetos (Tango & Islam, 2002).

Calvo e equipe (2009) mencionam que a degradação associada ao emprego de surfactantes torna-se eficiente de acordo com alguns fatores, como por exemplo, a taxa

de nutrientes disponíveis no solo. Estes nutrientes (nas formas de nitrogênio e fósforo) promovem o crescimento e conseqüentemente, o aumento da população indígena do solo contaminado, aumentando a taxa de degradação.

Vários trabalhos têm descrito o emprego de biossurfactantes na degradação de hidrocarbonetos, principalmente utilizando ramnolipídeos (Zhang e Miller, 1992; Rahman *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2008) e surfactina (Mulligan *et al.*, 1999; Cubitto *et al.*, 2004; Whang *et al.*, 2008).

Além de atuar em processos de biodegradação de hidrocarbonetos, alguns biossurfactantes são capazes de remover metais pesados, como cádmio, cobre, chumbo e zinco em solos contaminados (Mulligan, 2005). Ao contrário dos hidrocarbonetos, os metais pesados não são degradáveis e apresentam alta toxicidade, mesmo em quantidades pequenas, representando uma ameaça para a saúde e meio ambiente.

Mulligan e colaboradores (2001) analisaram a utilização de três diferentes biossurfactantes (surfactina, ramnolipídeos e soforolipídeos) na remoção de metais em sedimentos contaminados com cobre e zinco, onde os glicolipídeos (ramnolipídeos e soforolipídeos) apresentaram-se como mais efetivos.

Outro trabalho menciona a utilização de ramnolipídeos para a remoção de cádmio em solos, com a suposta formação de um complexo entre o metal e o biossurfactante (Tan *et al.*, 1994).

Indústria

Os biossurfactantes também podem ser amplamente utilizados em indústrias de alimentos e cosméticos como agentes emulsificantes, espumantes e umectantes (Muthusamy *et al.*, 2008). Na indústria de cosméticos são importantes aditivos nas preparações de muitos produtos como repelentes, cremes, desodorantes, antisépticos, shampoos e condicionadores (Kosaric, 1992). Ramnolipídeos, especificamente, são muito utilizados em cosméticos por apresentarem compatibilidade com a pele e não provocar irritações ou reações alérgicas (Benincasa *et al.*, 2004).

Na indústria de alimentos, os emulsificantes têm uma importante função na formação da consistência e textura de muitos produtos, como o sorvete, por exemplo. Em

casos de biossurfactantes que são funcionais em pH ácidos, é interessante sua utilização em alimentos que contenham ácido cítrico ou ascórbico. Outra função interessante é que atuam como agentes antiadesivos impedindo a formação de biofilmes, já que os biofilmes bacterianos em indústrias de alimentos representam potenciais focos de contaminação, que podem levar à deterioração dos alimentos (Nitschke e Costa, 2007).

Agentes antimicrobianos

Já existem trabalhos que descrevem o emprego de alguns biossurfactantes como agentes antimicrobianos e antivirais, assim como moléculas imunomoduladoras (Cameotra & Makkar, 2004).

Singh e Cameotra (2004) relataram a utilização de surfactina como agente antimicrobiano, a qual demonstrou atividade contra muitos vírus, como o herpesvírus (HSV-1 e HSV-2) e o vírus causador da estomatite. Também pode ser verificada a inibição de biofilmes formados por *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* em cateteres uretrais. Lipopeptídeos bacterianos constituem também potentes adjuvantes imunológicos quando adicionados com antígenos convencionais em testes sorológicos para detecção de drogas, anticorpos, toxinas e outras substâncias.

Fernandes e equipe (2007) demonstraram a atividade antimicrobiana do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* (surfactina) contra *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium* sp.

No trabalho de Abalos e colaboradores (2001) foram descritas propriedades antifúngicas de ramnolipídeos sobre *Aspergillus niger* e outros fungos testados *in vitro*.

A função biocida dos ramnolipídeos também foi investigada no trabalho de Stanghellini e Miller (1997), onde foi observada a ruptura de zoósporos de fungos patogênicos como *Phytophthora capsici* e *Pythium aphanidermatum*, associados com doenças foliares em inúmeras culturas.

2.6. Genes envolvidos na produção de EPS

Estudos genéticos de micro-organismos produtores de EPS são importantes ferramentas para a descoberta de novos genes ou grupos de genes envolvidos na produção de polímeros extracelulares (Mukherjee *et al.*, 2006).

De acordo com a literatura, muitos grupos de genes vêm sendo identificados e caracterizados em bactérias gram-positivas e gram-negativas. Genes que estão envolvidos na regulação, na síntese de nucleotídeos e de enzimas, polimerização e transporte de substâncias são encontrados dentre os genes ligados com a produção de EPS (Wang *et al.*, 2003).

Em ambientes naturais, os EPS podem fornecer proteção à célula bacteriana contra a dessecação e ataque de bacteriófagos. Um estudo realizado por Ford & Fitzgerald, (2003) demonstrou que genes plasmidiais de *Lactococcus lactis* subsp. *cremori* H02, codificavam um tipo de EPS que interferia na adsorção de bacteriófagos a receptores da superfície celular.

Wang *et al.* (2003) investigaram um conjunto de genes atuando na produção de EPS em *Streptomyces* sp. linhagem 139 A. Neste trabalho, os pesquisadores identificaram e caracterizaram um grupo de genes com atividade anti-reumática *in vivo*, consistindo de 22 ORFs localizadas em uma região cromossomal de 65 kb.

Stingelle *et al.* (1996) realizaram a caracterização e identificação de genes envolvidos na produção de EPS em *Streptococcus thermophilus* linhagem Sfi6, uma bactéria encontrada em alimentos. Através de análises de seqüências, os pesquisadores puderam constatar uma região de 14,52 kb englobando 13 genes denominados de *eps A* a *eps M*, responsáveis pela síntese de EPS e sua secreção.

Segundo Desai & Basat (1997), um conjunto de genes denominado *rhIAB*, encontrado em *Pseudomonas aeruginosa*, está envolvido com a síntese de ramnolipídeos, um EPS da classe dos glicolipídeos. Estes genes são responsáveis pela síntese de uma proteína regulatória, a Rh1R e da enzima raminosil-transferase, ambas essenciais para a formação do ramnolipídeo. A etapa final da biossíntese do ramnolipídeo é “catalisada” pelos genes *rhIAB* codificando a raminosiltransferase. Oschner e colaboradores (1995) relataram a produção de ramnolipídeo também em hospedeiros

heterólogos, como algumas linhagens de *Pseudomonas* e *Escherichia coli* DH5-alfa.

Outro tipo de EPS, os lipopeptídeos, também vem sendo estudado geneticamente. *Bacillus subtilis* produz um lipopeptídeo cíclico denominado surfactina, o qual tem sido relatado como um dos biossurfactantes mais ativos já descritos (Ron & Rosenberg, 2001). Os estudos genéticos da produção de biosurfactina sugerem que três genes cromossomais estão envolvidos: *sfp*, *srfA* e *comA*. Ensaio realizados demonstraram através de análises genéticas que *srfA* é um grande operon responsável por codificar um tipo de surfactina multifuncional (Desai & Basat, 1997; Sullivan 1998).

Os biossurfactantes poliméricos de alto peso molecular são mais complexos do que os de baixo peso molecular, como os lipopeptídeos e os ramnolipídeos. A síntese desses heteropolissacarídeos requer um grande número de genes e sua organização genética torna-se mais complexa do que aquela dos outros tipos. O bioemulsificante desta categoria mais bem estudado é um tipo produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* BD4. Os genes responsáveis pela produção deste estão organizados em um conjunto de genes com tamanho em torno de 60 kb (Ron & Rosenberg, 2001).

Hewald e colaboradores (2005) identificaram dois genes, *emt1* e *cyp1*, essenciais para a produção de um glicolipídeo produzido pelo fungo dimórfico *Ustilago maydis*. Este fungo basidiomiceto produz um tipo de glicolipídeo denominado manosileritritol lipídeo (MEL).

Estudos genéticos que envolvem a produção de surfactantes ou emulsificantes ainda não são tão extensos, e dentre estes os biossurfactantes mais bem descritos são os ramnolipídeos e a surfactina. No entanto, esses estudos envolvendo genes produtores são relevantes não apenas por possibilitar a descoberta de novas vias biossintéticas e novos tipos, mas também porque podem permitir o aperfeiçoamento na manipulação de espécies já descritas, e melhorar o desenvolvimento de linhagens mutantes hiperprodutoras, principalmente para sua aplicação (Calvo *et al.*, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Realizar a prospecção de genes envolvidos na síntese de biossurfactantes em microbiota recuperada de reservatórios de petróleo utilizando uma abordagem metagenômica.

3.2. Objetivos Específicos

A presente proposta tem como objetivos específicos:

- ✓ Construção de bibliotecas metagenômicas utilizando DNA total recuperado de consórcios microbianos aeróbios e anaeróbios enriquecidos a partir de amostras de petróleo biodegradado provenientes de reservatórios brasileiros;
- ✓ Ensaios de triagem de genes envolvidos na síntese de biossurfactantes por PCR;
- ✓ Ensaios de triagem funcional rápida para a detecção da atividade biossurfactante dos clones sobre compostos hidrofóbicos e petróleo bruto;
- ✓ Caracterização da composição dos EPS produzidos pelos clones.

4. ESTRUTURA

Esta dissertação foi dividida em dois capítulos. O **Capítulo 1** é constituído do artigo publicado no periódico internacional Organic Geochemistry intitulado “*Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs*”. Neste artigo estão descritos a realização de enriquecimentos microbianos aeróbios e anaeróbios, a partir de amostras de petróleo provenientes do poço GMR 75 da Bacia Potiguar, as etapas de extração de DNA de alto peso, a construção das bibliotecas metagenômicas e as análises da diversidade filogenética dos enriquecimentos.

O **capítulo 2** trata dos testes de triagem das bibliotecas, por atividade biológica e por similaridade de seqüência, e dos ensaios de caracterização dos biossurfactantes produzidos, incluindo as análises colorimétricas, testes de tensiometria e ensaios emulsificantes.

Vasconcellos, S.P.; Angolini, C.F.F.; Garcia, I.N.S.; Dellagnezze, B.M.; Canedo, C.C.; Marsaioli, A.J.; Neto, E.V.S.; Oliveira, V.M. (2010) *Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs*. **Organic Geochemistry**, **41**, 675-681.



Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs

Suzan Pantaroto de Vasconcellos^a, Célio Fernando Figueiredo Angolini^b, Isabel Natalia Sierra García^a, Bruna Martins Dellagnezze^a, Cynthia Canedo da Silva^a, Anita Jocelyne Marsaioli^b, Eugenio Vaz dos Santos Neto^c, Valéria Maia de Oliveira^{a,*}

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

^b Chemistry Institute, Campinas University – UNICAMP, CP 6154, CEP 13083-970 Campinas, SP, Brazil

^c PETROBRAS R&D Center, Cidade Universitária, Quadra 7, Rio de Janeiro, RJ 21949-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 September 2009

Received in revised form 19 March 2010

Accepted 30 March 2010

Available online 1 April 2010

ABSTRACT

Metagenomics has been successfully applied to isolate novel biocatalysts from diverse environments and functional screening has been used as the primary technique to identify clones carrying the desired traits. This work aimed at the construction and screening of a metagenomic library as a source of potential hydrocarbon biodegraders. A library of 31000 clones was obtained from aerobic and anaerobic enrichments generated using a biodegraded petroleum sample collected at the Potiguar Basin in Brazil as an inoculum. A total of 5000 clones were randomly selected for high throughput screening of hexadecane biodegradation, revealing 72 positive hits. These were further evaluated using gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS), outstanding hexadecane biodegradation ability (>70%) being detected in five clones.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In the last few decades, the use of molecular biology methods has drastically changed our perspective on microbial diversity in nature, revealing that only a small fraction of microorganisms, from 0.001% to 15% depending on the complexity of the environment under study, can be recovered using cultivation techniques (Amann et al., 1995; Torsvik and Vreås, 2002). In this context, although diverse bacteria capable of degrading petroleum hydrocarbons have been isolated and characterized, the vast majority of hydrocarbon-degrading bacteria, including anaerobes, probably remain undiscovered (Harayama et al., 2004).

The major motivation of all researchers who study biodegradation is undoubtedly the search for versatile microorganisms capable of efficiently degrading a wide variety of pollutants at low operational cost. It has been demonstrated, however, that some hydrocarbon-derived compounds are unusually recalcitrant, meaning that they are not metabolized by microorganisms or are transformed into metabolites that can accumulate in the environment or are as toxic as the parent compound (Esteve-Núñez et al., 2001). Furthermore, the degradation pathways of many pollutants remain unknown or are poorly characterized due to re-isolation of

the same species when traditional cultivation methods are used to recover pollutant-degrading microorganisms.

The study and exploration of genomes of the “uncultured majority” has become possible through metagenomics, a culture-independent molecular biology-based method that allows one to explore the metabolic potential of uncultivated species by cloning large DNA fragments isolated directly from the environment (Galvão et al., 2005; Suenaga et al., 2007).

Considering that the biocatalytic potential of only 1–2% of the microorganisms in the world has been evaluated (Gomes and Steiner, 2004), metagenomic studies may offer a valuable tool for the exploration of untapped microbial diversity. Recent studies conducted by screening metagenomic libraries from diverse environmental samples have already shown the huge biocatalytic potential of diverse prokaryotes (Ferrer et al., 2005; Solbak et al., 2005).

The use of metagenomics to gain access to the poorly understood petroleum reservoir environment is innovative and may reveal new enzymes (biocatalysts) of interest for biotechnological processes such as bioremediation and microbial enhancement oil recovery (MEOR).

Consequently, the present study was aimed at the construction and screening of a metagenomic fosmid library from petroleum microbial enrichments to identify efficient hydrocarbon biodegraders.

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

2. Materials and methods

2.1. Sampling and geological settings

Oil samples were obtained in July 2008 from one production well at the onshore Potiguar Basin (Rio Grande do Norte, Brazil) with logistic support from CENPES/Petrobras. The sample, GMR75, used as an inoculum for the microbial enrichments, was classified as moderately biodegraded, with a biodegradation rank of 4–5 according to the Peters and Moldowan (1993) scale (Fig. 1). It was collected from a reservoir with an in situ temperature of 42.2 °C and 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 Potiguar Basin is located at the Brazilian equatorial margin, covering an area of about 119,295 km², with 33,200 km² (27.8%) classified as onshore and 86,095 km² as offshore at a water depth up to 3000 m. The basin produces an average of 77,000 barrels of petroleum per day and constitutes the third largest Brazilian petroleum producer (Lopes et al., 1999 and references therein).

2.2. Microbial enrichments

Sample GMR75 was first homogenized in a water bath at 50 °C. For anaerobic enrichments, the cultures were grown in Schott bottles (1 l) containing 500 ml Widdel B mineral medium (Widdel et al., 2006) supplemented with *n*-hexadecane or a non-biodegraded oil sample, named P1, as carbon source. P1 oil was described previously as a non-biodegraded sample from the Campos Basin (Rio de Janeiro, Brazil; Vasconcellos et al., 2009). Prior to inoculation in Widdel B mineral medium, P1 was autoclaved (30 min at 121 °C and 1 atm) and the *n*-hexadecane was sterilized by filtration through a 0.22 µm membrane (Millipore). Milled and autoclaved shale (10 g) was added to the culture medium (250 ml in Schott bottles) as a physical support for the improvement of microbial growth, in an attempt to simulate the conditions in the petroleum reservoirs. Trace elements (Widdel et al., 2006) were also added to the medium and the whole system was purged by N₂ flow and

autoclaved for 20 min at 1 atm. Subsequently, the N₂ atmosphere was exchanged for N₂/CO₂ (70:30) and Na₂CO₃ (5 mM, 10%) and vitamin solution (5 ml) were added (Zinder et al., 1984). Finally, a cysteine–HCl solution (2 mM) was added (1%, v/v) as a final electron acceptor. Hexadecane or non-biodegraded oil (P1) was applied as a substrate (5 ml) for the recovery of microbiota in the biodegraded oil (GMR75) used as an inoculum (50 ml). The anaerobic enrichments were developed in four replicates, incubated at 55 °C for 120 days and monitored for cell density with turbidimetric analysis (MacFarland scale) and for sulfate reduction according to Kolmert et al. (2000). This standard turbidimetric method is based on the precipitation of sulfate ions in the medium with BaCl₂, affording BaSO₄.

Bushnell Haas (BH) mineral medium (Eriksson et al., 2000; Sette et al., 2007) was used for the aerobic enrichments. The pH of the medium was adjusted to 7.0 and 200 ml aliquots were distributed into Schott bottles (1 l). Shale was added (10 g) and the bottles were autoclaved at 1 atm for 20 min. After sterilization, vitamin solution (Zinder et al., 1984) and 1 ml of hexadecane (0.5% v/v) were added to the medium, followed by inoculation with 10 ml of GMR75 oil (5% v/v) diluted in Tween 80 (1:1; Sette et al., 2007). The enrichments were developed in five replicates and incubated on an orbital shaker (100 rpm) for 30 days. Microbial growth was monitored for cell density via turbidimetric analysis (MacFarland scale).

2.3. DNA extraction

Community DNA was obtained from the aerobic and anaerobic microbial enrichments using the protocols described by Großkopf et al. (1998) and Neria-González et al. (2006) with modifications reported by Silva et al. (2010).

2.4. Diversity analysis

The bacterial diversity of the aerobic and anaerobic enrichments was evaluated using 16S rRNA gene libraries. PCR amplification of 16S rRNA genes was performed from total community DNA by using the bacterial primer set 27f and 1100r (Lane, 1991). Reaction mixtures (50 µl) contained 50–100 ng of total DNA, 2 U

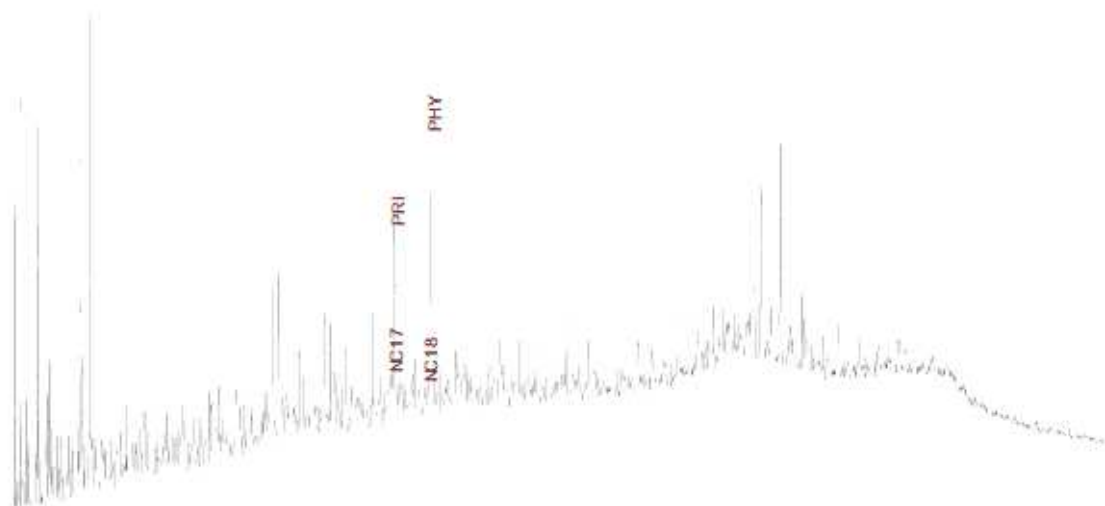


Fig. 1. GC chromatogram of the GMR75 oil sample. Notice the absence of *n*-alkanes and partial destruction of isoprenoids, indicating a moderate biodegradation rank according Peters and Moldowan (1993).

Taq DNA polymerase (Invitrogen®), 1X Taq buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix (GE Healthcare) and 0.4 μM each primer. The PCR amplification was 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. Two libraries were constructed, one for each enrichment. Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and phylogenetic affiliations were performed as described by Sette et al. (2007). The 16S rDNA partial sequences determined were deposited at the GenBank database under the accession numbers HM059724 to HM059788.

2.5. Construction of metagenomic clone library

2.5.1. DNA preparation

DNA samples representing aerobic and anaerobic enrichments were pooled and submitted to electrophoresis (400 μl) in a low melting point agarose gel (1%) for size selection (35–45 kb). After pulsed field gel electrophoresis (PFGE) (BIORAD CHEF DRII®) at 200 V (6 V cm⁻¹) for 4 h at 14 °C, with an initial switch time of 5 s and a final switch time of 15 s, a strip from each side of the gel was cut off and stained to localize the DNA. A high molecular weight marker (Low Range PFG Marker, New England Biolabs®) (0.5 μl), a fosmid DNA control (Epicentre®) (1 μl) and an aliquot of the pooled DNA (4 μl) were used as references to select the region of interest. DNA-containing regions were cut from the rest of the gel (unstained), transferred to microtubes containing 0.5% TAE (tris–acetate–EDTA) and treated with gelase (1 U/μl of DNA).

2.5.2. Library construction

The fosmid clone library was constructed using the Cloning-Ready Copy Control pCC2FOS kit (Epicentre®) according to the manufacturer's recommendations. After the end-repair reaction of the insert ends, ca. 40 μg of the DNA mixture (aerobic and anaerobic) was ligated, packed and transfected into *Escherichia coli* EPI300 cells. Clones were replicated in 96-well microtiter plates with LB medium containing 20% glycerol and stored at –80 °C. For validation of the metagenomic library, six clones were randomly selected and grown under appropriate conditions, and fosmid DNA was extracted using a FosmidMax DNA Purification kit (Epicentre®) according to the manufacturer's instructions. The fosmids were digested with the enzyme NotI (Promega®), and their restriction profiles were checked on a 1% agarose gel using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) (CHEF-DR II, BIORAD®) at 6 V cm⁻¹ for 6 h, with a switch of 5–15.

2.6. Rapid screening for detection of microbial growth on hexadecane

The screening assays were developed according to methodology described by Johnsen et al. (2002) with some modifications. Hexadecane was chosen as a model compound to evaluate the ability of the fosmid clones to grow using it as sole carbon source. Clones were pre-cultured in microplates (96 wells) containing 150 μl LB broth added of chloramphenicol (12.5 μg/ml) and incubated at 37 °C on a rotary shaker (150 rpm) for 24 h. After growth, aliquots (15 μl) of the clone cultures were transferred to another microplate filled with 150 μl BH medium containing chloramphenicol (12.5 μg/ml) and hexadecane (1.5 μl), which was pre-sterilized by filtration through a 0.22 μm Millipore membrane. *E. coli* EPI 300 and *Micrococcus* sp. (CBMAI 636; Vasconcellos et al., 2009) were used as negative and positive controls, respectively. After 48 h incubation at 37 °C on a rotary shaker (150 rpm), 30 μl MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2 H-tetrazolium bromide] (Merck®) solution (1 mg/ml) was added to each well to evaluate microbial respiration and consequent hexadecane consumption. The microplates were incubated again at 37 °C for

1 h. The generation of a purple color was considered to be a positive hit, while a yellow color was indicative of the absence of cellular activity (Bicalho et al., 2003).

2.7. GC–MS analysis of hexadecane biodegradation

Clones with positive growth using hexadecane as sole carbon source were evaluated for their biodegradation ability using chromatographic analysis. Clones were pre-cultured in pools (nine clones per pool), and 1 ml aliquots were inoculated in Erlenmeyer flasks containing 500 ml of LB added of chloramphenicol (12.5 μg/ml), followed by incubation on a rotary shaker (150 rpm) at 37 °C for 24 h. The cells were centrifuged (5000 rpm, 20 min, 4 °C) and the pellet was washed twice with distilled water. The pools were suspended in ultrapure water at 10⁸ CFU/ml. Erlenmeyer flasks (125 ml) containing 40 ml BH mineral medium with chloramphenicol (12.5 μg/ml) were inoculated with 400 μl hexadecane, 40 μl vitamin solution (Zinder et al., 1984) and 4 ml of the cellular suspension (each pool of nine clones). The assays were run with five replicates and monitored for 28 days using GC–MS. Doubly distilled hexane was used as extraction solvent for the organic phase in the chromatographic analysis. Phenanthrene solution (0.5 mg/ml) was applied as internal standard. GC–MS conditions are described by Vasconcellos et al. (2009). The clones in pools showing significant hydrocarbon degradation were evaluated individually using the same protocols as described above.

3. Results and discussion

3.1. Microbial enrichments

Slices of shale were used in the microbial enrichments in an attempt to simulate the physical conditions existing in petroleum reservoirs and improve the growth of the microorganisms in the petroleum samples. The technique of microbial cell immobilization is widely used to increase biomass in anaerobic reactors (Silva et al., 2006), although the choice of an ideal support is a limiting factor in the selection of microbial populations. In this study, the microbial enrichments were developed using hexadecane or a non-biodegraded petroleum sample (P1) as carbon source, with the goal of recovering microorganisms that might be involved in hydrocarbon biodegradation. Shale was not chosen randomly as a support for microbial growth and increased DNA recovery. Previous enrichment assays using different matrices have shown that the use of shale afforded the highest level of DNA recovery (data not shown). After 120 days monitoring, intense biomass generation was observed, with a cellular density higher >10⁸ CFU/ml for both substrates (hexadecane and P1). The same microbial enrichments showed up to 69% sulfate reduction, suggesting the presence of sulfate-reducing bacteria in both enrichments.

3.2. DNA extraction

Total DNA extraction was successful for both aerobic and anaerobic enrichments, affording high molecular weight DNA (up to 40 kb) at ≥50 ng/μl for the aerobic enrichment and ≥100 ng/μl for the anaerobic enrichment (Fig. 2).

The use of hexadecane as a substrate in the anaerobic enrichment was more efficient for the recovery of hydrocarbon-biodegrading bacteria than the enrichment using P1 oil and resulted in a larger amount of DNA recovered (Fig. 2). In contrast, no difference in DNA yield was observed in the aerobic enrichment using hexadecane or P1 oil. DNA samples obtained using both carbon sources were pooled and used for diversity analysis. For the construction of the metagenomic library, DNA samples from both the aerobic and anaerobic enrichments were pooled and treated as a single sample,

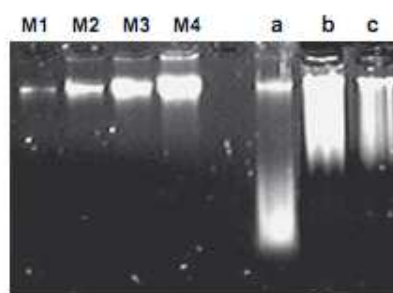


Fig. 2. Total DNA extraction obtained from petroleum bacterial enrichments. Lanes M1: Lambda phage genomic DNA (λ) 25 ng; M2: λ 50 ng; M3: λ 100 ng; M4: λ 200 ng; (a) DNA from aerobic enrichment; (b) DNA from anaerobic enrichment using hexadecane as carbon source; and (c) DNA from anaerobic enrichment using PT oil as carbon source.

3.3. Diversity analysis

The bacterial diversity of the aerobic (AER) and anaerobic (ANA) enrichments was evaluated by analysis of 16S rRNA gene clone libraries. A total of 96 clones from the AER library and 91 from the ANA library were screened by ARDRA to select different ribotypes for subsequent sequencing and phylogenetic analysis. Combined data from ARDRA and sequencing revealed that the bacterial members represented in the 16S rDNA library from the aerobic enrichment were affiliated (78%) with the genera *Petrobacter* (Phylum Proteobacteria, Class Betaproteobacteria) and (22%) *Micromonospora/Verrucosipora* (Phylum Actinobacteria) (Table 1, Fig. 3).

The anaerobic microbiota represented in the 16S rDNA library from the biodegraded petroleum sample were more diverse, and the bacterial members were related to the genera *Flexistipes* (24%) (Phylum Deferribacteres), *Thermodesulfobacter* (20%) (Phylum Nitrospirae), *Petrogala* (15.4%) (Phylum Thermotogae), *Anaerobaculum* (2.2%) (Phylum Synergistetes) and *Rahnella* (38.4%) (Phylum Proteobacteria, Class Gammaproteobacteria) (Table 1, Fig. 3).

Most of bacterial genera found in the aerobic and anaerobic enrichments had been described in the literature as inhabitants of petroleum-associated environments (Nazina et al., 2006; Miranda-Tello et al., 2007). A bacterium of the genus *Petrobacter*, the most abundant in the aerobic enrichment (Table 1; Fig. 3) was recently isolated from a non-water flooded Australian terrestrial oil reservoir and described as a novel nitrate-reducing bacterium and moderately thermophilic (Salinas et al., 2004). The reservoir

characteristics described by Salinas and collaborators (2004) are actually very similar to those of the reservoir sampled in this study. The genera *Micromonospora* and *Verrucosipora*, also recovered from the aerobic enrichment, belong to the Order Actinomycetales and are phylogenetically closely related (Rheims et al., 1998). Ara and Kudo (2007) described *Micromonospora* spp. as being widely distributed in marine environments, sediments, soils and extreme sites such as Antarctica. These bacteria were also described as being capable of using hydrocarbons as sole carbon source (Vidal et al., 1999), corroborating the findings of the present work.

Flexistipes and *Petrogala*-related clones recovered in the anaerobic enrichments (Table 1; Fig. 3) have also been reported as commonly occurring groups in petroleum reservoirs. *Flexistipes* is a metal-reducing microorganism that reduces a variety of metals in metabolic processes coupled to the oxidation of organic compounds in petroleum accumulations (Yacob, 2000). The genus *Petrogala*, together with the genera *Geotoga* and *Thermotoga*, belong to the order Thermotogales and are described as thermophilic microorganisms occurring exclusively in petroleum reservoirs (Miranda-Tello et al., 2007). *Thermodesulfobacter* spp. were described by Nazina and co-workers (2006) as an indigenous sulfate reducing group in the microbiota of the Dagang Oilfield (China). In this sense, the recovery of these bacteria in the anaerobic enrichment may suggest that they are native members of the microbial community in the Potiguar Basin reservoirs. The genus *Anaerobaculum* was first isolated from a petroleum reservoir and characterized as being comprised of Gram-negative, anaerobic, thermophilic, fermentative bacteria involved in organic acid degradation processes (Rees et al., 1997). The data are consistent with the recovery of *Anaerobaculum* spp. in the anaerobic enrichment cultivated under thermophilic conditions and inoculated with crude oil derived from the Potiguar Basin reservoirs, which are known for their high organic acid content (Lopes et al., 1999). Finally, community analysis also showed the recovery of *Rahnella*-related species in the anaerobic enrichment. Although not commonly described in petroleum environments, these bacteria are reported as being involved in hydrocarbon biodegradation in Antarctic soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs; Ma et al., 2006).

3.4. Construction and screening of metagenomic clone library

A fosmid metagenomic library was constructed using a mixture of the total DNA recovered from the aerobic and anaerobic enrichments, affording 31000 clones representing the bacterial diversity

Table 1
Closest relatives of bacterial ribotypes from 16S rRNA libraries of aerobic (Aer) and anaerobic (Ana) enrichments.

Genus	Library (% representation)	ARDRA ribotype	No. of total clones	Closest relative	Source	Similarity (%)
<i>Petrobacter</i>	Aer ^a (78%)	Ia	56	<i>Petrobacter succinatimandens</i>	Australian oil well	99
		Ib	19	<i>Petrobacter</i> sp. NFC7-F8	Degraded cellulose and lindane	98
<i>Verrucosipora</i> / <i>Micromonospora</i>	Aer ^a (22%)	II	21	<i>Verrucosipora giffhornensis</i>	Marine environment from China	98
				<i>Micromonospora echinospora</i>	Microbial diversity of commercial airline cabin	99
<i>Rahnella</i>	Ana ^b (38.4%)	III	35	<i>Rahnella genomsp.</i> 2 CCUG 21213	Fruits and vegetables	99
<i>Flexistipes</i>	Ana ^b (24%)	IVa	20	<i>Flexistipes</i> sp. vp180	Petroleum reservoir	97
		IVb	2	Uncultured Deferribacteres bacterium clone D004011L07	Petroleum reservoir	98
<i>Thermodesulfobacter</i>	Ana ^b (20%)	V	18	<i>Thermodesulfobacter yellowstonii</i>	Yellowstone lake	99
<i>Petrogala</i>	Ana ^b (15.4%)	VIa	6	<i>Petrogala halophila</i>	Offshore oil well in Congo	94
		VIb	8	<i>Petrogala mexicana</i>	Oil producing well in Mexico	95
<i>Anaerobaculum</i>	Ana ^b (2.2%)	VII	2	<i>Anaerobaculum termoterrenum</i>	Oil production water	99

^a Aerobic 16S rRNA library.

^b Anaerobic 16S rRNA library.

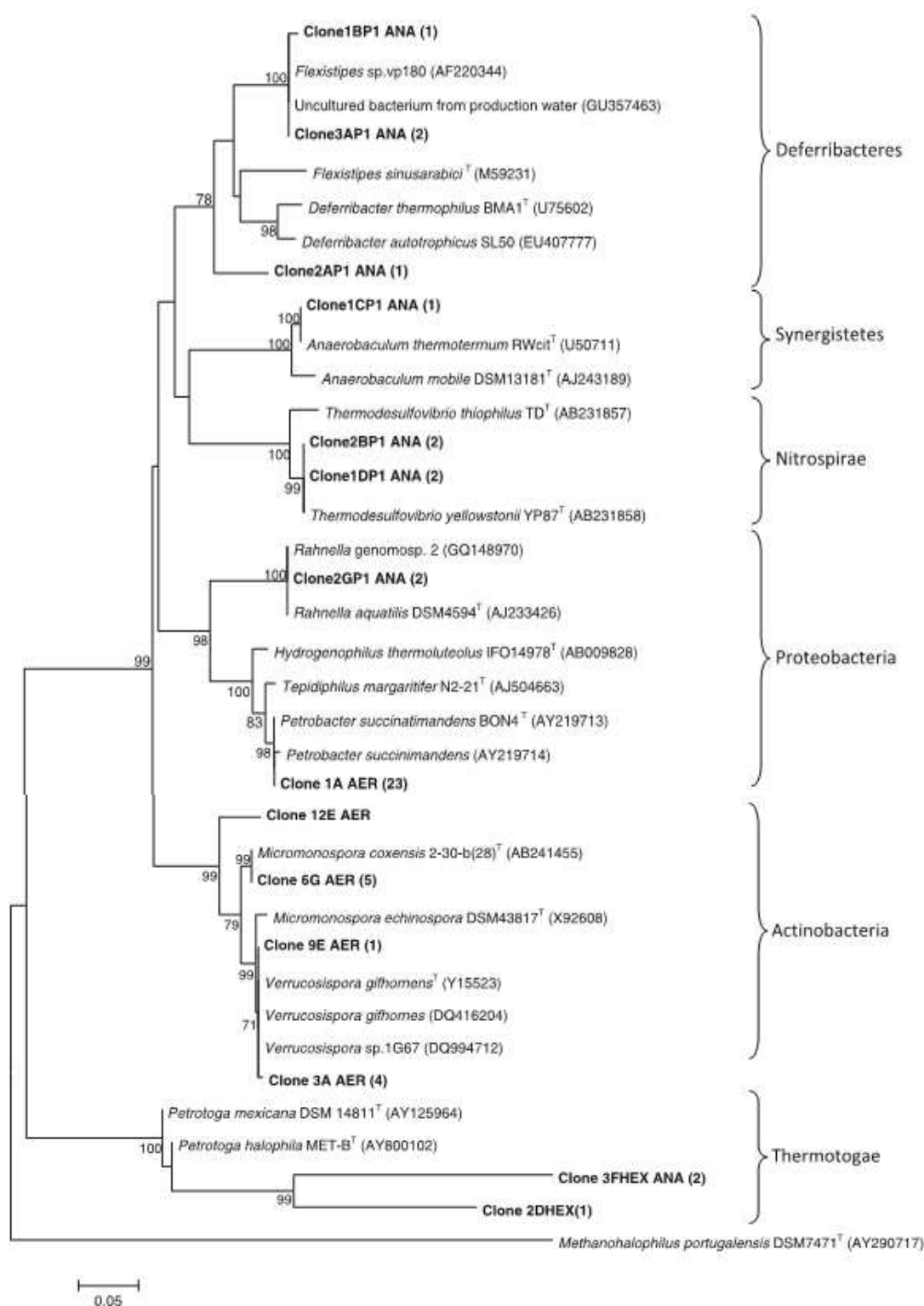


Fig. 3. Phylogenetic analysis based on partial 16S rRNA sequences from AER and ANA clones and related species. Evolutionary distances were based on the Kimura 2p model and tree reconstruction on the neighbor-joining method. Bootstrap values (1000 replicate runs, shown as %) > 70% are listed. GenBank accession numbers are listed after species names. Numbers in brackets after clone name indicate additional sequences showing > 97% similarity with the clone represented in the tree. *Methanohalophilus portugalensis* was used as outgroup.

present in a biodegraded petroleum sample (GMR75, Potiguar Basin). Validation of this clone library by the digestion of six randomly selected clones using the restriction enzyme Not I revealed

different band profiles, confirming the presence of different insertion events and the potential for the fosmid library to be representative of the bacterial diversity found in the enrichments.

Table 2
Biodegradation levels of hexadecane by clones of CO8 pool.

Clone (pool CO8)	Hexadecane biodegradation level (%)
3B	70
10A	86
1A	91
6A	92
2B	98

Based on strategies in the literature, a rapid colorimetric screening test was established for the detection of bacterial growth in hexadecane as sole carbon source (Johnsen et al., 2002; Bicalho et al., 2003). In this sense, 5000 clones were randomly chosen and screened using high throughput assays. Results revealed 72 positive hits detected by way of the development of a violet color resulting from the oxidation of MTT (Bicalho et al., 2003). The potential of these clones to use hexadecane as a sole carbon source was considered to be indicative of their degradation ability.

3.5. GC–MS analysis for detection of hexadecane biodegradation

The biodegradation activity of the 72 clones considered to be positive hits from the high throughput screening was evaluated using GC–MS. These clones were first investigated in pools, and hexadecane was again used as the model compound. It is present in the aliphatic fraction of crude oil and is one of the major components of diesel (Chénier et al., 2003). As an *n*-alkane, it has been used as a model compound to study aliphatic hydrocarbon biodegradation by many authors (Berthe-Corti and Fetzner, 2002; Schoefs et al., 2004; Widdel et al., 2006).

Among the eight pools evaluated (nine clones per pool), only one (CO8) showed biodegradation levels >50%. Three other pools did not show any biodegradation ability and the remaining four

pools showed hexadecane biodegradation levels up to 28%. The CO8 pool was selected for biodegradation assays using GC–MS, and the clones were evaluated individually. GC–MS showed that five of the nine clones were able to degrade hexadecane by >70% after 21 days monitoring (Table 2; Fig. 4). It is important to note that the results refer to clones, which constitute a heterologous expression system in *E. coli* cells. In this sense, the extent of biodegradation observed can be considered excellent when compared to data in the literature on the biodegradation abilities of bacterial strains. Whyte et al. (1998) reported a *Rhodococcus* strain that showed a hexadecane biodegradation level of 6.1% after 102 days incubation. In another study, Ripley et al. (2000) developed systems for the immobilization of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* cells and observed hexadecane biodegradation levels between 33% and 51%. An evaluation of the hexadecane biodegradation and emulsification abilities of a *Pseudomonas aeruginosa* strain under different experimental conditions revealed a biodegradation level of 11% after 3 days monitoring (Noordman et al., 2002). Furthermore, Vasconcellos et al. (2009) recently evaluated the biodegradation of different classes of petroleum biomarkers using aerobic strains isolated from the Campos Basin reservoir and found biodegradation levels <70% when only hydrocarbons were added as a carbon source. All these data confirm the significant results obtained in the present work using fosmid clones bearing catabolic genes from a petroleum reservoir, which were shown to successfully express hexadecane biodegradation ability in *E. coli* host cells.

Investigation of the biodegradation ability of the five clones is being extended and other biomarkers (e.g. phenanthrene, naphthalene, dodecane and tetradecane), complex mixtures of hydrocarbons and crude petroleum are being tested as substrates. Additionally, sub-cloning assays are being conducted to identify which catabolic pathways responsible for hydrocarbon degradation are present in the petroleum reservoirs of the Potiguar Basin.

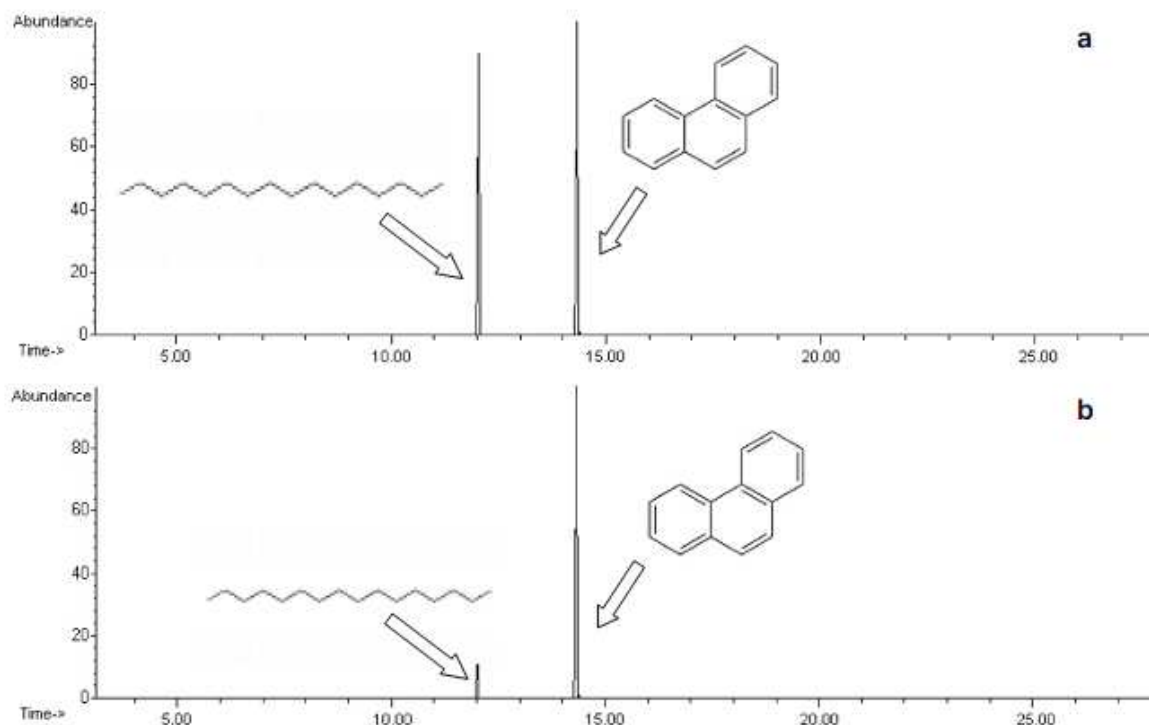


Fig. 4. GC–MS total ion chromatogram showing hexadecane biodegradation by the clone 2B. (a) Time 0; (b) after 28 days of incubation (98% biodegradation level).

4. Conclusions

This is the first report of the construction of a metagenomic clone library from a Brazilian petroleum reservoir sample. The clones that showed excellent hexadecane biodegradation ability (>70%) are undergoing genomic and proteomic investigations to unravel the biodegradation routes that occur in petroleum-associated environments. The results of the present work demonstrate the potential of a metagenomic approach for prospecting the microbial diversity in hostile environments such as petroleum reservoirs in the search for biocatalysts for use in biotechnological and industrial processes.

Acknowledgements

The authors thank PETROBRAS for financial support and authorization to publish the work. S.P.V., C.C.S. and B.M.D. were supported by grants from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and C.F.F.A. by grants from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). We are also grateful to two anonymous reviewers for significant contributions made to the text.

Guest Associate Editor—S.C. George

References

- Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K., 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59, 143–169.
- Ara, I., Kudo, T., 2007. Two new species of the genus *Micromonospora*: *Micromonospora chokoriensis* sp. nov. and *Micromonospora coxensis* sp. nov., isolated from sandy soil. *Journal of General and Applied Microbiology* 53, 29–37.
- Behar, F., Penteado, H.L.B., Lorant, F., Budzinski, H., 2006. Study of biodegradation processes along the Carnaúbas trend, Potiguar Basin (Brazil) – Part I. *Organic Geochemistry* 37, 1042–1051.
- Berthe-Corti, L., Fetzner, S., 2002. Bacterial metabolism of *n*-alkanes and ammonia under oxic, suboxic and anoxic conditions. *Acta Biotechnologica* 22, 299–336.
- Bicalho, B., Gonçalves, R.A.C., Zibordi, A.P.M., Manfio, G.P., Marsaloli, A.J., 2003. Antimicrobial compounds of fungi vectored by *Clusia* spp. (Clusiaceae) pollinating bees. *Zeitschrift für Naturforschung. Zeitschrift fuer Naturforschung A: Physical Sciences* 58, 746–751.
- Chénier, M.R., Beaumier, D., Roy, R., Driscoll, B.T., Lawrence, J.R., Greer, C.W., 2003. Impact of seasonal variations and nutrient inputs on nitrogen cycling and degradation of hexadecane by replicated river biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5170–5177.
- Eriksson, M., Dalhammar, G., Borg-Karlson, A.-K., 2000. Biological degradation of selected hydrocarbons in an old PAH/cresote contaminated soil from a gas work site. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53, 619–626.
- Esteve-Núñez, A., Caballero, A., Ramos, J.L., 2001. Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65, 335–352.
- Ferrer, M., Golyshina, O.V., Chernikova, T.N., Khachane, A.N., Martins dos Santos, V.A.P., Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Golyshin, P.N., 2005. Microbial enzymes mined from the Urania deep-sea hypersaline anoxic Basin. *Chemistry and Biology* 12, 895–904.
- Galvão, T.C., Mohn, W.W., de Lorenzo, V., 2005. Exploring the microbial biodegradation and biotransformation gene pool. *Trends in Biotechnology* 23, 497–506.
- Gomes, J., Steiner, W., 2004. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technology and Biotechnology* 42, 223–235.
- Großkopf, R., Stübner, S., Liesack, W., 1998. Novel Euryarchaeota lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 980–989.
- Harayama, S., Kasai, Y., Hara, A., 2004. Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Current Opinion in Biotechnology* 15, 205–214.
- Johnsen, A.R., Bendixen, K., Karlson, U., 2002. Detection of microbial growth on polycyclic aromatic hydrocarbons in microtiter plates by using the respiration indicator wst-1. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2683–2689.
- Kolmert, A., Wikström, P., Hallberg, K.B., 2000. A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures. *Journal of Microbiological Methods* 41, 179–184.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Goodfellow, M., Stackebrandt, E. (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley & Sons, Chichester, 115–135.
- Lopes, J.A.D., Santos Neto, E.V., Mello, M.R., Koike, L., Marsaloli, A.J., Reis, F.A.M., 1999. 3-Alkyl and 3-carboxyalkyl steranes in marine evaporitic oils of the Potiguar Basin, Brazil. *Chemical Geology* 158, 1–20.
- Ma, Y., Wang, L., Shao, Z., 2006. *Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer. *Environmental Microbiology* 8, 455–465.
- Miranda-Tello, E., Fardeau, M.L., Joulain, C., Magot, M., Thomas, P., Tholozan, J.L., Bernard Ollivier, B., 2007. *Petrogalea 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.
- Nazina, T.N., Shostakova, N.M., Grigor'ian, A.A., Mikhailova, E.M., Turova, T.P., Poltarau, A.B., Feng, C., Ni, F., Bellaev, S.S., 2006. Phylogenetic diversity and activity of anaerobic microorganisms of high-temperature horizons of the Dagang Oilfield (China). *Mykrobiologiya* 75, 70–81.
- Neria-González, I., Wang, E.T., Ramírez, F., Romero, J.M., Hernández-Rodríguez, C., 2006. Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from southeast of Mexico. *Anaerobe* 12, 122–133.
- Noordman, W.H., Wachter, J.H.J., de Boer, G.J., Janssen, D.B., 2002. The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. *Journal of Biotechnology* 94, 195–212.
- Peters, K.E., Moldovan, J.M., 1993. *The Biomarker Guide*, first ed. Prentice-Hall, New York.
- Rees, G.N., Bharat, K.C., Patel, G., Grassia, S., Sheeny, A.J., 1997. *Anaerobaculum thermotermum* gen. nov. sp. nov., a novel, thermophilic bacterium which ferments citrate. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 150–154.
- Rhahms, H., Schumann, P., Rohde, M., Stackebrandt, E., 1998. *Vermocissporoglythornensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the actinobacterial family Micromonosporaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 1119–1127.
- Ripley, M.B., Harrison, A.B., Betts, W.B., Dart, R.K., Wilson, A.J., 2000. Enhanced degradation of a model oil compound in soil using a liquid foam-microbe formulation. *Environmental Science and Technology* 34, 489–496.
- Salinas, M.B., Fardeaus, M.-L., Cavol, I.-L., Casatol, L., Patel, B.K.C., Thomas, P., Garcia, J.-L., Ollivier, B., 2004. *Petrobacter 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.
- Schoefs, O., Perrier, M., Samson, R., 2004. Estimation of contaminant depletion in unsaturated soils using a reduced-order biodegradation model and carbon dioxide measurement. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 53–61.
- 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. *Antonie van Leeuwenhoek* 91, 253–266.
- Silva, A.J., Hirasawa, J.S., Varesche, M.B., Foresti, E., Zalat, M., 2006. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. *Anaerobe* 12, 93–98.
- Silva, C.C., Viero, A.F., Dias, A.C.F., Andreote, F.D., Jesus, E.C., De Paula, S.O., Torres, A.P.R., Santiago, V.M.J., Oliveira, V.M., 2010. Monitoring the bacterial community dynamics in a petroleum refinery wastewater membrane bioreactor fed with a high phenolic load. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20, 21–29.
- Solbak, A.J., Richardson, T.H., McCann, R.T., Kinem, K.A., Bartnek, F., Tomlinson, G., Tan, X., Parra-Gessert, L., Frey, G.J., Podar, M., Luginbühl, P., Gray, K.A., Mathur, E.J., Robertson, D.E., Burk, M.J., Hazlewood, G.P., Short, J.M., Kerovuo, J., 2005. Discovery of pectin-degrading enzymes and directed evolution of a novel pectate lyase for processing cotton fabric. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 9431–9438.
- Suenaga, H., Ohnuki, T., Miyazaki, K., 2007. Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. *Environmental Microbiology* 9, 2289–2297.
- Torsvik, V., vrea, L., 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5, 240–245.
- Vasconcellos, S.P., Crespi, E., da Cruz, G.F., Senatore, D.B., Simioni, K.C.M., Santos Neto, E.V., Marsaloli, 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.
- Vidal, C.M., Vitale, A.A., Viale, A.A., 1999. Degradation of naphthalene-2-sulfonate by strains of *Micromonospora*. *Revista Argentina de Microbiologia* 31, 42–48.
- Widdel, F., Boetius, A., Rabus, R., 2006. Anaerobic biodegradation of hydrocarbons including methane. *Prokaryotes* 2, 1028–1049.
- Whyte, L.G., Hawari, J., Zhou, E., Bourbonniere, L., Innis, W.E., Greer, C.W., 1998. Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Methanococcus* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2578–2584.
- Yacob, S., 2000. Metal-reducing microorganisms in petroleum reservoirs. MSc Thesis. University of Canberra, Australia.
- Zinder, S.H., Cardwell, S.C., Anguish, T., Lee, M., Koch, M., 1984. Methanogenesis in a thermophilic (58 °C) anaerobic digester: *Methanotrix* sp. as an important acetoclastic methanogen. *Applied and Environmental Microbiology* 47, 796–807.

CAPÍTULO 2

Avaliação da produção de biossurfactantes através de ensaios de triagem em bibliotecas metagenômicas derivadas de reservatórios de petróleo

Bruna Martins Dellagnezze, Suzan Pantaroto de Vasconcellos & Valéria Maia de Oliveira

1. INTRODUÇÃO

Surfactantes são compostos caracterizados pela capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido. Emulsificantes, por sua vez, compõem uma subclasse de surfactantes, os quais estabilizam dispersões de um líquido em outro, como por exemplo, emulsões óleo-água (Ron & Rosenberg, 2001). Biossurfactantes são surfactantes produzidos por microrganismos que aumentam a biodisponibilidade de compostos apolares, como, por exemplo, de hidrocarbonetos, promovendo a estabilização de emulsões água-óleo existentes nos reservatórios de petróleo (Desai & Banat, 1997). Os biossurfactantes podem acelerar a biorremediação de solos e águas contaminadas por petróleo, diminuindo a tensão superficial óleo – água, aumentando a solubilidade e a mobilidade de compostos hidrofóbicos, tais como os hidrocarbonetos, viabilizando assim a sua biodegradação (Tango & Islam, 2002).

Técnicas baseadas em cultivo têm sido tradicionalmente as ferramentas primárias usadas para o estudo da microbiologia de diferentes ambientes (Chandler *et al.*, 1997). Estas metodologias, apesar de serem extremamente importantes para o entendimento do potencial fisiológico de microrganismos isolados, não fornecem necessariamente informação abrangente sobre a diversidade e abundância de comunidades microbianas (van Hamme *et al.*, 2003). Embora as técnicas de cultivo tenham sido aprimoradas, sabe-se que apenas uma pequena fração da diversidade microbiana na natureza, em torno de 1 a 10%, pode ser hoje cultivada em laboratório (Ward *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1995). Ferramentas moleculares desenvolvidas nas últimas décadas têm sido otimizadas e adaptadas para superar as limitações impostas pela abordagem clássica de estudo de populações microbianas, evitando o isolamento e cultivo dos micro-organismos. O uso destas ferramentas associado à construção de bibliotecas metagenômicas em vetores que suportam fragmentos de DNA de alto peso possibilita o acesso ao potencial metabólico da comunidade microbiana total presente em uma dada amostra ambiental (Handelsman *et*

al., 1998). No caso de comunidades microbianas biodegradadoras, as bibliotecas metagenômicas constituem-se em uma ferramenta que abre a perspectiva de descoberta de novas vias catabólicas a partir de membros da microbiota, principalmente de microrganismos fastidiosos ou ainda não-cultivados, ou mesmo daqueles que vivem em consórcios e não podem ser recuperados isoladamente.

O presente trabalho teve como objetivo realizar a prospecção da atividade biossurfactante em bibliotecas metagenômicas derivadas de microbiota recuperada de reservatórios de petróleo, utilizando-se técnicas baseadas em similaridade de sequência assim como ensaios de atividade biológica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Triagem para detecção de biossurfactantes nas bibliotecas metagenômicas

✓ Triagem rápida de clones com atividade emulsificante

Para a realização dos ensaios de triagem de clones com atividade bioemulsificante foi selecionada a metodologia descrita no trabalho de Bodour *et al.* (2003) e denominada “teste de colapso da gota”. Este é um teste de caráter qualitativo que possibilita a seleção de clones positivos para análises confirmatórias subsequentes, como as análises convencionais de tensiometria e a triagem através de similaridade de sequência de DNA.

Alíquotas de 7 µL de petróleo foram colocadas em microplacas esterilizadas (96 poços), deixando-se por 24 horas a 23°C. Ao mesmo tempo as culturas de clones foram repicadas em LB contendo cloranfenicol (12,5 µg/mL) e incubadas até 24 horas a 37°C. Após este período, as placas contendo as culturas dos clones foram centrifugadas a 3600 rpm, por 8 minutos e alíquotas de 5 µL do sobrenadante formado foram adicionadas ao petróleo com auxílio de micropipeta. Os resultados foram considerados positivos para as amostras que se dispersaram quando entraram em contato com o petróleo, ou seja, aquelas em que as gotas entraram em colapso. O resultado foi considerado negativo para a atividade de biossurfactante quando a gota do

sobrenadante permaneceu intacta na amostra.

✓ Triagem de clones por similaridade de seqüência

A triagem de clones por similaridade de seqüência foi realizada através de reações de amplificação por PCR utilizando pres de *primers* relacionados à biossíntese de EPS descritos na literatura (McInerney *et al.*, 2007; Bodour *et al.*, 2003) e relacionados na tabela abaixo:

Tabela 1. *Primers* utilizados para a triagem de clones produtores de biossurfactantes por PCR.

Primer	Seqüências (5' – 3')	Referência
<i>sfrA/licA</i> (F)	CAA AAKCGCAKCATACCACKTTGAG	McInerney <i>et al.</i> (2007)
<i>sfrA/licA</i> (R)	TCATARAGCGGCAYATATTGATGC	McInerney <i>et al.</i> (2007)
<i>rhIR</i> (F)	CTGCGCTCCWCGGAAATGGTG	McInerney <i>et al.</i> (2007)
<i>rhIR</i> (R)	TCTGGATGWYCTTGWGGTGGAAAGTTC	McInerney <i>et al.</i> (2007)
<i>kpd1</i> (F)	GCC CAC GAC CAG TTC GAC	Bodour <i>et al.</i> (2003)
<i>kpd2</i> (R)	CAT CCC CCT CCC TAT GAC	Bodour <i>et al.</i> (2003)

Os pares de *primers rhIR* e *kpd* estão relacionados à síntese de ramnolipídeos, um tipo de biossurfactante descrito como sendo produzido por *Pseudomonas aeruginosa*, e o par de *primers sfrA/lic* está relacionado à síntese de surfactina, descrito como sendo produzido por bactérias do gênero *Bacillus*.

Deste modo, foram selecionadas culturas puras de bactérias como controles positivos e negativos para a síntese de biossurfactantes a fim de padronizar as condições de amplificação. A seleção desses micro-organismos foi baseada na literatura de acordo com Vasconcellos *et al.* (2009) e Bodour *et al.* (2003). Como controles positivos foram utilizadas culturas de *Bacillus* sp. e *Pseudomonas aeruginosa*, e como controle negativo foi utilizada uma linhagem de *Dietzia* sp. (Vasconcellos *et al.*, 2006). As culturas foram gentilmente cedidas pela Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria

(CBMAI), UNICAMP, e foram cultivadas em meio NA a 28°C em estufa BOD por 48 horas. Uma combinação dos protocolos descritos por Pospiech & Newman (1995) e Pitcher *et al.* (1989) foi empregada para a extração de DNA das culturas puras.

As reações de amplificação dos genes relacionados à síntese de biossurfactantes primeiramente passaram por fase de padronização. Testes foram realizados utilizando as condições descritas por Bodour *et al.* (2003) e McInerney *et al.* (2007) e as culturas puras acima citadas. Para a detecção do gene da ramnosil transferase (*rhIB*), parte da via de biossíntese do ramnolípido, foram realizadas reações de amplificação com os *primers* e reagentes nas seguintes concentrações: tampão 1x (Invitrogen), MgCl₂ 50 mM (Invitrogen), 0,5 µM de cada um dos *primers* *kpd1* e *kpd2*, 0,2 mM de dNTPs, DMSO 5%, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 50 ng de DNA. O volume final da reação totalizou 50 microlitros. As condições de amplificação consistiram dos seguintes ciclos de temperatura: 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de 94°C por 15 segundos, 54°C por 15 s e 72°C por 15 s, e uma extensão final de 72°C por 2 min.

Para a detecção dos genes *srfA/licA* e *rhIR* foram utilizadas as mesmas concentrações de *primers* e reagentes estabelecidas por McInerney e colaboradores (2007), a saber: 2,5 µL de MgCl₂ a 25 mM, 1 µL de dNTP a 10 mM, 1 µL de cada *primer* a 5 µM, 0,5 µL de DMSO, 0,25 µL (1U/ µL) de Taq Polimerase (Invitrogen) e 50 ng de DNA, obtendo-se o volume final da reação de 50 microlitros. Para cada par de *primer* foram realizadas reações de PCR com diferentes ciclos de temperatura. Para o par *srfA/licA* foi programado um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, um touchdown de 10 ciclos a 94°C por 35 s, 55°C (decrecendo 0,5°C por ciclo) por 35 s, e 72°C por 45 s para extensão. Foram adicionados mais 23 ciclos a 95°C para desnaturação, 35 s a 50°C para anelamento, 45 s a 72°C para extensão, e um ciclo de extensão final a 72°C por 6 minutos. Para o par de *primer* *rhIR* foi programado um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos de 10 ciclos de 40 s a 95°C, 40 s a 57,3°C até 52,3°C em touchdown para anelamento, 45 s a 72°C para extensão. Foram adicionados mais 23 ciclos a 95°C para desnaturação, 40 s a 52,3°C para anelamento, 45 s a 72°C para extensão, seguidos de 7 minutos a 72°C para uma extensão final. As reações foram realizadas no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf).

Após a verificação das condições ideais para a amplificação dos controles

positivos, as reações de PCR foram realizadas na forma de *pools* com 10 clones, utilizando os clones que apresentaram resultados positivos no *screening* funcional.

2.2. Ensaios de tensiometria

Ensaios de tensiometria foram realizados com o intuito de confirmar a produção de biossurfactantes pelos clones que exibiram resultados positivos no *screening* preliminar realizado pelo teste “colapso da gota” e também de selecionar os clones que apresentaram os melhores resultados. Quatro ensaios diferentes foram realizados. No primeiro ensaio, as culturas de clones foram repicadas sob a forma de *pools* de 20 clones em tubos Falcon com 25 mL de meio LB + cloranfenicol (12,5 µg/mL) e incubadas até 24 horas a 37°C sob agitação. Os *pools* que obtiveram menores valores de tensão superficial foram selecionados para o segundo ensaio, utilizando meio mineral para cultivo dos clones e hexadecano como fonte de carbono. Foram também utilizadas uma cultura de célula hospedeira *E.coli* EPI-300 como controle negativo e uma cultura de *Pseudomonas aeruginosa* (CBMAI 602) como controle positivo. As culturas de clones foram incubadas sob agitação a 37°C em frasco Erlenmeyer com 40 mL de meio mineral + 400 µL de hexadecano + 100 µL de solução de vitaminas. Foram avaliados quatro *pools* de 20 clones, selecionados no primeiro ensaio e mais cinco clones isolados pré-avaliados como degradadores de hidrocarbonetos em outro estudo realizado em paralelo pelo nosso grupo de pesquisa. A incubação durou 28 dias, sendo que as avaliações foram realizadas a cada sete dias.

No terceiro ensaio foi avaliado apenas o *pool* que apresentou o melhor resultado (*pool* 25) dentre os quatro *pools* avaliados anteriormente. Entretanto, os vinte clones desse *pool* foram avaliados isoladamente, sendo possível a seleção de nove clones. As mesmas condições do segundo ensaio foram mantidas, ou seja, incubação em meio mineral com hexadecano, a 37°C, sob agitação.

No quarto e último ensaio, foram mantidas as condições do meio e fonte de carbono, no entanto, o volume do meio mineral utilizado foi de 100 mL + 1 mL de hexadecano + 250 µL de solução de vitaminas e a incubação foi realizada por apenas 10 dias. Após este período, os nove clones foram submetidos a análises colorimétricas.

É importante salientar que antes da incubação em meio mineral foi realizado um pré-inóculo dos *pools* e dos clones individuais em tubos Falcon contendo 20 mL de meio LB e incubação por 24 horas a 37°C sob agitação. Posteriormente, os *pools* e os clones individuais foram transferidos para frascos “SCHOTT” com 500 mL de meio LB, crescendo mais uma vez nas mesmas condições. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas a 6.000 rpm por 20 minutos e o *pellet* suspenso em água MilliQ. Alíquotas de 4 mL da suspensão de células dos clones foram inoculadas em 40 mL de meio mineral adicionados de 20 µL de cloranfenicol (12,5 µg/mL) e 100 µL de solução de vitaminas, exceto para o último ensaio, como já foi descrito, em que as condições foram modificadas.

Após o término do período da incubação, as culturas foram centrifugadas por 10 minutos, 5000 rpm. O sobrenadante obtido foi dividido em duas partes, sendo uma parte para a avaliação no tensiômetro e outra para a extração dos EPS. Os *pellets* celulares foram mantidos a 4°C e posteriormente liofilizados, a fim de se avaliar a produção de EPS por massa celular.

2.3. Extração e caracterização química dos biossurfactantes através de análises colorimétricas

Para a extração e caracterização química dos biossurfactantes através de análises colorimétricas, inicialmente foi adotado o protocolo de Vasconcellos (2006) realizado em espectrofotômetro, utilizando cubetas. No entanto, este método foi modificado com base nos protocolos de Klock *et al.* (2007) e da Thermo Scientific (Pierce BCA Protein Assay Kit) e empregado para a caracterização dos biossurfactantes dos nove clones selecionados. Com este novo protocolo foram utilizadas alíquotas menores, possibilitando "miniaturizar" as análises, as quais foram realizadas em microplacas e avaliadas em espectrofotômetro (leitor de placas).

Para a extração foi realizada a precipitação do sobrenadante com etanol absoluto gelado, e incubação da solução a -20° C por cerca de 16 h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 4° C por 15 minutos. O etanol foi descartado rapidamente, e o *pellet* esbranquiçado formado foi suspenso em 10 mL de água Milli-Q.

Após a extração foi realizada a diálise utilizando membranas (Spectrum) com

capacidade para 12 -14 kDa, as quais foram imersas em água Milli-Q por 48 h em agitador, efetuando-se a troca da água a cada três horas. Após a diálise, o volume do sobrenadante foi dividido em duas partes, uma foi submetida ao processo de liofilização (a fim de medir a produção de EPS) e a outra foi utilizada para as análises colorimétricas para a verificação dos teores de proteínas, carboidratos, e ácidos urônicos, seguindo protocolo específico para cada uma.

Para a determinação de proteínas presentes nos EPS microbianos foi empregada a metodologia descrita por Bradford (1976). Uma solução de “Brilliant Blue Coomassie” foi preparada, a qual foi obtida a partir da dissolução do corante (0,1 g) em etanol 95% (50 mL) e ácido fosfórico 85% (100 mL), sendo o volume completado para 1000 mL com água ultra-purificada. Alíquotas de 18,2 µL de EPS dialisado foram colocadas em microplacas de 96 poços juntamente com 182 µL da solução de “Brilliant Blue Coomassie”, seguindo-se à homogeneização em vórtex por 30 segundos e incubação a 37°C por uma hora. Como controle negativo, adicionou-se uma alíquota de 18,2 µL da solução aquosa de NaCl (0,15 M) em substituição ao EPS. Albumina de Soro Bovino (BSA, Aldrich 99% de pureza) foi diluída em solução aquosa de NaCl (0,15 M), obtendo-se padrões de quantificação nas concentrações de 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 e 0 (µg/mL) para determinação do teor de proteínas das amostras através de uma curva padrão. Tanto as amostras como os controles foram avaliados em triplicata. Os teores de proteínas foram avaliados sob o comprimento de onda de 562 nm.

A metodologia empregada para a determinação de carboidratos foi baseada em Dubois *et al.* (1956), utilizando fenol (solução aquosa 5%) e ácido sulfúrico concentrado (95,5%) para promover a digestão de carboidratos e liberação de açúcares, com conseqüente formação de cor (alaranjada). Foram adicionadas nas microplacas alíquotas de 25 µL dos EPS dialisados juntamente com 12,5 µL de fenol. A mistura foi homogeneizada em vórtex por 30 s e foram adicionados 100 µL de ácido sulfúrico concentrado (95,5%), seguido de mais 30 s de agitação. Como controle negativo, foi utilizada uma mistura de 25 µL de água ultra purificada 12,5 µL da solução de fenol e 100 µL de ácido sulfúrico. As reações foram realizadas em triplicata e mantidas em repouso em temperatura ambiente durante 10 a 20 minutos. O teor de açúcares foi averiguado através de análises espectrofotométricas de absorbância no comprimento de onda de 490 nm, comparando-se com uma curva de valores de absorbância determinados a partir de

soluções de glicose nas mesmas concentrações empregadas para análise de proteína.

Os teores de ácidos urônicos foram determinados empregando-se a metodologia proposta por Blumenkratz e Asboe-Hansen (1973), utilizando soluções de meta-hidroxidifenila (PA, Aldrich) em 0,5% de NaOH e de tetraborato de sódio (Bórax PA, Aldrich) em ácido sulfúrico concentrado. O procedimento também foi realizado em microplacas de 96 poços com alíquotas de 25 µL do EPS dialisado juntamente com 130 µL de solução de tetraborato de sódio. A placa permaneceu em estufa a 100°C, durante 45 minutos, seguindo-se imediatamente a incubação em banho de gelo durante 5 minutos. Foram adicionados 2 µL da solução de meta-hidroxidifenila, seguida de agitação em vórtex, para verificação da densidade óptica através de análises espectrofotométricas de absorbância a 520 nm. Uma curva padrão foi construída utilizando-se ácido galacturônico, nas mesmas concentrações descritas para BSA e glicose a fim de determinar a concentração de ácidos urônicos nas amostras. Assim como nas outras análises, água ultra purificada foi utilizada em substituição às amostras de EPS, como controle negativo.

2.4. Teste emulsificante

Após a liofilização dos EPS e a verificação da massa em gramas, procedeu-se à solubilização dos mesmos em água Milli-Q na concentração de 0,5%. Os testes de emulsificação foram realizados utilizando três fontes diferentes de hidrocarbonetos: petróleo, óleo diesel e hexadecano. A metodologia aplicada a esses testes foi de acordo com Martinez-Checa *et al* (2002), segundo a qual 1 mL de hidrocarboneto foi misturado 1 mL de solução de EPS e levado por um minuto em vórtex para agitação. Surfactantes comerciais (Triton X-100 e Tween 80) foram empregados como controles na mesma concentração, assim como a célula EPI 300 (controle negativo) e *Pseudomonas aeruginosa* CBMAI 602 (controle positivo).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Triagem para detecção de biossurfactantes nas bibliotecas metagenômicas

✓ Ensaios de triagem para detecção de biossurfactantes

O teste utilizando a metodologia descrita por Bodour *et al.* (2003), denominado “teste de colapso da gota”, foi realizado com 2.880 clones, resultando em 2.104 positivos para a produção de biossurfactantes. Todos os clones considerados positivos foram selecionados para testes subsequentes de tensiometria para a confirmação do resultado. A Figura 1 ilustra a formação imediata ou não da bolha.

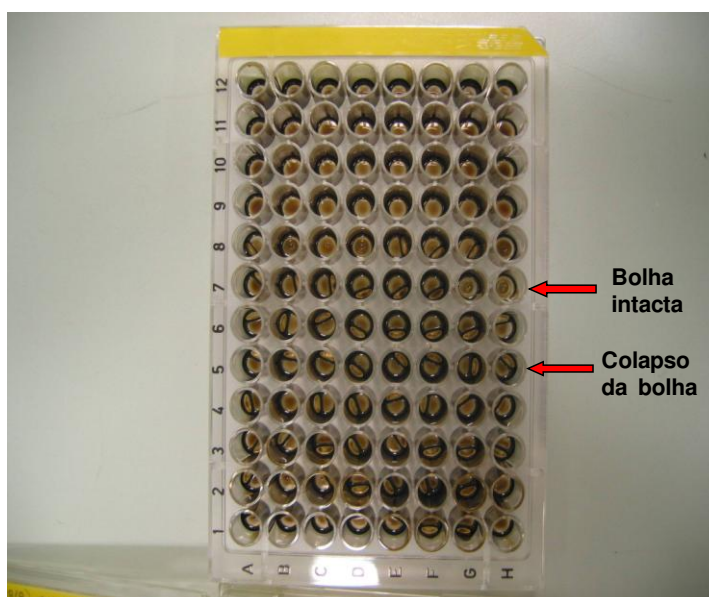


Figura 1. Teste “colapso da gota” utilizado para *screening* funcional de biossurfactantes.

✓ *Screening por similaridade de sequência*

Como já descrito, para os ensaios de similaridade de sequência por PCR foram utilizados três pares de *primers*. O par *sfrA/lic* (F) e *sfrA/lic* (R) está relacionado à síntese de surfactina e os outros dois, os pares de *primers* degenerados *rhIR* (F)/ *rhIR* (R) e *kpd1*(F)/ *kpd2* (R), estão relacionados à síntese de ramnolipídeos.

Os ensaios de PCR utilizando culturas puras para padronização das condições de reação foram bem sucedidos e mostraram sinal positivo de amplificação apenas para *Bacillus subtilis* CBMAI 707 no caso dos *primers* *sfrA/lic* (F)/ *sfrA/lic* (R), e apenas para *Pseudomonas aeruginosa* CBMAI 602 no caso dos pares de *primers* *kpd1/kpd 2* e *rhIR* (F)/ *rhIR* (R) (Figura 2).

Os ensaios por PCR com os pools de clones não evidenciaram sinal positivo de amplificação para os pares de *primers* *sfrA/lic* (F)/ *sfrA* (R) e *rhIR* (F)/ *rhIR* (R), porém para o par de *primers* *kpd1*(F)/ *kpd2* (R), que flanqueia o gene *rhIB* (ramnosil-transferase), foi verificado sinal positivo de amplificação para quatro *pools* (Figura 3).

É interessante notar que o fragmento amplificado a partir dos *pools* de clones apresentou tamanho maior, em torno de 300 pb, do que aquele obtido para a linhagem usada como controle positivo *P. aeruginosa* CBMAI 602 (226 pb). Estes genes que codificam a produção deste tipo de biosurfactante são geralmente descritos em *P. aeruginosa* (Das *et al.*, 2008; Oschner *et al.*, 1995; Ron & Rosenberg, 2001; Mulligan *et al.*, 2005), e o tamanho de fragmento observado poderia ser devido à variação de tamanho deste gene entre diferentes linhagens de *Pseudomonas*, ou talvez até mesmo de outras espécies de bactérias ainda não encontradas na literatura como portadoras destes genes.

É importante lembrar que para a biossíntese de ramnolipídeos, são necessárias algumas etapas de reações envolvendo alguns genes, onde o gene *rhIB* (ramnosil-transferase) é parte de uma das vias de construção desta molécula. O *rhIB* possui arranjo na forma de operon formando um cluster com o gene *rhIR*, responsável por codificar proteínas envolvidas na regulação transcricional através do mecanismo de quorum-sense. Este mecanismo regula, em nível da transcrição, a produção de várias moléculas relacionadas à virulência dos micro-organismos, como os ramnolipídeos (Chavéz *et al.*, 2005).

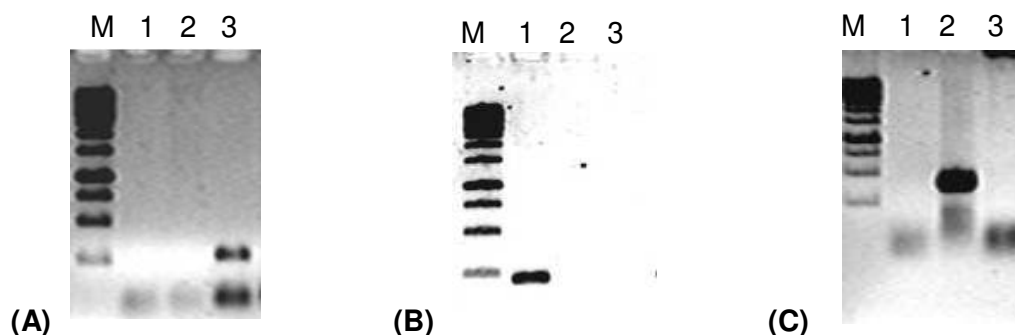


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1,2% para verificação dos produtos de amplificação na fase de padronização. **(A)** com os *primers* sfrA/lic (F)/ sfrA (R); (M) Ladder 1 Kb, (1) *Pseudomonas aeruginosa* CBMAI 602; (2) *Dietzia* sp. CBMAI 705, (3) *Bacillus subtilis* CBMAI 707; **(B)** com os *primers* Kpd1 e Kpd 2. (M) Ladder 1 Kb, (1) *Pseudomonas aeruginosa* CBMAI 602; (2) *Bacillus subtilis* CBMAI 707; (3) *Dietzia* sp. CBMAI 705; **(C)** com os *primers* rhIR (F)/ rhIR (R), (M) Ladder 1 Kb, (1) *Bacillus subtilis* CBMAI 707; (2) *Pseudomonas aeruginosa* CBMAI 602 e (3) *Dietzia* sp. CBMAI 705.

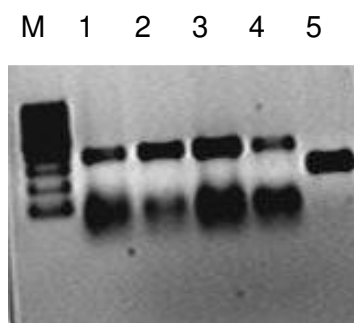


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1,2% para verificação dos produtos de amplificação. (M) Ladder 100 pb, (1); (2); (3); (4) bandas positivas utilizando os *primers* kpd; (5) *Pseudomonas aeruginosa* CBMAI 602.

Para a confirmação e a verificação de quais clones dos *pools* positivos teriam o fragmento do gene de interesse, realizou-se uma segunda reação de PCR utilizando os mesmos *primers* *kpd1* e *kpd2* com os todos os clones considerados positivos, porém desta vez individualmente, ou seja, uma reação de PCR com cada um dos 40 clones. Surpreendentemente, não foram obtidos mais os fragmentos amplificados.

Frente a esta situação, foi decidido realizar a clonagem e seqüenciamento destes fragmentos para confirmar a identidade dos mesmos.

A etapa de clonagem foi realizada com dois fragmentos (denominados 8b e 9a) referentes aos pools, já que apenas esses se mantiveram após a purificação dos produtos de PCR com os primers *kpd1* e *kpd2*. Entretanto, após comparação das sequências obtidas (~ 300 bp) com seqüências de linhagens referência presentes nas bases de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), foi verificado que o fragmento correspondia a uma região de um gene da célula hospedeira *E. coli*, e não a sequencias parciais de ramnolipídios conforme era esperado. Estes resultados confirmaram que não foi encontrado nenhum hit positivo nos ensaios de PCR para os *primers* utilizados.

3.2. Ensaios de tensiometria

Como descrito anteriormente, os ensaios de tensiometria foram realizados com o intuito de confirmar a produção de biossurfactantes pelos clones.

Um surfactante considerado ideal e eficiente seria aquele com baixa concentração micelar crítica e tensão superficial com valores menores que 30 mN/m (Ashby *et al.*, 2008; Desai & Banat, 1997). Nas análises realizadas não obtivemos os valores da concentração micelar crítica (CMC), apenas os valores da tensão interfacial.

Quatro testes de tensiometria foram realizados: o primeiro em caldo em LB, o segundo, o terceiro e o quarto em meio mineral utilizando hexadecano como fonte de carbono. Os testes de tensiometria em caldo LB revelaram resultados entre 44 e 48 mN/m, os quais foram considerados insatisfatórios quando comparados com resultados obtidos para micro-organismos isolados. Deste modo, para os ensaios utilizando-se meio mineral e hexadecano como fonte de carbono, foram selecionados os *pools* de clones que apresentaram valores entre 44 mN/m e 45 mN/m (quatro *pools*) e outros cinco clones que apresentaram bom desempenho em testes para degradação de hidrocarbonetos realizado em trabalho paralelo (Pós-doc FAPESP da Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos).

No segundo ensaio, os clones, em consórcios ou individualmente, foram avaliados a cada 7 dias durante 28 dias. No período de 7 dias, pôde ser observada a redução de valores de um dos *pools* de 45 mN/m para 42 mN/m (denominado *pool* 25) e dentre os clones individuais dois apresentaram valores entre 33 e 39 mN/m. Nas avaliações posteriores, com 14 e 21 dias, os valores se mantiveram baixos, sugerindo que o

hexadecano pode ter estimulado a produção de biossurfactantes pelos clones.

Para o terceiro ensaio, foi selecionado o *pool* (com 20 clones) que apresentou o melhor resultado (denominado *pool* 25) e os vinte clones que foram avaliados isoladamente. A partir deste ensaio foram selecionados 9 clones que apresentaram valores entre 29 mN/m a 35 mN/m (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de tensiometria dos nove clones selecionados ao longo do terceiro ensaio, utilizando hexadecano como fonte de carbono medidos a cada 7 dias durante 28 dias de avaliação.

CLONE	PERÍODO			
	7 d	14 d	21 d	28 d
9H	30,9	42,4	37,9	36,6
10B	30,4	32,4	37,9	35,6
11B	29,9	44,4	36,8	35,9
11G	27,7	39,7	43,3	37,4
11H	31,4	38,0	33,8	36,9
12A	32,1	36,0	40,7	40,8
1B	32,8	40,8	44,4	35,9
1E	32,0	35,5	36,2	44,6
1F	32,1	38,5	40,2	44,4
<i>P. aeruginosa</i>	37,3	42,6	39,5	37,8

No quarto ensaio os nove clones foram incubados por apenas 10 dias e não mais por 28 dias. Essa estratégia foi adotada com base na observação nos experimentos anteriores de que a maior redução de tensão interfacial ocorria no primeiro período (7 dias). Neste ensaio os valores de tensão dos clones selecionados foram semelhantes aos do terceiro ensaio, com médias entre 30 a 35 mN/m.

Como já mencionado, os biossurfactantes são produzidos durante a fase estacionária de crescimento. O melhor período para a produção neste estudo foi durante 7 a 10 dias de acordo com os resultados observados nos experimentos anteriores.

O hexadecano é um hidrocarboneto pertencente à classe dos n-alcanos e representa um substrato de difícil acesso, uma vez que são moléculas com baixa solubilidade em água, apresentando pouca biodisponibilidade. A biodisponibilidade

representa um fator limitante crítico para a biodegradação desses compostos, em parte devido ao transporte limitado até o interior das células microbianas (Zhang & Miller, 1992). No entanto a produção de biossurfactantes capacita as células para solubilizar e utilizar esses substratos inacessíveis (Sutherland, 2001) através da formação de vesículas ou micelas que se agregam a moléculas de hidrocarbonetos.

As condições ambientais também sugerem uma degradação melhor do hidrocarboneto utilizado. Segundo Leahy e Colwel (1990) altas temperaturas aumentam a taxa de degradação dos hidrocarbonetos, principalmente entre 30 e 40°C, lembrando que os ensaios foram conduzidos a 37°C.

Muitos estudos mencionam o emprego de hidrocarbonetos como substrato para a produção de biossurfactantes com micro-organismos isolados, e dentre os mais descritos estão bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, cujos biossurfactantes produzidos são eficientes na redução da tensão superficial (Tuleva *et al.*, 2001; Ashby *et al.*, 2008). O alcano hexadecano é um composto amplamente utilizado, como pode ser verificado na literatura, representando um hidrocarboneto modelo em estudos que mencionam biodegradação e biorremediação (Chayabutra & Ju, 2000; Herman *et al.*, 1997).

Geralmente, os micro-organismos investigados quanto à produção de biossurfactantes são isolados de ambientes contaminados com petróleo, como solo e água (Batista *et al.*, 2006; Das & Mukherjee, 2007; Ilori *et al.*, 2008), e também de reservatórios de petróleo (Ghojavand *et al.*, 2008; Dastgheib *et al.*, 2008).

Trabalhos que mencionam a utilização de bibliotecas metagenômicas para estudos de diversidade em reservatórios de petróleo já são descritos (Koreblun *et al.*, 2010; Sette *et al.*, 2007; Oliveira *et al.* 2008), assim como trabalhos que mencionam o uso de bibliotecas metagenômicas para investigar enzimas em processo de biocatálise, como lipases e esterases (Kim *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2004). Porém, não há registro sobre a investigação da produção de biossurfactantes através de clones fosmidias de bibliotecas metagenômicas, o que torna ainda mais relevante a realização deste trabalho no intuito de encontrar novas moléculas.

3.3. Caracterização química dos biossurfactantes

Como já mencionado, a caracterização química dos biossurfactantes foi baseada em metodologia descrita por Vasconcellos (2006), Klock *et al.* (2007) e Thermo Scientific (Pierce BCA Protein Assay Kit), seguindo protocolo específico para cada tipo diferente de molécula analisada. Para obtenção dos teores de carboidratos, proteínas e ácidos urônicos, foi calculada a média dos valores de absorbância em triplicata. Esse valor foi multiplicado pelo valor correspondente de absorbância das concentrações padrões, gerando os resultados mostrados na Tabela 3.

Carboidratos, ácidos urônicos, proteínas, ácidos graxos e compostos acetilados podem ser constituintes de EPS microbianos, e devido à ampla variação de micro-organismos produtores, ocorre, conseqüentemente, uma variação de moléculas produzidas. Como já mencionado, os biossurfactantes são moléculas anfifílicas que possuem uma porção hidrofóbica e outra porção hidrofílica. A parte hidrofóbica é geralmente composta por longas cadeias de ácidos graxos, e a parte hidrofílica pode ser constituída por carboidratos, aminoácidos, fosfato, ácidos carboxílicos, peptídeos e álcoois (Mulligan, 2009; Ron & Rosenberg, 2002).

Tabela 3. Teores de carboidratos, proteínas e ácidos urônicos determinados neste estudo.

Clones	Carboidratos	Proteínas	Ácidos Urônicos
<i>E. coli</i> EPI 300	18,15	25,51	25,00
<i>P. aeruginosa</i> CBMAI 602	27,70	27,03	25,96
1B	20,22	26,36	28,32
1E	18,63	24,82	22,20
1F	24,84	27,04	29,02
9H	25,15	27,89	31,46
10B	25,15	25,51	28,67
11B	19,74	24,82	29,02
11G	21,17	32,65	26,57

Clones	Carboidratos	Proteínas	Ácidos Urônicos
11H	24,52	27,55	30,06
12A	25,15	24,65	28,84
<i>Pool 25</i>	22,92	22,44	24,82

É importante ressaltar que a caracterização realizada neste trabalho apenas indica as concentrações dos diferentes compostos presentes nos biossurfactantes produzidos pelos clones. Os controles negativo e positivo também foram submetidos às análises colorimétricas para fins de comparação. No entanto, em geral os valores não apresentaram diferenças significativas entre si.

Estudos mais aprofundados sobre a estrutura e função desses mesmos biossurfactantes poderão ser realizados em trabalhos futuros.

Ao longo deste trabalho também foi investigada a produção de EPS total por gramas de células (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de produção em gramas de EPS por gramas de biomassa (células).

Clones	Produção de EPS (g/g)
<i>E. coli</i> EPI 300	0,962
<i>P. aeruginosa</i> CBMAI 602	0,132
1B	0,04
1E	0,88
1F	0,15
9H	0,55
10B	1,05
11B	0,112
11G	0,686
11H	0,519
12A	0,152
<i>Pool 25</i>	0,042

Com base na comparação dos resultados obtidos neste estudo com dados de literaturas (Celik *et al.*, 2008; Deziel *et al.*, 1996), foi estabelecido o *cutoff* de $\geq 0,5$ como critério para selecionar os melhores produtores, ou seja, clones que apresentaram produção de EPS acima desse valor foram considerados bons produtores.

Pôde-se observar, entretanto, que o valor de produção de EPS do controle negativo (célula EPI 300) foi maior que 0,5, indicando alta taxa de produção de EPS. No entanto, o mesmo controle não apresentou bons resultados nos testes de tensiometria e emulsificação, sugerindo que as células de *E. coli* EPI 300 podem ter produzido metabólitos secundários durante seu crescimento, mas sem capacidade surfactante ou emulsificante.

Por outro lado, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* CBMAI 602, controle positivo para produção de biossurfactante, apresentou índice de 0,132, indicando baixa produção de EPS. Nos ensaios de tensiometria, essa mesma linhagem foi capaz de reduzir as tensões interfaciais do meio mineral e hexadecano de 45 mN/m para 37 mN/m, um valor que é considerado não muito eficiente para substâncias surfactantes, em vista de alguns clones que apresentaram valores de redução até 29 mN/m. No teste emulsificante, o controle positivo foi capaz de produzir pequenas bolhas na região de interface, sem emulsão aparente em relação ao petróleo e hexadecano, mostrando-se mais efetivo na emulsificação do óleo diesel. Deste modo, conclui-se que o controle positivo escolhido não foi bom produtor de biossurfactantes nas condições estabelecidas em nossos experimentos.

No trabalho de Bodour e colaboradores (2003), estudo no qual nos baseamos para selecionar a linhagem usada como controle positivo foi verificada a produção de biossurfactantes por micro-organismos provenientes de solos contaminados. Esta linhagem de *Pseudomonas aeruginosa*, estabelecida como controle positivo para produção de ramnolipídeos, não foi testada para produção de biossurfactante, mas sim como controle positivo em uma técnica de *fingerprint* denominada REP-PCR. No entanto, no presente trabalho, utilizamos esta mesma linhagem também para os testes de triagem baseados em similaridade de sequências, e foi confirmado que ela é portadora dos genes *rhIB*, responsáveis pela síntese de ramnolipídeos.

No caso dos controles, os resultados não foram conclusivos, havendo a

necessidade de repetir os experimentos futuramente para a produção do artigo científico. Para isto, um novo controle positivo será utilizado, uma linhagem de *Dietzia* sp. isolada de reservatório de petróleo da Bacia de Campos, cuja alta produção de emulsificante já foi previamente verificada pela Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos.

3.4. Teste de emulsificação

Os EPS dos nove clones, assim como dos controles positivo e negativo, foram liofilizados e suspensos em água Milli-Q para subsequente avaliação quanto à sua capacidade emulsificante. Como descrito anteriormente, petróleo, óleo diesel ou hexadecano foram utilizados como fontes de hidrocarbonetos.

Esses três compostos são freqüentemente utilizados em trabalhos de biorremediação e degradação, já que representam fontes de contaminações de difícil remoção do ambiente.

Em geral, os clones não foram eficientes na emulsificação dos hidrocarbonetos em solução quando comparados aos controles sintéticos, Tween 80 e Triton X-100 (0,5%), os quais produziram uma emulsão totalmente homogênea. Porém, alguns clones apresentaram a formação de discretas emulsões, com pequenas bolhas na região da interface entre os hidrocarbonetos e os EPS dos clones avaliados. Para avaliar a diferença entre os clones, foi mensurada, com auxílio de uma régua, a formação imediata de emulsão (após o término da agitação em vórtex) e após 24 horas, a fim de verificar sua estabilidade. A estabilidade das emulsões formadas também caracteriza um bom agente emulsificante. Esse fato torna-se de extrema relevância quando se trata de processos de biorremediação (Calvo *et al.*, 2009). É importante salientar que os resultados a seguir são demonstrados após 24 horas da formação da emulsão.

Em relação ao tipo de hidrocarboneto utilizado, também ocorreu variação nos resultados, como por exemplo, clones que emulsificaram óleo diesel, não apresentaram a mesma reação frente ao hexadecano ou petróleo (clones 10B e 11B). Por outro lado, dos nove clones testados, apenas o clone 12A demonstrou eficiência em emulsificar as três fontes de hidrocarbonetos.

Como já explicado, o aspecto da emulsão formada pelos EPS provenientes dos

clones foi muito diferente daquelas emulsões formadas pelos surfactantes sintéticos, ou seja, foi possível a visualização apenas de pequenas bolhas na região de interface e um aumento na fase superior dos sistemas hidrocarboneto/ água + EPS. Os controles negativo e positivo também não apresentaram resultados significativos. A *E. coli* EPI 300 não apresentou emulsificação e a linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* CBMAI 602 não apresentou resultados melhores de emulsificação em comparação aos clones.

A variação de resposta emulsificante frente a diferentes compostos é esperada, já que a estrutura e função dos EPS estão intimamente relacionadas com a composição de cada tipo de biossurfactante, e as diferenças entre eles também influenciam os processos de degradação e emulsificação de hidrocarbonetos. De acordo com Zhang e Miller (1995), a estrutura e composição do biossurfactante podem afetar as taxas de degradação de hidrocarbonetos. Neste trabalho, os pesquisadores citam um exemplo de degradação de alcanos utilizando diferentes tipos de soforolipídeos. Foi observado que o soforolipídeo na forma lactônica não foi capaz de degradar o hidrocarboneto, ao passo que o outro tipo, ligado a moléculas de ácidos, foi eficiente na degradação de alcano.

Neste trabalho, optamos por realizar a extração dos EPS através de diálises com membranas, e a partir daí utilizar o composto purificado para testar sua capacidade emulsificante. No entanto, existem trabalhos que mencionam a utilização do sobrenadante contendo esses metabólitos diretamente sobre os hidrocarbonetos, sem a etapa da diálise e liofilização (Chen *et al.*, 2007).

Em relação ao petróleo, não foi observada a formação de emulsões, somente uma pequena mudança, mensurada em milímetros, na fase superior com os clones 10B e 12A (Figura 4). Como descrito na literatura, o petróleo é um hidrocarboneto viscoso e mais difícil de ser solubilizado, o que poderia explicar os resultados insatisfatórios de emulsificação obtidos.



Figura 4. Teste de emulsificação utilizando petróleo. **Painel A:** Clone 10B e controles surfactantes sintéticos Tween 80 e Triton x100 (da esquerda para a direita), após 24 horas. **Painel B:** Controle positivo *P. aeruginosa* CBMAI 602.

Quanto ao teste utilizando hexadecano, para alguns clones foi observada a formação de pequenas bolhas na interface entre os EPS e o hexadecano, principalmente com o clone 12A e o *pool* 25. (Figura 5). Testes de emulsificação utilizando hexadecano são amplamente descritos na literatura (Navon-Venezia *et al.*, 1995; Cirigliano & Carman, 1984; Noordman *et al.*, 2002).

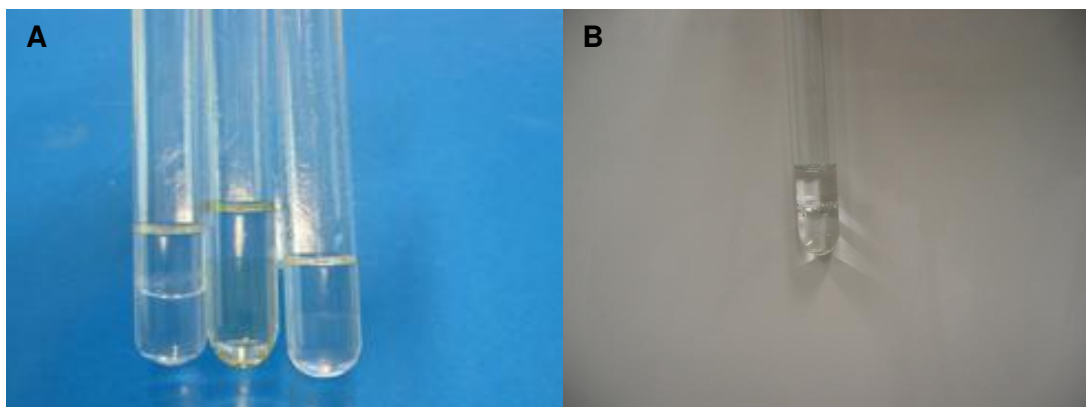


Figura 5. Teste de emulsificação utilizando hexadecano. **Painel A:** Pool 25, Triton X-100 e *E. coli* EPI 300 (da esquerda para a direita), após 24 horas. **Painel B:** controle positivo *P. aeruginosa* CBMAI 602.

No teste utilizando óleo diesel como hidrocarboneto, os clones também apresentaram a formação de pequenas emulsões e bolhas na interface, porém os clones 11B (Figura 6) e 12A apresentaram um pequeno aumento em milímetros no tamanho da fase superior. O óleo diesel é também uma fonte de hidrocarboneto utilizada em estudos

de degradação e biorremediação (Gallego *et al.*, 2001; Kosaric, 2001).

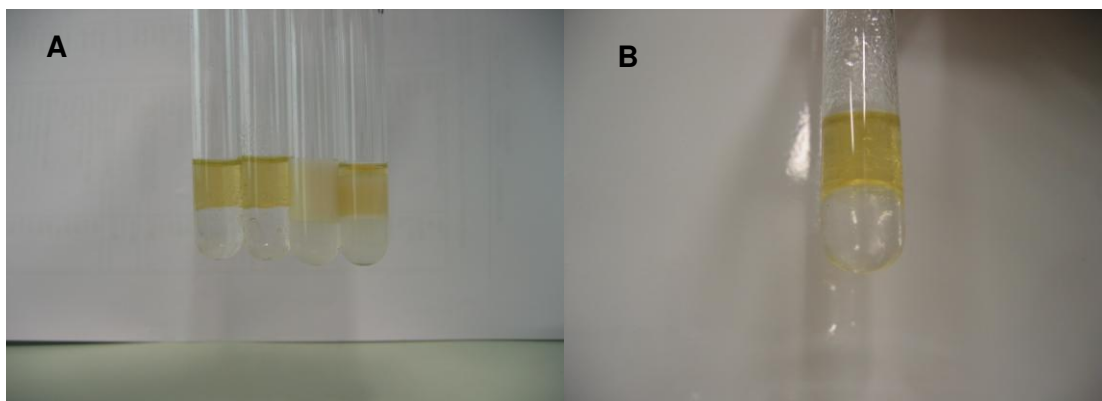


Figura 6. Teste de emulsificação utilizando óleo diesel. **Painel A:** *E. coli* EPI 300, usada como controle negativo, clone 11B, Triton X100 e Tween 80 (da esquerda para a direita), após 24 horas. **Painel B:** controle positivo *P. aeruginosa* CBMAI 602.

Como já relatado, as moléculas de biossurfactantes e bioemulsificantes diferem-se entre si. Os biossurfactantes que têm capacidade de emulsificar substâncias podem não apresentar as mesmas características daqueles que alteram características em interfaces. Bioemulsificantes, geralmente moléculas de maior peso molecular, podem ser produzidos também durante o crescimento microbiano, no entanto não afetam a tensão superficial e interfacial do meio. Esses bioemulsificantes poliméricos são freqüentemente produzidos juntamente com biossurfactantes e seus efeitos podem ser combinados para alterar significativamente a solubilidade de compostos hidrofóbicos em água (Falatko & Novak, 1992). Neste trabalho, isso pôde ser observado ocorrendo em alguns clones, como 10B e 11B, que apresentaram bons resultados nos ensaios de tensiometria, com valores de redução entre 34 e 30 mN/m, e no teste emulsificante. No entanto, os clones 1F e 9H reduziram a tensão interfacial, porém não demonstraram eficiência no teste emulsificante.

4. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos no presente estudo permite concluir que:

- Os enriquecimentos microbianos foram eficientes e possibilitaram recuperação de

DNA viável para construção das bibliotecas;

- As análises de diversidade dos enriquecimentos demonstraram um maior número de gênero encontrados nos enriquecimentos anaeróbios com 5 filos, e um menor número nos aeróbios com 2 filos;
- A diversidade encontrada nos enriquecimentos pode não compreender a diversidade total presente na amostra já que apenas 90 clones de cada enriquecimento foram avaliados;
- Os primers utilizados não foram eficientes na detecção de genes por não haver nenhum clone relacionado com os gêneros *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp.;
- O teste de triagem funcional “colapso da gota” foi eficiente na seleção preliminar de clones produtores de biossurfactantes;
- Os ensaios de tensiometria utilizando meio mineral e hexadecano possibilitaram a seleção de clones que produziram surfactantes;
- Os clones selecionados apresentaram bons resultados na redução de tensão interfacial do meio contendo hidrocarboneto;
- Os biossurfactantes avaliados neste trabalho podem representar compostos ainda não descritos na literatura.

5. CONCLUSÕES GERAIS

O presente trabalho relata um estudo pioneiro em relação à prospecção de genes produtores de biossurfactantes provenientes de reservatórios de petróleo, utilizando uma abordagem metagenômica.

Os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento deste trabalho foram satisfatórios em relação à proposta inicial do projeto. Os protocolos utilizados durante a primeira etapa, que envolveram a realização dos enriquecimentos microbianos aeróbios e anaeróbios, a extração de DNA, assim como a construção das bibliotecas de médio peso, foram desenvolvidos e otimizados. Foi possível melhorar a recuperação de biomassa microbiana a partir dos enriquecimentos com a utilização de matrizes (folhelhos, provenientes de reservatórios) como suporte físico e a obtenção de DNA de qualidade, passível de ser clonado no vetor fosmídeo, gerando uma biblioteca de DNA misto (aeróbio juntamente com anaeróbio) com 31.000 clones. Clones fosmidiais provenientes das bibliotecas de DNA misto foram submetidos a vários testes empregando diferentes metodologias, onde foi possível concluir que alguns deles puderam expressar atividade surfactante ou emulsificante. No entanto, em relação aos ensaios por similaridade de sequência, não foram detectados hits positivos com os *primers* selecionados. Isto pode ser explicado pelo fato de que apenas três pares de *primers* foram utilizados nas reações de PCR, os quais são homólogos a genes que sabidamente ocorrem em *Bacillus* e *Pseudomonas*, já que trabalhos que descrevem *primers* para a detecção de biossurfactantes são escassos. Quando trabalhamos com amostras ambientais contendo comunidades microbianas complexas, como é o caso do presente trabalho, a diversidade encontrada é muito alta e geralmente estão presentes muitas espécies ainda não descritas. Consequentemente, os genes que elas carregam também são desconhecidos na possibilidade de codificar novas moléculas de grande interesse biotecnológico. No Capítulo 1 é descrito a realização da análise da diversidade dos enriquecimentos. Foram encontrados em torno de sete gêneros distintos de bactérias e levando em consideração que *Bacillus* e *Pseudomonas* não estão dentre eles, sugere-se que os polímeros investigados neste trabalho são moléculas ainda não descritas. Ainda no Capítulo 1, ensaios envolvendo degradação de hidrocarbonetos também estão sendo realizados em paralelo com os clones de DNA misto desta biblioteca, ampliando a prospecção por novas moléculas, genes ou vias metabólicas envolvidos em processos de biorremediação e

biodegradação.

Este trabalho apresenta grande relevância científica e tecnológica, pois relata a detecção da produção de biossurfactantes provenientes de um ambiente considerado extremo, através de uma abordagem inovadora que nos possibilita a investigação de micro-organismos não ainda não cultivados, e com grande potencial de aplicação em processos biotecnológicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalos, A.; Pinazo, A.; Infante, M.R.; Casals, M.; Garcia, F.; Manresa, A. (2001). Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes. *Langmuir*, **17**, 1367- 1371.
- Abraham, W.R.; Nogales, B.; Golyshin, P.N.; Ieper, D.H.; Timmis, K.N. (2002) Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Curr Opin Microbiol* **5**, 246-253.
- Aitken, C. M.; Jones, D. M.; Larter, S. R. (2004) Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs. *Nature* **431**: 291-294
- Amann, R. I.; Ludwig, W.; Schleifer, K-L. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169.
- Amaral, P .F. F.; Coelho, M .A. Z.; Marrucho, I. M. ; Coutinho, J.A.P. (2008). Biosurfactants from Yeasts: Characteristics, Production and Application. **Cap. 3.** *Biosurfactants*, edited by Ramkrishna Sen. Landes Bioscience.
- Anmweiller, E.; Michaelis, W.; Meckenstock, R.U. (2002). Identical ring cleavage products during anaerobic degradation of naphthalene, 2-methylnaphthalene, and tetralin indicate a new metabolic pathway *Appl. Environ. Microbiol.* **6**, :852-858.
- Ashby, R. D. ; Solaiman , D. K. Y.; Foglia, T. F. (2008). Property control of sophorolipids: influence of fatty acid substrate and blending. *Biotechnol Lett* **30**:1093–1100.
- Banat, I. M.; Franzetti, A.; Gandolfi I.; Bestetti, G.; Martinotti M.G.; Fracchia L.; Smyth T.J.; Marchant, R.(2010). MINI-REVIEW: Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**, 427–44.
- Bastin, E. (1926) Microorganisms in oil fields. *Science* **63**, 21-24.
- Batista, S. B.; Mounteer, A. H.; Amorim, F. R.; Tótola, M. R. (2006). Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology* **97**, 868–875.
- 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.
- Beja, O., Suzuki, M. T., Koonin, E. V., Aravind, L., Hadd, A., Nguyen, L. P., Villacorta, R., Amjadi, M., Garrigues, C., Jovanovich, S. B., Feldman, R. A., DeLong, E. F. (2000). Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage *Environ. Microbiol.* **2**, 516-529.
- Benincasa, M.; Abalos, A.; Oliveira, I.; Manresa, A. (2004). Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie van Leeuwenhoek* **85**: 1–8
- Blumenkratz, N., Asboe-Hansen, G. (1973). New method. for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* **54**, 484-489.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254

- Bressler, D. C.; Fedorak, P. M. (2001) Identification of disulfides from the biodegradation of dibenzothiophene. *Appl Environ Microbiol.* **67**(11): 5084–5093
- Bodour, A. A., Drees, K. P., Maier, R. M. (2003). Distribution of Biosurfactant-Producing Bacteria in Undisturbed and Contaminated Arid Southwestern Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, n.6, p. 3280–3287.
- Bordoloi, K.; Konwar, B. K. (2008). Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **63**, 72–82.
- Bordoloi, K.; Konwar, B. K. (2009). Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials* **170**, 495–505
- Brint, J. M.; Ohman, D. E. (1995). Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J. Bacteriol.* **177**, 7155-7163.
- Calvo, M. M.; Silva-Castro, G. A.; Uad, I.; González-López, J. (2009). Review: Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *Science of The Total Environment* **407**, 3634 – 3640.
- Cameotra, S. S ; Makkar, R. S. (2004). Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Current Opinion in Microbiology*, **7**:262–266.
- Cameotra, S. S.; Makkar, R. S. (2010). Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. *Pure Appl. Chem.*, **82**, No. 1, pp. 97–116.
- Celik, G. Y.; Aslim, B.; Beyatli, Y. (2008). Characterization and production of the exopolysaccharide (EPS) from *Pseudomonas aeruginosa* G1 and *Pseudomonas putida* G12 strains. *Carbohydrate Polymers*, **73**, 178–182.
- Champion, J. T.; Gilkey, J. C.; Lamparskil, H.; Retterer, J.; Miller, R. M. (1995). Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane. *Journal of Colloid and Interface Science*, n. 170, p. 569-574.
- Chandler, D. P.; Fredrickson, J. K. and Brockman, F. J. (1997). Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Molecular Ecology* **6**, 475-482.
- Chavéz, G. S.; Lépine, F., Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**: 718–725
- Chayabutra, C.; Ju, L-K. (2000). Degradation of n-hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and anaerobic denitrifying conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. **66**, No. 2, p. 493–498
- Chen, C-Y.; Baker S.C.; Richard C. Darton, R.C. (2007). The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. *Journal of Microbiological Methods* **70**, 503–510.
- Cirigliano, M. C.; Carman, G. M. (1984). Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 747-750.
- Coates, J. D.; Woodward, J.; Allen, J.; Philip, P.; Lovley, D. R. (1997). Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3589-3593.
- Costerton, J.W., Irvin, R.T., Cheng, K.-J. (1981). The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **35**, 299-324.

- Costerton, J. W.; Cheng, K.-J.; Geesey, G. G.; Ladd, T. I.; Nickel, J. C.; Dasgupta, M.; Marrie, T. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**, 435-464.
- Cubitto, M. A.; Moran, A. C.; Commendatore, M.; Chiarello, M. N.; Baldini, M. D.; Sineriz, F. (2004). Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. *Biodegradation* **15**: 281–287
- Das, K.; Mukherjee, A. K. (2007). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology* **98**, 1339–1345.
- Das, P., Mukherjee, S.; Sen, R. (2008). Genetic Regulations of the Biosynthesis of Microbial Surfactants: An Overview. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* - Vol. **25**, 165-186.
- Dastgheib, S. M. M; Amoozegar, M. A.; Elahi, F.; Asad, S.; Banat, I.M. (2008). Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. *Biotechnol Lett* **30**:263–270.
- Decho, A. W. (2000) Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* **20**, 1257-1273.
- Deleu, M.; Paquot, M. (2004) From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. *C. R. Chimie* **7**, 641–646.
- Desai, J. D.; Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 47-64.
- Deziel, E.; Paquette, G.; Villemur, R.; Lepine, F.; Bisailon, J-G. (1996). Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Applied And Environmental Microbiology*, **v.62**, 1908–1912.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A; Smith, F. (1956). Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350-356.
- Falatko, D. M.; Novak, J. T. (1992). Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons. *Water Environment Research*, Vol. **64**, No. 2, pp. 163-169.
- Fernandes, P. A. V.; Arruda, I. R.; Santos, A. F. A. B.; Araújo, A. A.; Maior, A .M. S ; Ximenes, E. A. (2007). Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, **38**:704-709.
- Flemming, H. C, Wingender, J., Mayer, C., Körstgens, V., Borchard, W., (2000). Community Structure and Cooperation in Biofilms. *Cambridge University Press*, Cambridge, pp. 87-105.
- Flemming, H. C.; Neu, T.R.; Wozniak, D.J. (2007). The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells, *Journal Of Bacteriology*,. 7945–7947.
- Ford, A.; Fitzgerald, G. F. (2003). Molecular organization of exopolysaccharide (EPS) encoding genes on the lactococcal bacteriophage adsorption blocking plasmid, p CI658, *Plasmid* **49**. 130-142.
- Gallego, J. L. R.; Loredó, J. ;Llamas, J. F.; Vazquez, F.; Sanchez, J. (2001). Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation* **12**, 325–335.
- Galvão, T. C.; Mohn, W. W.; Lorenzo, V. (2005). Exploring the microbial biodegradation and biotransformation gene pool. *Trends in Biotechnology*, **v. 23**, 10, pp. 497-506

- Gautam, K. K. ; Tyagi, V. K. (2006). Microbial Surfactants: A Review. *Journal of Oleo Science*, **v. 55** No.4, 155-166
- Gehr, R., Henry, J. G. (1983). Removal of extracellular material. *Water Res.* **17**, 1743-1748.
- Ghojavand, H.; Vahabzadeh, F.; Mehranian, M.; Radmehr, M.; Shahraki, K. A.; Zolfagharian, F.; Emadi, M. A.; Roayaei, E. (2008). Isolation of thermotolerant, halotolerant, facultative biosurfactant-producing bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **80**:1073–1085
- Goldemberg, J.; Lucon, O. (2007). Energy and environment in Brazil, *Estudos Avançados*, **21 v. 59**.
- 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* , **v. 47**. No. 2, 505-509.
- Grishchenkov, V. G.; Townsend, R. T.; McDonald, T. J.; Autenrieth, R. L.; Bonner, J. S.; Boronin, A. M.(2000) Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process Biochemistry* **35**, 889–896.
- Hårdeman, F.; Sjöling, S. (2007) Metagenomic approach for the isolation of a novel low-temperature-active lipase from uncultured bacteria of marine sediment. *FEMS Microbiol. Ecology*, **V. 59**, Issue 2, pages 524–534.
- Hamann, C., Hegemann, J., Hildebrandt, A. (1999). Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation genes in different soil bacteria by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *FEMS Microbiol. Lett.* **171**, 255-263.
- Handelsman, J.; Rondon, M. R.; Brady, S. F., Clardy, J. & Goodman, R.M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* **5**, 245-249.
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **v. 68**, No. 4, 669–685
- Head, I. M.; Jones D. M.; Larter S. R. (2003). Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature*. **426**, 344-52.
- Heider, J.; Spormann, A. M.; Beller, H. R.; Widdel, F. (1999). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 459-473.
- Henne A., Daniel R., Schmitz R.A. & Gottschalk G. (1999). Construction of environmental DNA libraries in Escherichia coli and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol.* **65**, 3901-7.
- Herman, D. C.; Zhang, Y.; Miller, R. M. (1997). Rhamnolipid (Biosurfactant) Effects on Cell Aggregation and Biodegradation of Residual Hexadecane under Saturated Flow Conditions *Applied and Environmental Microbiology*, **v. 63**, No. 9,p. 3622–3627.
- Hewald, S.; Josephs, K.; Bolker, M. (2005). Genetic Analysis of Biosurfactant Production in *Ustilago maydis*. *Applied And Environmental Microbiology*, **v. 6**, p. 3033–3040
- Heyd, M.; Kohnert, A.; Tan, T-H.; Nusser, M.; Kirschhöfer, F.; Brenner-Weis, G.; Franzreb, M.; Berensmeier, S. (2008). Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. *Anal Bioanal Chem.* **391**:1579–1590.
- Holliger, C. & Zehnder, A. J. (1996) Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**(3): 326-330.

- Hsieh, F. C.; Li, M. C.; Lin, T. C.; Kao, S. S. (2004). Rapid Detection and Characterization of Surfactin-Producing *Bacillus subtilis* and Closely Related Species Based on PCR. *Current Microbiology*, **v. 49**, pp. 186–191.
- Hugenholtz, P.; Goebel, B. M.; Pace, N. R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* **180**, 4765–4774.
- Ilori, M. O.; Adebuseye, S. A.; Ojo, A. C. (2008). Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing yeast strains obtained from a polluted lagoon water. *World J Microbiol Biotechnol* **24**: 2539–2545
- Kanally, R. A.; Harayama, S. (2000). Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *J. Biotech.* **182**, 2059–2067.
- 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*, **v. 68**, No. 4, p. 1516–1523.
- Kim, Y. J.; Choi, G-S.; Kim, S-B.; Yoon, G-S.; Kim, Y-S.; Ryu, Y-R (2006). Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. *Protein Expression and Purification* **45**, 315–323.
- Klock, J. H.; Wieland, A.; Seifert, R.; Michaelis, W. (2007). Extracellular polymeric substances (EPS) from cyanobacterial mats: characterisation and isolation method optimization. *Marine Biology*, **152**, 1077–1085.
- Korda, A; Santas, P.; Tenente, A.; Santas, R. (1997). Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 677–686.
- Korenblum, E.; Valoni, E.; Penna, M.; Seldin, L. (2010). Bacterial diversity in water injection systems of Brazilian offshore oil platforms. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**:791–800.
- Kosaric, N. (1992). Biosurfactants in industry. *Pure & Appl. Chem.*, **v. 64**, No. 11, pp. 1731–1737,
- Kosaric, N. (2001). Biosurfactants and Their Application for Soil Bioremediation. *Food Technol. Biotechnol.* **39 (4)** 295–304
- Lang, S. (2002). Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **7**, 12–20.
- Leahy, J. G.; Colwell, R. R. (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev.*; **54(3)**: 305–315
- Lee, S-W.; Won, K.; Lim, H .K.; Kim, J. C.; Choi. G. J.; Cho, K. Y. (2004) Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Appl Microbiol* **65**: 720–726.
- Li, D.; Hendry, P. (2008). Microbial diversity in petroleum reservoirs. *Microbiology Australia* **V.29** No. 1.
- Lopes, J. A. D.; Santos Neto, E. V.; Mello, M. R.; Koike, L.; Marsaioli, A. J. ; Reis, F. A. M. (1999). 3-Alkyl and 3-carboxyalkyl steranes in marine evaporitic oils of the Potiguar Basin, Brazil. *Chemical Geology* **158**, 1–20.
- Lorenz, P.; Liebeton, K.; Niehaus, F.; Eck, J. (2002). Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space *Curr. Opin. Biotech.* **13**, 572–577.

- Lysnes, K.; Bødtker, G.; Torsvik, T.; Bjørnstad, E. Ø.; Sunde, E. (2009). Microbial response to reinjection of produced water in an oil reservoir. *Appl Microbiol Biotechnol.* **83**, p. 1143–1157
- Magot, M.; Ollivier, B.; Patel, B. K. C. (2000). Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek* **77**, 103-116.
- Martínez-Checa, F.; Toledo, F. L.; Vílchez, R.; Quesada, E.; Calvo, C. (2002). Yield production, chemical composition and functional properties of emulsifier H28 synthesized by *Halomonas eurihalina* strain H-28 in media containing various hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**, 358–363.
- McInerney, M. J.; Knapp, R. M.; Duncan, K.; Simpson, D. R.; Youssef, N.; Ravi, N.; Folmsbee, M.J.; Fincher, T.; Maudgalya, S.; Davis, J.; Weiland, S. (2007) Development of an *in situ* biosurfactant production technology for enhanced oil recovery. **Final Report**.
- Mohriak, N. U., Mello, M. R., Dewey, J. F., Maxwell, J. R. (1990). In *Classic Petroleum Provinces*; Brooks, J., ed., Geological Society, London, pp.119-141.
- Moreira, D.; Rodriguez-Valera, F.; Lopez-García, P.(2006). Metagenomic analysis of mesopelagic Antarctic plankton reveals a novel deltaproteobacterial group. *Microbiology*, **152**, 505–517.
- Mukherjee, S.; Das, P.; Sen, R. (2006). Towards commercial productions of microbial surfactant, *Trends biotechnol.* **24**, 509-515.
- Mulligan, C. N.; Yong, R. N.; Gibbs, B. F. (2001). Heavy metal removal from sediments by biosurfactants . *Journal of Hazardous Materials* **85**, 111–125
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution* **133**: 183–198.
- Mulligan, C. N. (2009). Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **14**, 372–378.
- Muthusamy, K.; Gopalakrishnan, S.; Ravi, T. K.; Sivachidambaram, P. (2008). Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Current Science*, **v. 94**, n° 6.
- Navon-Venezia, S.; Zosim, Z.; Gottlieb, A.; Legmann, R.; Carmeli, S.; Ron, E. Z.; Rosenberg, E. (1995). Alasan, a New Bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Applied and Environmental Microbiology*, **v. 61**, No. 9, p. 3240–3244
- Neu, T. (1996). Significance of Bacterial Surface-Active Compounds in Interaction of Bacteria with Interfaces. *Microbiological Reviews*, **v. 60**, No. 1 p. 151–166.
- Nguyen, T. T.; Youssef, N. H.; McInerney, M. J.; Sabatini, D.A. (2008) Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. *Water Research* **42**, 1735– 1743.
- Nitschke, M.; Costa, S.G.V.A.O. (2007). Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science & Technology* **18**, 252-259.
- Noordman, W. H.; Wachter, J. H. J.; Boer, G. J.; Janssen, D. B. (2002). The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. *Journal of Biotechnology* **94**, 195–212.
- Ochsner, U. A.; Koch, A. K.; Fietcher, A.; Reiser, J. (1994). Isolation and Characterization of a Regulatory Gene Affecting Rhamnolipid Biosurfactant Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, p. 2044-2054.
- Ochsner, U. A.; Reiser, J.; Fiechter, A.; Witholt, B. (1995). Production of *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipid Biosurfactants In Heterologous Hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, **v. 61**, No. 9, p.3503–3506.

- 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**, 288-292.
- Oliveira, V. M.; Sette, L. D.; Simioni, K. C. M.; Santos Neto, E. V. (2008). Bacterial diversity characterization in petroleum samples from Brazilian reservoirs. *Braz. J. Microbiol.* **v.39** no.3
- Orphan, V. J.; Taylor, L. T.; Hafenbradl, D.; Delong, E. F. (2002). Culture-Dependent and Culture-Independent Characterization of Microbial Assemblages Associated with High-Temperature Petroleum Reservoirs. *Applied and Environmental Microbiology*, **v. 66**, No. 2, p. 700–711
- Peters, K. E., Moldowan, J. M. (1993). *The Biomarker Guide*, 1th ed., Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- Pitcher, D. G.; Saunders, N. A.; Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in applied microbiology*, **v. 8**, issue 4, pgs. 151-156.
- Pospiech, A.; Neumann, B. (1995) A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends Genetics* **11(6)**: 217-218.
- Rahman, P. K. S. M. ; Gakpe, E. (2008). Production, Characterization and Application of Biosurfactant - Review. *Biotechnology*, **7 (2)**, pp. 360-370.
- Ron, E. Z. & Rosenberg, E. (2001) Natural roles of biosurfactants. *Environ Microbiol* **3**, 229-236.
- Ron, E. Z. & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr Op Biotechnol* **13**:249-252.
- Röling, W. F. M.; Head, I. M.; Larter, S. R. (2003). The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. *Res. Microbiol.* **154**, 321- 328.
- Rondon, M. R.; Goodman, R. M. & Handelsman, J. (1999). The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *Trends Biotechnol.* **17**, 403-409.
- Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, I. A., Liles M. R., Loiacono, K. A., Lynch, B. A., MacNeil, I. A., Minor, C., Tiong, C. L., Gilman, M., Osburne, M. S., Clardy, J., Handelsman, J., Goodman, R. M. (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2541-2547.
- Rosenberg, E.; Ron, E. Z. (1999). High- and low-molecular-mass microbial surfactants, Mini-Review: *Appl Microbiol Biotechnol* **52**, 154-162.
- Sander, P. F.; Sturman, P. J. (2005) Biofouling in the oil industry. *Petroleum Microbiology*, Cap. **9**, pp. 171-197, ASM Press, Washington, D.C
- Schmeisser, C.; Wolfgang, H.S.; Streit, R. (2007). Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**:955–962
- 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.
- Shi, Y., Ji, R.-L., Wang, S.-J., Zheng, Y., Liu, H. (2008). Screening and evaluation of bacterial species using petroleum hydrocarbon as the sole carbon source for oil recovery. *Shiyou Xuebao/Acta Petrolei Sinica* **29** (1), pp. 111-115

- Shreve, G. S., Inguva, S., Gunnam, S. (1995) Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Mar Biol Biotechnol* **4**, 331-337.
- Singh, P.; Cameotra, S. S. (2004). Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnology*, **Vol.22**, No.3
- Singh, A.; Van Hamme, J. D.; Ward, O. P. (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances* **25**, 99–121.
- Stanghellini, M. E.; Miller, R. M. (1997). Biosurfactants: Their Identity and Potential Efficacy in the Biological Control of Zoospore Plant Pathogens. *Plant Disease*, **v. 81** N°1.
- Stingle, F.; Neeser, J. R.; Mollet, B. (1996). Identification and characterization of eps (exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J. Bacteriol.* **178**, 1680-1690.
- Sullivan, E. R. (1998). Molecular genetics of biosurfactant production. *Current Opinion in Biotechnology*, **9**:263-269.
- Sutherland. I. W. (2001). Mini-Review: Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, **147**, 3–9.
- Takai, K.; Inoue, A.; Horikoshi, K. (2002). Methanothermococcus okinawensis sp. nov., a thermophilic, methane-producing archae on isolated from a Western Pacific deep-sea hydrothermal vent system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 1089–1095.
- Tan, H.; Champion, J. T.; Artiola, J. F.; Brusseau, M. L.; Miller, R. M. (1994). Complexation of Cadmium by a Rhamnolipid Biosurfactant. *Environ. Sci. Technol.* **28**, 2402-2406
- Tango, M. S. A., Islam, M. R. (2002) Potential of extremophiles for biotechnological and petroleum applications. *Energy Sources* **24**, 543-559.
- Tuleva, B. K.; Ivanovb, G. R.; Christova, N. E. (2002). Biosurfactant Production by a New *Pseudomonas putida* strain. *Z. Naturforsch.* **57c**, 356-360
- Van Hamme, J. D., Singh, A., Ward, O. P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 503-549.
- Van Hamme, J. D.; Singh, A.; Ward, O. P. (2006). Part 1: Physiological aspects in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances* **24**, 604–620.
- Vasconcellos, S. P. (2006). Atividades Enzimáticas e de Biodegradação de Microrganismos do Petróleo da Bacia de Campos (Pampo Sul). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas.
- Vasconcellos, S. P.; Angolini, C. F. F.; Garcia, I. N. S.; Dellagnezze, B. M.; Silva, C. C.; Marsaioli, A. J.; Neto, E. V. S.; Oliveira, V. M. (2010). Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs. *Organic Geochemistry* **41**, 675–681
- Wang, L.; Li, S.; Li, Y. (2003) Identification and characterization of a new exopolysaccharides biosynthesis gene cluster from *Streptomyces*, *FEMS Microbiol. Lett.* **220**, 21–27
- Wang, D., Liu, Y., Yang, Z., Hao, C. (2008). Application of surfactin in microbial enhanced oil recovery . *Shiyou Xuebao/Acta Petrolei Sinica* **29** (1), pp. 111-115.

- Ward, D. M.; Weller, R.; Bateson, M. M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **345**, 63-65.
- Whang, L.-M.; Liu, P.-W. G., Ma, C. C.; Cheng, C.-C. (2008). Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of Hazardous Materials* **151**, 155–163.
- White, N.; Thompson, M.; Barwise, T. (2003). Understanding the thermal evolution of deep-water continental margins. *Nature* **426**, 334-343.
- Zhang, C. L.; Li, Y.; Ye, Q.; Fong, J.; Peacock, A.D.; Blunt, E.; Fang, J.; Lovley, D.R.; White, D.C. (2003). Carbon isotope signatures of fatty acids in *Geobacter metallireducens* and *Shewanella algae*. *Chem. Geol.* **195**, 17-28.
- Zhang, Y.; Miller, R. (1992). Enhanced Octadecane Dispersion and Biodegradation by a *Pseudomonas* Rhamnolipid Surfactant (Biosurfactant). *Applied and Environmental Microbiology*, p. 3276-3282
- Zhang, Y.; Miller, R. (1995). Effect of Rhamnolipid (Biosurfactant) Structure on Solubilization and Biodegradation of n-Alkanes. *Applied and Environmental Microbiology*, **v.61**, n.6, p. 2247–2251
- Zylstra, G.J.; Gibson, D.T. (1991). Aromatic hydrocarbon degradation: a molecular approach. *Gen. Eng. New York* **13**, 183-203.

ANEXOS

**Aprovação do Comitê Interno de Biossegurança (CIBio) para manipulação de
OGM (organismos geneticamente modificados)**



CPQBA

Comissão Interna de Biossegurança - CIBio

Formulário de Proposta de Projeto



A ser preenchido pela CIBio		<i>Formulário CIBio-FPP- Rev. 00</i>	
Analizado em:	8 / 5 / 08	Número do Projeto:	16 / 08
Por:	Adria Regina Rodrigues	Data de entrada:	14 / 04 / 08
Assinatura:	<i>Adria Regina Rodrigues</i>	Situação:	☒ Aprovado ☐ Reprovado

Projeto de Pesquisa

Título: Bioprospecção de genes envolvidos na síntese de biossurfactantes a partir de microbiota anaeróbia de reservatórios de petróleo	
Data de início do projeto (mês/ano): 03/2008	Data prevista de conclusão (mês/ano): 02/2010

Pesquisador Principal

Nome: Valéria Maia Merzel		
Endereço: DRM, CPQBA/UNICAMP, R: Alexandre Cazellato, 999 Vila Betel, Paulínia SP		
e-mail: vmaia@cpqba.unicamp.br	Telefone: (19) 3884-7500	Fax: (19) 3884-7811

Organismos

Receptor: <i>Escherichia coli</i> EPI300- T1 ^R	Parental: bactérias presentes em amostras de água de formação e óleos de reservatórios de petróleo.
---	---

Material Genético Incluído no OGM:

- Grandes fragmentos de DNA genômico de bactérias isolados de cultivos enriquecidos para bactérias anaeróbias, usando as amostras de água de formação e óleos como inóculo, e clonados em *E. coli*.

Vetor: fosmideo

Classificação do OGM

☒ Tipo I	☐ Tipo II
--	----------------------------------

Classificação do Nível de Biossegurança do Laboratório

☒ NB-1	☐ NB-2	☐ NB-3	☐ NB-4
--	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------



CPQBA

Comissão Interna de Biossegurança - CIBio

Formulário de Proposta de Projeto



Objetivo do Projeto

O objetivo da presente proposta é avaliar o potencial biossintético da microbiota anaeróbia presente em amostras de águas de formação de petróleo e óleos sob diferentes estágios de biodegradação, através da construção de uma biblioteca metagenômica de cultivo enriquecido em condições anaeróbias, com subsequente triagem visando a obtenção de clones, ou consórcios destes, que apresentem capacidade de produção de biossurfactantes. As atividades biossurfactantes dos clones obtidos serão caracterizadas através das taxas de produção de exopolímeros (EPS) e análises colorimétricas dos mesmos. A atividade bioemulsificante dos clones sobre o petróleo bruto será aplicada como critério de triagem para a seleção de microrganismos a serem investigados quanto à atividade biodegradadora de petróleo através de análises de CG e CG-EM.

O trabalho em contenção objetiva a liberação posterior para o meio ambiente?

☐ Sim

☒ Não

Laboratório onde as pesquisas com o OGM serão desenvolvidas

- Lab. Sistemática Molecular e Genômica, Lab. Microbiologia Ambiental e Industrial e Sala dos Equipamentos de Preservação, na Divisão de Recursos Microbianos do CPQBA.
- Sala de Esterilização, na Divisão de Microbiologia do CPQBA.
- Sala de equipamentos LINST do CPQBA.

Equipe (Nome e função)

- Dra. Valéria Maia Merzel, orientadora do projeto de mestrado.
- Dra. Suzan Pantaroto Vasconcelos, co-orientadora do projeto de mestrado.
- Bruna Martins Dellagnezze, aluna de mestrado que desenvolverá o projeto.
- Dr. Eugênio Vaz dos Santos Neto, responsável pelo projeto na Petrobras.

Equipamentos utilizados durante o trabalho com contenção do OGMs

- Sequenciador automático Mega Bace (GE Health Care)
- Microcentrifuga de placas Eppendorf
- Microcentrifuga para tubos de 1,5 mL Eppendorf
- Freezer -80°C, freezer -20°C
- Geladeiras
- Banho-maria



- Autoclave (Divisão de Microbiologia)
- Shaker de bancada
- Fluxos laminares
- Incubadoras BODs
- Micropipetadores automáticos (diferentes volumes)
- Termociclador automático (PCR)
- Sistemas de eletroforese de DNA
- Sistema de eletroforese de campo pulsado
- Transiluminador UV e fotodocumentador
- Sistema de gases de anaerobiose
- Cromatógrafos

Procedimentos de limpeza, desinfecção, descontaminação e descarte de material/resíduos

- Antes e após a manipulação de OGMs, o fluxo laminar é descontaminado com álcool 70% e luz UV por 15 min.
- Todos os materiais (meios, placas, tubos, ponterias) são descartados após descontaminação em autoclave (ciclo de descontaminação padrão). Soluções contaminadas com DNA são descartadas em frasco com solução de hipoclorito 0,5% e posteriormente os frascos com solução de descarte são autoclavados.
- Material utilizado na manipulação de OGM's é segregado para descarte em um saco de lixo identificado.
- As bancadas são descontaminadas diariamente após término dos experimentos com álcool 70% e hipoclorito 0,5%. Piso do laboratório é limpo com solução de hipoclorito 0,5%.



CPQBA

Comissão Interna de Biossegurança - CIBio

Formulário de Proposta de Projeto



Termo de Responsabilidade

Projeto: Estudos metagenômicos da comunidade microbiana anaeróbia de águas de formação e óleos da Bacia de Campos e investigação do seu potencial biocatalítico.

Eu, **Valéria Maia Merzel**, Pesquisador(a) responsável pelo projeto, asseguro à CIBio/CPQBA-UNICAMP que:

- Li as Instruções Normativas da CTNBio, pertinentes para trabalhar com os OGMs acima referidos, que se encontram no site <http://www.ctnbio.gov.br/ctnbio/default.htm> e que concordo com as suas exigências durante a vigência deste projeto.
- A equipe que participa deste projeto também está ciente das referidas Instruções Normativas e é competente para executá-las.
- Comprometo-me a solicitar nova aprovação à CIBio local sempre que ocorra alteração significativa nos objetivos/procedimentos/instalações aqui descritos e a lhe fornecer um relatório anual de andamento do projeto.
- Tudo que foi declarado é a absoluta expressão da verdade. Estou ciente de que o eventual não cumprimento das Instruções Normativas da CTNBio é de minha total responsabilidade e que estarei sujeito às punições previstas na legislação em vigor.

Data: 14/04/2008

Assinatura do Pesquisador Principal:

Coordenador da Divisão:

Dra. Valéria Maia Merzel

Assinatura:

Deliberação CIBio: ☒ Aprovado ☐ Reprovado

Data: 8 / 5 / 08

Assinatura do Presidente da CIBio: