



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

TIAGO RODRIGUES E SILVA

**“CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DA MICROBIOTA
PRESENTE EM AMOSTRAS DE PETRÓLEO DE
RESERVATÓRIOS BRASILEIROS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
TIAGO RODRIGUES E SILVA
e aprovada pela Comissão Julgadora
Valéria Maia Merzel

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Biologia
Molecular, na área da Genética de
Micro-organismos.

Orientador: Profa. Dra. Valéria Maia Merzel,

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Si38c **Silva, Tiago Rodrigues e**
Caracterização polifásica da microbiota presente em amostras de petróleo de reservatórios brasileiros / Tiago Rodrigues e Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadora: Valéria Maia Merzel.

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

1. Ecologia microbiana. 2. Petróleo - Microbiologia.
3. RNA ribossômico 16S. 4. Atividade antimicrobiana.
5. Ciatina. 6. Petróleo – Biodegradação. I. Merzel, Valéria Maia. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Polyphasic analysis of microbial communities in petroleum samples from brazilian oil-fields.

Palavras-chave em inglês: Microbial ecology; Petroleum - Microbiology; 16S Ribosomal RNA; Antimicrobial activity; Cyathin; Petroleum – Biodegradation.

Área de concentração: Genética de Microorganismos.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Valéria Maia Merzel, Suzan Pantaroto Vasconcelos, Wellington Luiz Araújo.

Data da defesa: 13/09/2010.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

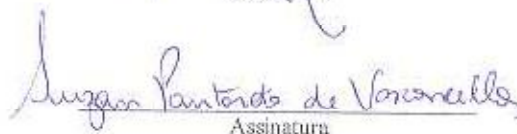
Campinas, 13 de setembro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Valéria Maia Merzel (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Suzan Pantaroto Vasconcellos


Assinatura

Prof. Dr. Wellington Luiz Araújo


Assinatura

Profa. Dra. Lara Durães Sette

Assinatura

Profa. Dra. Cristine Rossi Nakayama

Assinatura

Dedico este trabalho
aos meus pais
Sérgio e Neide, que me deram todo
o suporte necessário para
continuar os estudos, com carinho.

Agradecimentos:

Agradeço primeiramente a oportunidade dada pela profa. Dra. Valéria Maia de Oliveira por ter feito parte de uma equipe de excelência científica como esta, da qual muito aprendi e fiz grandes amizades. Agradeço também a confiança em mim depositada para “caminhar com minhas pernas” ao longo do desenvolvimento do projeto.

Agradeço a Dra. Mary Ann Foglio bem como a aluna Karina Alves do departamento de Fitoquímica do CPQBA pelos esforços e paciência despendidos no ensino da química. Aos colaboradores do departamento de farmacologia do CPQBA liderado pelo prof. João Ernesto de Carvalho e à pesquisadora do IQ-Unicamp Anita Marsaioli e seus alunos. Ainda ao colaborador Eugênio V. Santos Neto do CENPES/Petrobras pela facilitação do envio das amostras de petróleo.

Aos companheiros de bancada com quem muito aprendi e que de alguma forma ou outra tornaram as rotinas de laboratório mais suportáveis.

À Capes e Petrobras pelo financiamento da pesquisa.

Um abraço também para aqueles não fizeram parte diretamente do desenvolver do projeto, mas que pela amizade e convivência nos faz melhor. Subako de Kobra, Rep. Luz Vermelha, aos amigos da Biologia, aos amigos do handebol de Indaiatuba e da Unicamp, aos do futebol de campo e do futebol muleke, aos amigos de Poços, aos Manoplas, a meus familiares, Sérgio e Neide e irmãos Serginho e Sofia.

“A admiração começa onde acaba a compreensão.” **Darwin**

Resumo

Silva, T.R. Caracterização polifásica da microbiota presente em amostras de petróleo de reservatórios brasileiros. 2010. Dissertação de Mestrado – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Estudos realizados em reservatórios de petróleo têm evidenciado que parte da microbiota 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. A investigação de micro-organismos com potencial para biodeterioração, biodegradação e biocorrosão encontrados em depósitos petrolíferos é de grande importância, uma vez que estes organismos podem estar relacionados com a perda da qualidade do petróleo nos reservatórios e etapas subseqüentes de exploração. Este estudo teve como finalidade comparar a microbiota presente em amostras de óleo de dois poços de petróleo terrestres da Bacia Potiguar (RN), identificados como GMR75 (poço biodegradado) e PTS1 (poço não-biodegradado). As comunidades microbianas foram estudadas usando técnicas de cultivo (enriquecimentos microbianos e isolamento) e independentes de cultivo (construção de bibliotecas de genes RNAr 16S). Os micro-organismos cultivados de ambos os poços mostraram-se afiliados aos filos Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria. As bibliotecas de gene RNAr 16S foram construídas a partir de DNA total extraído do petróleo bruto. Ambas as bibliotecas de bactérias revelaram uma grande diversidade, com 8 filos diferentes para o poço GMR75, Actinobacteria, Bacteroidetes, Deferribacteres, Spirochaetes, Firmicutes, Proteobacteria, Thermotoga e Synergistetes, e 5 filos para o poço PTS1, Actinobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Proteobacteria e Thermotogae. A biblioteca de genes RNAr 16S de arqueias só foi obtida para o poço GMR75 e todos os clones encontrados mostraram-se relacionados a membros da ordem Methanobacteriales. Os resultados de diversidade sugerem que a metanogênese é o processo terminal dominante no poço, o que indica uma biodegradação anaeróbia. A comparação dos estudos dependente e independente de cultivo mostrou que alguns gêneros, como *Janibacter*, *Georgenia*, *Saccharopolyspora*, *Tessaracoccus*, *Brevundimonas* e *Brachymonas* não foram encontradas na abordagem independente de cultivo, sugerindo que mais clones devam ser seqüenciados para cobrir toda a diversidade presente na amostra. Nossa hipótese de que poderia haver algum agente antimicrobiano inibindo o crescimento de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos no poço não-biodegradado não foi confirmada. No entanto, durante os testes realizados, uma bactéria, *Bacillus pumilus*, isolada em estudos anteriores de reservatórios da Bacia de Campos, apresentou resultados positivos de inibição para todas as linhagens testadas como indicadoras, e os testes de caracterização do composto revelaram ser este um diterpeno da classe das Ciatinas.

Palavras-chave: Microbiologia do petróleo; Diversidade microbiana, Bibliotecas de genes RNAr 16S; Produção de antimicrobianos; Ciatina.

Abstract

Silva, T.R. Polyphasic analysis of microbial communities in petroleum samples from brazilian oil fields. 2010. Master Thesis (Genetics of Microorganisms) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Recent studies from oil fields have shown that microbial diversity is represented by bacteria and archaea of wide distribution, and that many of these organisms have potential to metabolize organic and inorganic compounds. The potential of biodeterioration, biodegradation and biocorrosion by microorganisms in oil industry is of great relevance, since these organisms may be related with the loss of petroleum quality and further exploration steps. The aim of the present study was to compare the microbial communities present in two samples from terrestrial oil fields from Potiguar basin (RN - Brazil), identified as GMR75 (biodegraded oil) and PTS1 (non-biodegraded oil). Microbial communities were investigated using cultivation (microbial enrichments and isolation) and molecular approaches (16S rRNA gene clone libraries). The cultivated microorganisms recovered from both oil-fields were affiliated with the phyla Actinobacteria, Firmicutes and Proteobacteria. The 16S rRNA gene clone libraries were constructed from metagenomic DNA obtained from crudeoil. Both bacterial libraries revealed a great diversity, encompassing representatives of 8 different phyla for GMR75, Actinobacteria, Bacteroidetes, Deferribacteres, Spirochaetes, Firmicutes, Proteobacteria, Thermotogae and Synergistetes, and of 5 different phyla, Actinobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Proteobacteria and Thermotoga, for PTS1. The archaeal 16S rRNA clone library was obtained only for GMR75 oil and all phylotypes were affiliated with order Methanobacteriales. Diversity results suggest that methanogenesis is the dominant terminal process in GMR75 reservoir, driven by anaerobic biodegradation. The cross-evaluation of culture-dependent and independent techniques indicates that some bacterial genera, such as *Janibacter*, *Georgenia*, *Saccharopolyspora*, *Tessaracoccus*, *Brevundimonas* and *Brachymonas*, were not found using the the 16S rRNA clone library approach, suggesting that additional clones should be sequenced in order to cover diversity present in the sample. Our hypothesis that biodegrading bacterial populations could be inhibited by antimicrobial-producing microorganisms in the non biodegraded oil field (PTS1) was not confirmed. However, one *Bacillus pumilus* strain, previously isolated from Campos Basin reservoirs, showed positive results in inhibitory tests for all indicator strains. Chemical analyses allowed us to identify the compound as a diterpen from the Cyathin class.

Keywords: Petroleum Microbiology, Microbial diversity, 16S rRNA gene libraries, Antimicrobial production, Cyathin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Comunidades microbianas associadas ao petróleo	3
2.2 Degradação microbiana de hidrocarbonetos do petróleo	5
2.3 Métodos moleculares no estudo da diversidade de micro-organismos	7
2.4 Produção de antimicrobianos e seu uso na indústria do petróleo	9
3 OBJETIVOS	10
3.1 <i>Objetivos Específicos</i>	10
4 MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1 Coleta das amostras	11
4.2 Enriquecimentos microbianos aeróbios	11
4.3 Identificação dos isolados bacterianos	12
4.4 Extração de DNA ambiental	12
4.5 Construção de bibliotecas de genes RNAr 16S	13
4.6 Amplificação e sequenciamento dos fragmentos de DNAr 16S clonados	14
4.7 Análise das sequências	14
4.8 Análises estatística de diversidade	15
4.9 Ensaio da atividade antimicrobiana	15
4.10 Cultivo das bactérias produtoras de antimicrobianos	15
4.11 Obtenção de extratos de <i>Bacillus pumilus</i> SG-32 e análises cromatográficas	16
4.11.1 Extração dos princípios ativos das células bacterianas:	16
4.11.2 Método de purificação cromatográfica	17
4.11.3 Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)	17
4.11.4 Análise Qualitativa por Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massas (CG-MS)	18
4.11.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	18
4.12 Ensaio bioautográfico	19
4.13 Ensaios farmacológicos para a determinação da atividade anticâncer “ <i>in vitro</i> ”	19
5 FLUXOGRAMA DETALHADO DAS ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DO PROJETO	22
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23

6.1 Enriquecimentos microbianos aeróbio	23
6.2 Extração de DNA e PCR do gene RNAr 16S	25
6.3 Construção de bibliotecas do gene RNr 16S e sequenciamento	27
6.4 Significância ecológica dos membros dominantes das comunidades	32
6.5 Hipóteses para o processo de degradação de hidrocarbonetos	35
6.6 Análises de diversidade	41
6.7 Ensaio da atividade antimicrobiana	43
6.8 Resultados do estudo da produção de antimicrobianos	45
6.8.1 Testes antiproliferativo “in vitro”	45
6.8.2 Caracterização cromatográfica da substância antimicrobiana de <i>Bacillus pumilus</i> SG-32	48
7 CONCLUSÕES	55
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	67

1. INTRODUÇÃO

O ecossistema presente nas profundidades do subsolo terrestre tem se mostrado muito mais complexo fisiológica e filogeneticamente do que se pensava anteriormente (Amend & Teske, 2004). A presença de microorganismos em ambientes profundos há tempos já é conhecida. Em meio a esses habitats peculiares encontram-se os reservatórios de petróleo, caracterizados por apresentarem condições extremas, como altas temperaturas, alta pressão, alta salinidade e condições anóxicas (Li *et al.*, 2007b), as quais contribuem para constituir um nicho ecológico particular que abriga organismos termófilos com potencial para transformar compostos orgânicos e inorgânicos. Nos últimos anos, diversos grupos de pesquisa têm olhado com bastante atenção para estes ambientes devido à sua importância científica e aplicações industriais. Um dos alvos de estudo tem sido a biodegradação do petróleo, processo através do qual a microbiota transforma óleos leves (com maior teor de hidrocarbonetos lineares) em óleos mais pesados, com maior densidade, quantidade de enxofre, acidez e viscosidade, e com baixo valor econômico (Connan *et al.*, 1984; Larter *et al.*, 2003).

Embora as técnicas de cultivo tenham sido aprimoradas e tenham permitido a recuperação *in vitro* de um número crescente de micro-organismos ainda não cultivados (Leadbetter *et al.*, 2003), nosso conhecimento sobre sua ecologia permanece insuficiente para cultivar a maioria deles. Isto é particularmente verdade no caso de comunidades microbianas degradadoras, onde a complexidade dos processos metabólicos necessários a essa degradação leva à formação de consórcios, com bactérias de diferentes gêneros e espécies, cada uma especializada em degradar um ou vários compostos (Abraham *et al.*, 2002). Neste contexto, tornam-se evidentes as limitações impostas pelo uso de culturas puras nos estudos de biodegradação ou biorremediação.

A aplicação de métodos moleculares independentes de isolamento e cultivo representa uma ferramenta importante para caracterização da diversidade de comunidades de bactérias e arqueias associadas a reservatórios de petróleo no Brasil, e permitirá obter informações detalhadas sobre a composição dessas comunidades, e sobre seu envolvimento potencial nos processos de biodegradação do petróleo e implicações para etapas futuras de exploração, armazenamento e refino, assim como biocorrosão de equipamentos. Estudos dessa natureza podem levar à identificação de micro-organismos com atividades de interesse tecnológico, que não seriam facilmente detectados ou isolados em cultivos empregando métodos microbiológicos convencionais.

A presença de uma ampla diversidade de micro-organismos em todas as áreas da produção do petróleo, incluindo reservatórios, tubulações, equipamento e lama de perfuração, tanques de armazenamento e plantas de água de injeção, geralmente causa sérios problemas à indústria do petróleo. Dentre estes, podemos citar o entupimento de poros na rocha reservatório, dificultando a

extração do petróleo, a acidificação e biodeterioração do óleo, o entupimento e corrosão de tubulações ou a produção de compostos tóxicos (Jayaraman *et al.*, 1997).

Os biocidas têm sido considerados o método mais comum de combate à biocorrosão de superfícies e biodeterioração do óleo em sistemas fechados, como tanques de estocagem e resfriamento (Cheung & Beech, 1996). Entretanto, o custo e o impacto ambiental destes compostos devem ser levados em consideração, principalmente no caso de sistemas abertos. Bactérias formadoras de biofilme são capazes de proteger diferentes superfícies metálicas através do consumo de oxigênio dissolvido e/ou através da produção de substâncias antimicrobianas, que servem para controlar as populações competidoras no seu ambiente, e que acabam por inibir as bactérias redutoras de sulfato (Jayaraman *et al.*, 1999; Ornek *et al.*, 2002).

Substâncias antimicrobianas são naturalmente produzidas por uma enorme diversidade de bactérias e podem consistir de pequenas moléculas, com estruturas bastante diversas (van t'Hof *et al.*, 2001), bacteriocinas e exoenzimas, como proteases, enzimas que degradam RNA ou a parede celular e amilases (Hyronimus *et al.*, 1998; Cherif *et al.*, 2001). Algumas destas substâncias são ativas apenas contra linhagens ou espécies proximamente relacionadas (Tagg *et al.*, 1976), enquanto outras apresentam um amplo espectro de atividade (Azuma *et al.*, 1992).

Neste sentido, parece razoável implementar estratégias na busca por compostos naturais com atividade antimicrobiana que sejam produzidos por micro-organismos que habitam ambientes associados a petróleo, e que oferecem potencial para aplicação em diversas etapas da indústria petroleira, com a vantagem de redução do uso de biocidas e do risco ambiental. Ainda, a identificação e caracterização de substâncias antimicrobianas em reservatórios de petróleo não biodegradados poderá auxiliar no entendimento de processos que regulam a deterioração do óleo *in situ*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Comunidades microbianas associadas ao petróleo

O petróleo é uma mistura complexa e heterogênea de compostos orgânicos, com mais de 17.000 componentes químicos distintos identificados (Head *et al.*, 2006), sendo basicamente quatro grupos principais: saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos. O petróleo é composto em grande parte (cerca de 90%) por hidrocarbonetos, contendo também parcelas menores de outros compostos, como vanádio, níquel, enxofre, nitrogênio e oxigênio (van Hamme *et al.*, 2003). O óleo com estas características, rico em hidrocarbonetos saturados e menor proporção de compostos polares, é considerado “leve” e possui maior valor econômico. Os óleos pesados, que resultam de biodegradação do óleo bruto em reservatórios de petróleo, possuem uma quantidade muito menor de hidrocarbonetos saturados e aromáticos, e uma maior proporção das substâncias químicas mais polares, as resinas e asfaltenos (Head *et al.*, 2006). Além disso, são mais densos e viscosos, o que interfere nas operações de extração e refino, resultando em grandes perdas econômicas para a indústria de petróleo (Connan *et al.*, 1984).

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). No entanto, águas de injeção podem carrear micro-organismos não indígenas aos reservatórios, tanto aeróbios quanto anaeróbios.

Evidências microbiológicas recentes descritas por importantes grupos de pesquisas em biogeoquímica, sugerem que mesmo em reservatórios rasos (< 500m) contendo águas frescas há a presença de microbiota anaeróbia (Magot *et al.* 2000 , Orphan *et al.*, 2001; Roling *et al.*, 2003; Head *et al.*, 2003). A incursão de águas meteóricas por si só não indica o transporte ativo de oxigênio nos reservatórios, pois mesmo pequenas quantidades de compostos orgânicos e minerais seriam suficientes para a remoção do oxigênio de um aquífero. Assim, torna-se plausível a hipótese de que a biodegradação de reservatórios de petróleo de águas profundas ocorra, principalmente, através do metabolismo microbiano anaeróbio.

Neste sentido, um grande número de micro-organismos com propriedades fisiológicas consistentes com as condições que os poços de petróleo de águas profundas oferecem, vem sendo caracterizado.

De acordo com Magot e colaboradores (2000), os micro-organismos indígenas aos reservatórios podem ser separados nos seguintes grupos: 1) bactérias sulfato-redutoras mesofílicas e termofílicas (BRS), envolvidas na corrosão de equipamentos e tubulações durante o processo de

obtenção de energia dos derivados de petróleo e responsáveis pela acidez dos poços de petróleo *in situ*, consideradas as vilãs do processo de extração de petróleo e tendo como principais representantes os gêneros *Archaeoglobus*, *Desulfobacterium*, *Desulfobacter*, *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Thermodesulfobacterium* e *Thermodesulfohabdus*; ii) arqueias metanogênicas mesofílicas e termofílicas, sendo os principais gêneros: *Methanobacterium*, *Methanocalculus*, *Methanococcus*, *Methanohalophilus*, *Methanoplanus* *Methanosarcina*; e hipertermofílicas, como *Thermococcus* e *Archaeoglobus*; iii) bactérias fermentadoras mesofílicas e termofílicas, envolvidas na produção de ácidos, solventes e gases, que são interessantes metabólitos para os processos industriais e têm potencial de termoestabilizar enzimas, sendo representadas pelos gêneros *Acetoanaerobium*, *Anaerobaculum*, *Dethiosulfovibrio*, *Geotoga*, *Haloanaerobium*, *Petrotoga*, *Spirochaeta*, *Thermoanaerobacter* e *Thermotoga*; e, por fim, iv) bactérias ferro-redutoras, representadas pelos gêneros *Shewanella* e *Deferribacter*.

O uso de técnicas moleculares baseadas na análise de genes RNAr 16S tem mostrado que uma ampla diversidade de filos e gêneros de micro-organismos está presente em reservatórios de petróleo (Radwan *et al.*, 1995, 1998; Ravot *et al.*, 1997; Stapleton *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2000; Saadoun *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2005; Sette *et al.*, 2007).

Em ambientes de reservatórios de petróleo anóxicos, os hidrocarbonetos são degradados a substratos metanogênicos como acetato, CO₂, e H₂ por diversas bactérias, e a metanogênese desempenha importante papel no processo final de degradação da matéria orgânica por meio das arqueias metanogênicas. Neste sentido, estes micro-organismos são comuns em nichos ecológicos únicos onde os hidrocarbonetos do petróleo representam a porção orgânica prevalente, como reservatórios de petróleo, cavidades subterrâneas de armazenamento de óleo bruto e aquíferos contaminados com hidrocarbonetos (Röling *et al.*, 2004). Portanto, devido ao interesse científico e aplicação industrial, torna-se importante entender a ecologia das bactérias e arqueias em campos de petróleo (Li *et al.*, 2007a).

No Brasil, estudos de caracterização de comunidades microbianas associadas a reservatórios de petróleo, utilizando técnicas convencionais de cultivo ou métodos moleculares independentes de cultivo, têm revelado a recuperação e/ou detecção de uma ampla diversidade de bactérias em reservatórios profundos. Um trabalho recente desenvolvido pela nossa equipe na Divisão de Recursos Microbianos, CPQBA/UNICAMP, permitiu a identificação de nove diferentes grupos taxonômicos em amostras de óleo provenientes de poços profundos com diferentes graus de biodegradação (não biodegradado e altamente biodegradado) da Bacia de Campos (Sette *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2008). Estes micro-organismos mostraram-se relacionados a *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Arcobacter*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Halanaerobium*, *Leuconostoc*, *Marinobacter*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Propionibacterium* e *Streptococcus*,

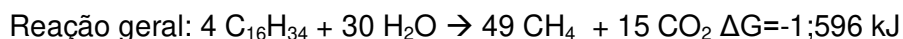
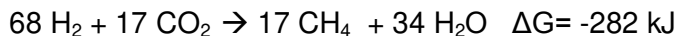
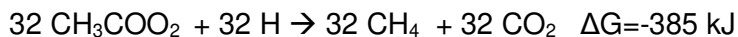
pertencendo a quatro grupos dentro do Domínio Bactéria: Firmicutes (Gram positivas de baixo conteúdo de GC); Actinobacteria (Gram positivas de alto conteúdo de GC); γ -Proteobacteria e ϵ -Proteobacteria. Foi verificado ainda que alguns destes grupos de micro-organismos eram exclusivos da amostra de óleo degradada, como os gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus* e *Streptococcus*. Destes, membros dos gêneros *Acinetobacter* e *Bacillus* têm sido associados com petróleo e degradação de hidrocarbonetos em muitos outros estudos (Nazina *et al.*, 2002; Saadoun, 2002; Bach *et al.*, 2003). Os resultados obtidos com a estratégia independente de cultivo permitiram obter uma ampla perspectiva da diversidade, assim como da abundância, dos grupos microbianos presentes nas amostras de água e óleo originadas dos reservatórios de petróleo. Além disso, estudos de degradação realizados com bactérias isoladas das mesmas amostras de água de formação e óleo, revelaram a recuperação de bactérias com capacidade de degradar diferentes biomarcadores do petróleo (Vasconcellos *et al.*, 2009).

Outro estudo desenvolvido por grupo de pesquisa brasileiro (Von der Weid *et al.*, 2008) utilizando amostras de rocha reservatório de subsuperfície profunda (2.800 m abaixo do leito oceânico), proveniente da Bacia de Campos, revelou a presença de bactérias relacionadas aos gêneros *Variovorax* e *Rubrivivax*, descritas como degradadoras de hidrocarbonetos (Ramana *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2005), e aos gêneros *Comamonas* e *Azoarcus*, associadas a processos de biorremediação (Hess *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 1999). Membros da classe Alphaproteobacteria pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Phyllobacterium* e *Methylobacterium*, conhecidos como degradadores de compostos aromáticos, e *Defluviibacter*, descritos como degradadores de clorofenol também foram detectados neste estudo. Em outro estudo, Cunha e colaboradores (2006) isolaram e caracterizaram diferentes linhagens de *Bacillus* da rocha de reservatórios profundos que tinham habilidade de degradar óleo e crescer em diferentes fontes de hidrocarbonetos.

2.2 Degradação microbiana de hidrocarbonetos do petróleo

O processo de biodegradação de hidrocarbonetos pode se dar de forma aeróbica, que é geralmente rápida o suficiente para ser observada em um curto período de tempo. No entanto, sugere-se que em reservatórios de petróleo, onde as condições aeróbicas são desfavoráveis, aliado à identificação de diversos micro-organismos anaeróbicos e à descoberta de mecanismos de biodegradação anaeróbica, o processo de degradação do petróleo ocorra pela via anaeróbia (Aitken *et al.*, 2004). Em uma das vias possíveis da degradação anaeróbia, arqueias metanogênicas utilizam CO₂ comoceptor de elétron e produzem metano. No entanto, organismos metanogênicos não utilizam elétrons diretamente de hidrocarbonetos de petróleo. Os substratos mais comuns para a

metanogênese são hidrogênio molecular (H₂) e acetato, sendo que formato e etanol também podem ser usados. Zengler e colaboradores (1999) descreveram a via de degradação para alcanos em anaerobiose, tendo o metano como produto final da degradação:



Ainda há um debate com relação à ordem exata na qual diferentes compostos são removidos do óleo cru durante a biodegradação, mas a maioria dos estudos apresenta ordens semelhantes, nas quais os *n*-alcanos de cadeia curta são removidos mais rapidamente do que os de cadeia longa que, por sua vez, são removidos mais rapidamente do que os hidrocarbonetos ramificados e isoprenóides (Vieth e Wilkes, 2005). Nesse sentido, Head *et al.* (2003) descreveram que a seqüência geral de remoção dos tipos de hidrocarbonetos saturados durante a degradação é: *n*-alcanos, alquil ciclohexanos, alcanos isoprenóides alicíclicos, alcanos bicíclicos-esteranos-hopanos, sendo que em níveis avançados de biodegradação, a desmetilação dos hopanos pode resultar na formação de novos hidrocarbonetos, tais como 17 α (H)-21 β (H)-25-norhopanos.

Os alcanos são hidrocarbonetos saturados, que representam os principais constituintes do óleo mineral. Eles podem apresentar cadeia linear (*n*-alcanos), circular (cicloalcanos) e ramificada (iso-alcanos). Apesar de serem muito inflamáveis, os alcanos constituem provavelmente a classe menos reativa dos compostos orgânicos. Como componentes principais de combustíveis e óleos, eles possuem valor considerável na vida moderna, mas a relativa inércia dos alcanos gera problemas ecológicos em relação à sua liberação no ambiente.

A literatura freqüentemente refere-se aos *n*-alcanos de acordo com o comprimento da cadeia: alcanos de cadeia curta, de cadeia média e de cadeia longa. Muito pouco se sabe sobre o metabolismo microbiano com relação aos diversos derivados dos hidrocarbonetos de cadeia curta. Os micro-organismos possuem diversos mecanismos de ataque aos substratos de hidrocarbonetos na oxidação inicial e para dissimilação dos produtos oxigenados. Segundo Blanquet *et al.* (2005), a degradação envolvendo o sistema *alk* é a mais difundida. Foi primeiramente descrita em *seuromonas oleovorans* GPo1, posteriormente classificada como *Pseudomonas putida* (Kok *et al.*, 1989).

Outras vias de degradação de alcanos foram descobertas e as enzimas envolvidas isoladas e estudadas em detalhes, como, por exemplo, a citocromo P450 (Maier *et al.*, 2001), monooxigenases (Hamamura *et al.*, 2001) e dioxigenases (Maeng *et al.*, 1996).

2.3 Métodos moleculares no estudo da diversidade de micro-organismos

Quando Woese, em 1987, originalmente propôs o uso de filogenia baseada no gene RNAr 16S, 12 Divisões bacterianas eram conhecidas, todas com representantes cultivados. Mais tarde, em um inventário realizado por Rappé e Giovannoni (2003), 53 Divisões foram sugeridas com base na análise da seqüência do gene RNAr 16S, sendo 26 candidatas a novas Divisões sem representantes cultivados.

Nas últimas décadas, estudos de diversidade microbiana empregando microscopia e contagem de células têm revelado que podemos recuperar apenas cerca de 1-10% dos micro-organismos de uma amostra ambiental através do isolamento e cultivo (Amann *et al.*, 1995; Hugenholtz *et al.*, 1998b). Isto se deve basicamente às limitações inerentes às técnicas de plaqueamento e cultivo, uma vez que todos os meios de cultura são seletivos em maior ou menor extensão para os diversos grupos de micro-organismos, e, na maioria das vezes, incapazes de reproduzir as condições encontradas no ambiente. Este é o caso, por exemplo, de micro-organismos que vivem sob a forma de consórcios, onde uma espécie depende de produtos do metabolismo de outras espécies para sua sobrevivência e multiplicação; de micro-organismos simbiontes, os quais vivem no interior de outros organismos, e de micro-organismos extremófilos, como aqueles adaptados a condições extremas de temperatura ou pressão.

Portanto, os genomas da microbiota total de uma comunidade, chamados coletivamente de *metagenoma* (Handelsman *et al.*, 1998), contêm muito mais informação genética do que aquela verificada na diversidade microbiana cultivada.

O desenvolvimento de técnicas para a análise de ácidos nucleicos, DNA e RNA, nos permite estudar a diversidade microbiana em um nível diferente, o nível genético. Os micro-organismos são detectados, identificados e enumerados através da análise de genes. Ácidos nucleicos, DNA ou RNA, são extraídos de populações microbianas mistas e usados em diferentes estratégias moleculares a fim de determinar a complexidade da comunidade, quantificar e identificar membros na população. A análise do DNA fornece informação sobre a composição de espécies ou “estrutura” de comunidades microbianas, ao passo que a análise do RNA pode revelar a atividade metabólica ou “função” de populações microbianas particulares. (Malik *et al.*, 2008)

As ferramentas moleculares vêm, portanto, possibilitando uma melhor compreensão da diversidade genotípica e funcional de micro-organismos no ambiente (Cardenas & Tiedje, 2008), e a

utilização dessas técnicas para detectar e monitorar micro-organismos em amostras ambientais pode reduzir drasticamente o tempo de detecção e incrementar o nível de sensibilidade.

Embora seja uma abordagem eficiente para se entender o potencial fisiológico dos organismos isolados, o uso de técnicas de cultivo não fornece informações precisas sobre a composição da comunidade microbiana (van Hamme *et al.*, 2003). Além disso, em geral, uma só espécie de micro-organismo não é capaz de promover a degradação completa da mistura de hidrocarbonetos presentes no ambiente, 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). Neste sentido, os produtos de uma biotransformação podem servir como fonte de carbono e energia para outras espécies da comunidade (Röling *et al.*, 2003). Neste contexto, tornam-se evidentes as limitações impostas pelo uso de culturas puras nos estudos de biodegradação ou biorremediação.

Metodologias moleculares desenvolvidas nas últimas décadas (extração de ácidos nucleicos, 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 ampla e precisa da diversidade microbiana no ambiente e a descoberta de novos grupos de organismos, nunca antes cultivados (Giovannoni *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1995; Hugenholtz *et al.*, 1998a).

Em microbiologia do petróleo, a aplicação de técnicas moleculares (*e.g.* extração de DNA de comunidades, sondas de ácidos nucleicos, amplificação gênica, clonagem e seqüenciamento de DNA ribossômico 16S) tem sido recentemente incorporada para a análise de micro-organismos presentes em ambientes associados ao petróleo, resultando na efetiva caracterização microbiana desses ecossistemas. Estes estudos têm revelado a descoberta de inúmeros novos filotipos de micro-organismos, dentre eles bactérias redutoras de sulfato (BRS) habitando poços de petróleo de baixa temperatura em reservatório do oeste Canadense (Voordouw *et al.*, 1996), bactérias pertencentes às Classes Proteobacteria, Clostridia, Deferribacteres, e arqueias das Classes Methanomicrobia e Thermococci, presentes em poços de produção profundos, com altas temperaturas, na Califórnia (Orphan *et al.*, 2000), arqueias e bactérias termofílicas em reservatório de petróleo na Sibéria Ocidental (Bonch-Osmolovskaya *et al.*, 2003) e em reservatórios de petróleo de Huabei na China (Li *et al.*, 2007 a,b).

Neste sentido, o uso combinado de técnicas de enriquecimento e metodologias moleculares independentes de cultivo pode constituir uma ferramenta valiosa na avaliação microbiológica de amostras de petróleo no Brasil, e permitirá obter informações detalhadas sobre a composição dessas comunidades e sobre seu envolvimento potencial nos processos de biodegradação do petróleo e

implicações para etapas futuras de exploração, armazenamento e refino, assim como biocorrosão de equipamentos e biotransformação. Estudos dessa natureza podem levar à identificação de micro-organismos com atividades de interesse tecnológico, que não seriam facilmente detectados ou isolados em cultivos empregando métodos microbiológicos convencionais

2.4 Produção de antimicrobianos e seu uso na indústria do petróleo

A colonização microbiana na indústria do petróleo começa com a formação de biofilme e pode resultar na biodeterioração da superfície do metal de equipamentos, tubulações e tanques. Em geral, as bactérias podem aderir à superfície eficientemente quando são viáveis e estão em estado metabólico ativo (Korenblum *et al.*, 2005; 2008).

Jack e colaboradores (1992) demonstraram um aumento significativo na taxa de corrosão do aço carbono em um fluxo contínuo de água onde um biofilme de *Bacillus* e bactérias redutoras de sulfato (BRS) foi observado. BRS foram amplamente associadas aos processos de biocorrosão, principalmente por causa da geração de ácido sulfídrico. Além disso, a presença de BRS pode resultar em riscos para a saúde e segurança dos trabalhadores (Gardner & Stewart, 2002).

A natureza da estrutura do biofilme e sua formação resultam em uma significativa resistência para a limpeza das superfícies industriais. Métodos convencionais de controle e remoção de biofilme são geralmente inadequados contra as bactérias que formam biofilme. A matriz de exopolissacarídeo secretada pelas células reduz a eficiência dos biocidas pela diminuição da penetração destes no biofilme. A fim de contornar esse problema, concentrações muito altas de biocidas são usadas, causando danos ambientais secundários (Jayaraman *et al.*, 1999). Agentes antimicrobianos podem aumentar a eficiência de uma forma indireta, impedindo o crescimento e permitindo o descolamento natural nos processos de remoção de biofilmes (Chen & Stewart, 2000).

Por outro lado, a formação de biofilme de bactérias pode também proteger diferentes tipos de metais pelo consumo do oxigênio dissolvido, tornando-o inacessível para a reação de corrosão (Jayaraman *et al.*, 1997; 1999), e também pela secreção de substâncias antimicrobianas contra BRS e outras bactérias danosas que constituem o biofilme (Jayaraman *et al.*, 1999; Ornek *et al.*, 2002).

Recentemente, cepas de *Bacillus* foram usadas como protetoras da corrosão em biofilme através da produção de peptídeos antimicrobianos, como as indolicidinas e batenecinas (Jayaraman *et al.*, 1999).

Estudos realizados por Korenblun e colaboradores (2005; 2008) resultaram no isolamento de três linhagens de *Bacillus* de reservatórios de óleos brasileiros, *Bacillus subtilis* (LFE-1), *Bacillus firmus* (H2O-1) e *Bacillus licheniformis* (T6-5), com capacidade de produção de substâncias

antimicrobianas (AMS). Estas AMS inibiram o crescimento de outras linhagens de *Bacillus*, assim como o crescimento de consórcios de BRS recuperadas dos reservatórios.

Na indústria do petróleo, a investigação da produção de substâncias antimicrobianas apresenta grande relevância e potencial de aplicação biotecnológica, uma vez que a descoberta e caracterização destas substâncias oferecem uma estratégia alternativa de tratamento para prevenir a colonização de bactérias sob a forma de biofilmes, as quais causam grandes danos econômicos nas diversas etapas da exploração e processamento do óleo.

3 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo a caracterização de comunidades microbianas de amostras de óleo biodegradado e não biodegradado, provenientes de reservatórios da Bacia Potiguar (RN), a fim de investigar a diversidade e composição da microbiota e a presença de possíveis micro-organismos bioindicadores da biodegradação nos reservatórios. Ainda, a produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana foi avaliada, no sentido de investigar o fenômeno responsável pela esterilização de determinados reservatórios.

3.1 Objetivos Específicos

- ✓ Comparar reservatórios degradado X não-degradado;
- ✓ Avaliar a diversidade (riqueza e abundância) de bactérias e arqueias presentes nestes reservatórios, utilizando métodos independentes de cultivo;
- ✓ Implementar enriquecimentos microbianos a partir das amostras de petróleo;
- ✓ Avaliar a produção de antimicrobianos por populações recuperadas nos enriquecimentos obtidos das amostras de petróleo;
- ✓ Caracterizar quimicamente os compostos com atividade antimicrobiana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras

Amostras de petróleo, provenientes de reservatórios sob diferentes estágios de biodegradação e profundidades, foram coletadas em junho de 2008 na Bacia de Potiguar, RN. As amostras analisadas no presente estudo estão detalhadas na Tabela 1.

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

Poços amostrados	Profundidade (m)	Grau de biodegradação	Temperatura (°C)
GMR 75	535,5 - 540,5	Moderadamente biodegradado	42,2
PTS 1	801 - 803	Não biodegradado	48,3

As amostras foram coletadas sob condições de assepsia por técnicos da Petrobrás e imediatamente encaminhadas para análise nos laboratórios da Divisão de Recursos Microbianos (CPQBA/UNICAMP).



Figura 1. Região de Mossoró da Bacia Potiguar (RN) onde se localizam os poços GMR75 e PTS1.

4.2 Enriquecimentos microbianos aeróbios

Inicialmente, os enriquecimentos da microbiota aeróbia do petróleo foram feitos em frascos Schott de 500 mL utilizando 400 mL de um dos 4 diferentes meios NB (Nutrient Broth), TSB

(Tryptcase Soy Broth), MB (Marine Broth) e BH (Bushnell Haas) e 2 mL da mistura de petróleo com Tween como inóculo. Essa mistura foi feita com diferentes concentrações de Tween 80 (10%, puro e sem Tween 80), a fim de comparar possíveis interferências do Tween 80 no enriquecimento.

Os meios de cultivo foram inoculados, em duplicata, e incubados por 5 a 7 dias em agitador rotacional a 150 rpm e 37°C. Os enriquecimentos foram monitorados com exames microscópicos (Coloração de Gram), e observação das morfologias microbianas presentes na biomassa obtida.

Os isolados bacterianos de cada enriquecimento foram obtidos através de estria por esgotamento ou diluições seriadas nos seus respectivos meios contendo ágar 2%.

4.3 Identificação dos isolados bacterianos

O DNA genômico das bactérias isoladas dos enriquecimentos foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Pitcher *et al.* (1989). O DNA obtido foi utilizado em reações de PCR para amplificação do DNAr 16S empregando o par de *primers* 27f (Lane *et al.*, 1991) e 1401r (Heuer *et al.*, 1997), que se anelam a regiões conservadas do DNAr 16S para o Domínio Bacteria. Os produtos de PCR do DNAr 16S dos isolados foram purificados utilizando mini-colunas (*GFX PCR DNA and gel band purification kit*, GE Healthcare) e submetidos ao seqüenciamento em seqüenciador automático (MegaBace 500, GE Healthcare). As reações de seqüenciamento foram realizadas com o Kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis Systems (GE Healthcare), segundo especificações do fabricante. Os *primers* utilizados para o seqüenciamento foram 27f (5' - AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG - 3'); 782r (5' - ACC AGG GTA TCT AAT CCT GT - 3') e 1100r (5' - AGG GTT GGG GTG GTT G - 3').

4.4 Extração de DNA ambiental

Sucessivos experimentos de extração de DNA da amostra de óleo bruto foram realizados utilizando como base os protocolos descritos por Yoshida *et al.* (2005) e Tanaka *et al.* (2002), onde o óleo bruto é pré-tratado com isooctano para em seguida ser usado para extração do DNA usando o QIAmp DNA Stool Mini Kit (Qiagen Inc. Valencia, CA, USA) ou o *kit Fast DNA* (Q.biogene SPIN Kit for Soil). Entretanto, após várias mal-sucedidas tentativas, conseguimos otimizar o processo com o uso do kit de extração de DNA de solos *PowerSoil DNA Isolation* (MOBIO), com base nas instruções fornecidas pelo fabricante.

4.5 Construção de bibliotecas de genes RNAr 16S

A amplificação do gene RNAr 16S de organismos do Domínio Bactéria a partir do DNA total foi realizada utilizando os *primers* 10f e 1100r (Lane *et al.*, 1991; Tabela 2), segundo protocolos previamente estabelecidos na rotina do laboratório. Para amplificação do DNAr 16S de organismos do Domínio Archaea, foram testados os pares de primers ARCH20f / ARCH1017r, ARCH46f / ARCH1017r e ARCH46f / ARCH915r (Tabela 2), segundo metodologia descrita por Yoshida *et al.* (2005). Foram construídas bibliotecas de genes RNAr 16S para os poços GMR75 e PTS1. As reações de PCR foram realizadas em 9 replicatas (50 µL), as quais foram combinadas, concentradas em “*speed vacuum*” e purificadas em coluna *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). Os fragmentos purificados foram ligados em vetor pGEM-T (pGEM-T Easy Vector System, Promega), segundo as especificações do fabricante, e transformados em *Escherichia coli* JM109. As placas resultantes da transformação foram incubadas a 37°C por cerca de 16 h. Foram analisados de 120 a 140 clones de cada biblioteca de bactérias, e cerca de 50 clones para cada bibliotecas de arqueias. Em seguida, foi feita a análise de cobertura da diversidade para verificar se o número de clones analisados era representativo da diversidade de espécies presentes nas amostras.

Tabela 2. Seqüências dos *primers* que foram utilizados para amplificação do gene RNAr 16S de bactérias e arqueias.

Primers	Seqüências 5'- 3'	Referências
10f	GAG TTT GAT CCT GGC TCA G	Lane, 1991
27f	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Lane, 1991
1100r	AGG GTT GCG CTC GTT G	Lane, 1991
1401r	CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG	Heuer <i>et al.</i> , 1997
ARCH 20f	TTC CGG TTG ATC CYG CCR G	Massana <i>et al.</i> , 1997
ARCH 1017r	GGC CAT GCA CCW CCT CTC	Barns <i>et al.</i> , 1994
ARCH 46f	YTAAGCCATGCRAGT	Kudo <i>et al.</i> , 1997; Yoshida <i>et al.</i> , 2005
ARCH 915r	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	Stahl & Amann 1991; Großkopf <i>et al.</i> , 1998

Para as reações de PCR foram utilizados 5 µL da solução de DNA, 0,4 µM de cada *primer*, 200 µM de dNTPs (GE Healthcare), 2 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen).

O programa para amplificação do gene RNAr 16S de bactérias seguiu as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min; 30 ciclos de 1 min de desnaturação a 94 °C; 1 min de anelamento a 55 °C e 3 min a 72 °C para extensão; e uma etapa de extensão final de 3 min a 72 °C. Foram testados, para amplificação do gene RNAr 16S de arqueias, os programas Arc3 que consistiu das seguintes etapas: desnaturação inicial a 94 °C por 90 s; 9 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30

s; anelamento a 65 °C por 30 s (com *touchdown*, diminuindo 0,5 °C a cada ciclo) e extensão a 72 °C por 90 s; mais uma etapa de 25 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 60 °C durante 30 s e extensão a 72 °C por 90 s; e uma etapa de extensão final de 10 min a 72 °C. Foi também utilizado o programa Arc2, que consiste das seguintes etapas: desnaturação inicial a 95 °C por 3 min; 35 ciclos com desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 53 °C durante 1 min e extensão a 72 °C por 1 min; e uma etapa de extensão final de 10 min a 72 °C (Mendes, 2009)

4.6 Amplificação e sequenciamento dos fragmentos de DNAr 16S clonados

Os clones positivos foram selecionados como colônias brancas em meio LA, contendo 80 µg/mL de X-Gal, 160 µg/mL de IPTG e 100 mg/mL de ampicilina. Os mesmos clones foram preservados em microplacas contendo 150 µL de cultura e 50 µL de glicerol 50%, sendo mantidos em freezer a -20°C para análises subsequentes. Os clones obtidos foram posteriormente inoculados em meio LA contendo ampicilina e incubados a 37°C com agitação (100 rpm) por 16 h.

Reações de amplificação usando *primers* universais M13f (5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3') e M13r (5'-TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC-3') foram feitas a fim de se obter o fragmento do gene RNAr 16S inserido no vetor para sequenciamento automatizado.

Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o *GFX 96 PCR Purification Kit* (GE Healthcare) e sequenciados no equipamento *MegaBace DNA Analysis System 1000* (GE Healthcare), usando o *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace*, de acordo com as recomendações do fabricante. Os *primers* usados para o sequenciamento do gene RNAr 16S de bactérias foram o 10f (5'- GAG TTT GAT CCT GGC TCA G -3'), o 1100r (5'- AGG GTT GCG CTC GTT G -3') (Lane *et al.*, 1985), o 765f (5'- ATT AGA TAC CCT GGT AG-3') (Weisburg *et al.*, 1991), 782r (5'- ACC AGG GTA TCT AAT CCT GT-3') e o 530r (GTA TTA CCG CGG CTG CTG) (Manefield *et al.*, 2002). Para o RNAr 16S de arqueias foram utilizados os *primers* M13f (5' - CGC CAG CGT TTT CCC AGT CAC GAC – 3') e M13r (5' - TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC – 3').

4.7 Análise das seqüências

As seqüências parciais obtidas com cada *primer*, tanto dos isolados bacterianos como dos clones, foram montadas em um contig (seqüência consenso única) usando o programa phred/Phrap/CONSED (Ewing *et al.*, 1998). A identificação preliminar foi realizada comparando as seqüências do gene RNAr 16S obtidas com seqüências de linhagens, assim como clones ambientais, disponíveis nas bases de dados públicas GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, USA, <http://www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html>), usando as rotinas

BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) e Seqmatch, respectivamente. As sequências foram alinhadas usando o programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) e analisadas com o software MEGA v. 4 (Tamura *et al.*, 2007). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo de substituição de DNA de Kimura (1980), como implementado no programa MEGA. A reconstrução filogenética foi feita usando o algoritmo de *neighbour-joining* (NJ) (Saitou and Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1000 replicatas.

4.8 Análises estatísticas de diversidade

Os cálculos dos índices de diversidade (medidas de diversidade α) foram realizados individualmente para cada biblioteca de genes RNAr 16S utilizando o programa DOTUR (*Distance-based Operational Taxonomic Unit and Richness*, <http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/dotur.html>), desenvolvido por Schloss e Handelsman (2004). Este programa agrupa as sequências em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) com base na distância evolutiva entre elas. As curvas de rarefação, o índice de diversidade Shannon (H') e os estimadores de riqueza não paramétricos ACE (abundance-based coverage estimator) (Chao *et al.*, 1993) e Chao1 (Chao *et al.*, 1984) foram calculados utilizando o nível de distância de 0,03 entre as sequências de RNAr 16S. As análises de comparação da diversidade dos bancos foram feitas com o uso do programa *Libshuff*, <http://whitman.myweb.uga.edu/libshuff.html> (Singleton *et al.*, 2001).

4.9 Ensaio da atividade antimicrobiana

O ensaio foi realizado de acordo com os procedimentos descritos por Rosado e Seldin (1993). As linhagens isoladas a partir dos enriquecimentos, assim como as frações dos cultivos, *pellet* e sobrenadante obtidas por centrifugação a 10.000 rpm por 10 min, foram inoculadas na forma de spots (5 μ L) na superfície de placas com meio LA (Luria-Bertani Ágar). Após a incubação a 37°C por 48 h, as células bacterianas foram mortas por exposição ao vapor de clorofórmio por 15 min. Após evaporação do clorofórmio residual, essas placas foram cobertas com uma camada de meio semi-sólido contendo inóculo de uma das linhagens indicadoras (listadas no item 6.8). Estas últimas incluíram bactérias isoladas previamente em nosso laboratório a partir de amostras de petróleo da Bacia de Campos, sendo a maioria delas linhagens de *Bacillus pumilus* com perfis de RAPD diferentes, e também as linhagens de bactérias isoladas no presente estudo. A formação de halo de inibição em volta do “spot” inoculado indicou a produção de antimicrobiano.

4.10 Cultivo das bactérias produtoras de antimicrobianos

As linhagens *B. pumillus* SG-32 e *B. firmus* P1-1 foram cultivadas em 12 litros de meio *Marine Broth* (MB) por 72 h a 37°C visando a realização dos testes antiproliferativos. As células foram coletadas por sucessivas centrifugações a 10.000 RPM por 10 min a 4°C e armazenadas. Uma fração de 2 L do meio de cultura (possível local de acúmulo de substância antimicrobiana) foi reservada para as análises de caracterização do composto.

4.11 Obtenção de extratos de *Bacillus pumilus* SG-32 e análises cromatográficas

4.11.1 Extração dos princípios ativos das células bacterianas:

a) Extração por soxhlet:

Foram realizadas extrações do cultivo da linhagem de *Bacillus pumilus* e de *Bacillus firmus*, sendo que as amostras dos extratos obtidos foram enviadas para a Divisão de Farmacologia e Toxicologia (CPQBA) para realização de testes antiproliferativos *in vitro* em linhagens de células de câncer humanas, sob supervisão do Dr. João Ernesto de Carvalho. Outra parte da amostra de extrato bruto, apenas de *Bacillus pumilus*, foi enviada à Divisão de Fitoquímica (CPQBA) para análises cromatográficas para identificação do composto com atividade antimicrobiana, sob supervisão da Dra. Mary Ann Foglio.

Os extratos brutos de *B. pumilus* foram obtidos por sistema de soxhlet, utilizando-se três solventes distintos de polaridades diferentes: hexano, acetato de etila e metanol. Primeiramente, as células de *B. pumilus* foram extraídas com 200 mL de hexano até o esgotamento da extração, resultando em um tempo aproximado de 24 h. O extrato bruto de hexano (EBH), ainda diluído no solvente, foi retirado do sistema de soxhlet e reservado em erlenmeyer. As células de *B. pumilus* foram então submetidas à extração com 200 mL de acetato de etila (EBA) por um período de 24 h até obter-se novamente o esgotamento da extração. O extrato obtido a partir do acetato de etila e ainda diluído neste solvente foi retirado do sistema de soxhlet e reservado em erlenmeyer separadamente do primeiro extrato. Novamente, as células bacterianas foram submetidas à extração por soxhlet, mas dessa vez com 200 mL de metanol (EBM) por 24 h até o esgotamento da extração. O extrato metanólico diluído ainda em solvente foi retirado do sistema de soxhlet e armazenado em um novo erlenmeyer, assim como os outros extratos. O resíduo resultante das células de *B. pumilus* foi armazenado e encaminhado para a Divisão de Recursos Microbianos do CPQBA, onde foi autoclavado e descartado.

Os extratos brutos resultantes da extração foram concentrados a vácuo, separadamente, em rotaevaporador a uma temperatura de 40°C até a completa secagem dos solventes. Os extratos

foram pesados para se calcular o rendimento de cada extração e separados em balões volumétricos distintos para a realização dos testes farmacológicos.

b) Extração do meio de cultura, partição líquido-líquido

Esta extração foi realizada utilizando-se o meio de cultura de crescimento dos micro-organismos. Em um funil de separação de 2000 mL foram adicionados 1000 mL do cultivo e 500 mL de hexano. O funil foi agitado e a fase orgânica do extrato foi retirada e armazenada em erlenmeyer. Este procedimento foi realizado três vezes com hexano e, na seqüência, o mesmo processo de extração foi realizado com acetato de etila. Os extratos obtidos a partir da extração por hexano e acetato de etila foram concentrados, separadamente, em rotaevaporador até a eliminação total dos solventes. Os extratos foram pesados para cálculos de rendimento e amostras de 10 mg foram separadas e enviadas para a Divisão de Farmacologia e Toxicologia para realização dos testes antiproliferativos.

4.11.2 Método de purificação cromatográfica

As separações por coluna cromatográfica foram realizadas com os extratos de *B. pumilus*, utilizando-se os extratos brutos obtidos pela extração por soxhlet a partir das células bacterianas e os extratos da fração do cultivo (sobrenadante).

As análises cromatográficas foram realizadas em coluna de vidro preenchida por silicagel 60 (Merck, 0,063- 0,200 mm). Foi utilizada uma proporção de 1 g de amostra para 30 g de silicagel para a montagem da coluna, utilizando-se hexano para o empacotamento da mesma. As colunas foram eluídas com 100 mL de solventes em gradientes crescentes de polaridade. Foram recolhidas frações de 50 mL, que, após serem analisadas por cromatografia de camada delgada, foram reunidas por similaridade gerando novas frações. Após a evaporação dos solventes em rotaevaporador, as frações foram pesadas para cálculos de rendimento e foram separados 10 mg das amostras em microtubos para avaliação em modelo *in vitro* para atividade antiproliferativa em linhagens tumorais humanas.

4.11.3 Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises de cromatografia em camada delgada (CCD) foram efetuadas em cromatoplaças de Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck 1.05554). Após aplicação das amostras nas placas, estas foram eluídas com uma mistura de diclorometano/ metanol (98:2) e hexano/acetato de etila (50:50). A detecção dos compostos foi feita com pulverização do revelador anisaldeído (solução ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído (48:1:1)), seguida de aquecimento em estufa a 105°C por 10 min e irradiação com lâmpada UV a 254 nm.

4.11.4 Análise Qualitativa por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

O extrato bruto do sobrenadante do meio de cultivo foi diluído em acetato de etila e analisado em cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies 6890N Network GC System) acoplado a um detector de massas (Agilent Technologies 5975 inert Mass Selective Detector), equipado com coluna capilar (HP-5MS) de 30 m x 0.25 mm x 0,25 µm. A programação de temperatura foi de 60°C a 240°C em rampa de 3 °C/min. Utilizou-se injetor à temperatura de 220°C e detector a 250 °C. O injetor foi utilizado no modo splitless 30:1 e Hélio foi utilizado como gás de arraste, a uma pressão de 8,19 psi e velocidade linear de 1 mL/min. A caracterização dos constituintes foi baseada no índice de retenção linear de Van den Dool e Kratz /54/ onde:

$$IR = [(T_s - T_{cn-1}) / (T_{cn} - T_{cn-1})] \times 100 + 100_{cn-1}$$

T_s: tempo de retenção da substância analisada

T_{cn}: tempo de retenção do n-alceno que elui após a substância analisada

T_{cn-1}: tempo de retenção do n-alceno que elui antes da substância analisada

C_{n-1}: n-alceno que elui antes da substância analisada

O cálculo é feito em relação aos tempos de retenção de uma série homóloga de *n*-alcenos, e no padrão de fragmentação observado nos espectros de massas, por comparação destes com dados obtidos na literatura (Adams 2007), com espectroteca NIST05 e índice de retenção. A biblioteca de espectros de massas NIST05 instalada no equipamento GC/EM (HP 6890/HP 5975) foi tomada como referência do tipo de esqueleto carbônico dos componentes presentes na fração. Os valores experimentais observados podem ser corrigidos, pois a sequência de eluição se mantém constante independente da temperatura em que são efetuadas as determinações.

4.11.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D (1H, 13C e DEPT) e 2D (COSY, HSQC, HMQC) foram obtidos em espectrômetro Inova 500, operando a 500 MHz na frequência do ¹H e a 125 MHz na frequência do ¹³C. O sinal residual do solvente ou do tetrametil silano (TMS) foi usado como referência interna. O solvente utilizado na dissolução das amostras para obtenção dos espectros foi o clorofórmio deuterado (CDCl₃, Isotec - INC). Estas análises foram realizadas no Instituto de Química (UNICAMP), com a colaboração da Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli.

4.12 Ensaio bioautográfico

- a) **Preparo das placas de CCD.** Os ensaios da atividade antimicrobiana foram conduzidos através de métodos de bioautografia, de acordo com Slusarenko *et al.* (1989), em placas de CCD (cromatografia de camada delgada). Após dissolução em hexano, foram aplicados 3 μ L dos extratos na concentração de 10 mg/mL nas placas, em duplicata, utilizando-se como eluente uma mistura de diclorometano:metanol 98:2. Uma das placas foi revelada com anisaldeído e a outra submetida aos ensaios microbiológicos.
- b) **Padronização e preparo de inóculo.** O inóculo do micro-organismo padrão, *Bacillus thuringiensis* (micro-organismo escolhido como a linhagem indicadora por ter sido inibida pelo maior número de linhagens produtoras) foi preparado transferindo-se células do tubo de manutenção para frasco contendo solução salina 0,15%, esterilizada. A D.O. (densidade óptica) da suspensão foi corrigida para absorbância correspondente à de 0,5 da escala de McFarland (1,9 Abs), em espectrofotômetro a 600 nm, de modo a padronizar a concentração inicial de células (cerca de 10^8 UFC/mL).
- c) **Teste de atividade antimicrobiana.** A suspensão de micro-organismos preparada conforme descrito acima foi inoculada por técnica de plaqueamento por profundidade nos meios de cultura especificados anteriormente, utilizando-se a proporção de 1:1000 (v/v). Uma alíquota de 0,5 mL de solução de cloreto de trifênil tetrazolium 1 mg/mL foi adicionada ao meio inoculado, como indicador de atividade respiratória das células. Em seguida, o meio foi vertido em placas de Petri, sobre as placas de CCD onde foram aplicados os extratos. Após homogeneização, o material foi incubado a 37°C durante 24 h.
- d) **Leitura dos resultados.** O revelador 2,3,5-cloreto de trifênil tetrazolium permite observar as regiões onde houve crescimento bacteriano, uma vez que as células com atividade respiratória coram-se de vermelho. Do mesmo modo, permite avaliar qualitativamente se houve inibição do crescimento em locais correspondentes a uma determinada fração do extrato corrida na placa em questão, através da formação de halos de inibição, região onde não haverá reação com o revelador.

4.13 Ensaios farmacológicos para a determinação da atividade anticâncer “*in vitro*”

Foram utilizadas para os testes *in vitro* nove linhagens tumorais humanas de diferentes origens e características: Melanoma (UACC-62), Ovário (OVCAR-03), Ovário resistente (NCI-ADR/RES), Mama (MCF-7), Pulmão (NCI-460), Rim (786-O), Próstata (PC-03), Cólon (HT-29), Glioblastoma (U251) e Leucemia (K-562), cedidas pelo NCI (National Cancer Institute), e uma

linhagem de células normais: célula epitelial de rim de macaco verde (VERO) (Tabela 3). Todas as linhagens utilizadas na triagem da atividade antiproliferativa foram cultivadas em 5 mL de RPMI 1640 (Gibco), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB – Gibco), a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Quando a monocamada celular atingiu cerca de 80% de confluência, as linhagens foram repicadas sob condições estéreis. Rotineiramente, dois frascos de cada linhagem celular são sempre mantidos em cultura.

Tabela 3: Linhagens celulares utilizadas nos testes de atividade anticâncer.

Tipo Celular	Nome	Origem	Densidade de Inoculação (*10⁴ cel/mL)
Pulmão	NCI-H460	Endoderme	4,0
Mama	MCF-7	Ectoderme	6,0
Mama Resistente	NCI-ADR/ RES	Ectoderme	5,0
Cólon	HT-29	Endoderme	4,0
Próstata	PC-3	Mesoderme	5,0
Melanoma	UACC-62	Ectoderme	5,0
Ovário	OVCAR-3	Mesoderme	7,0
Renal	786-O	Mesoderme	4,5
Leucemia	K-562	Mesênquima	5,0
Glioma	U251	Ectoderme	4,0
Epitélio	VERO	Ectoderme	5,0

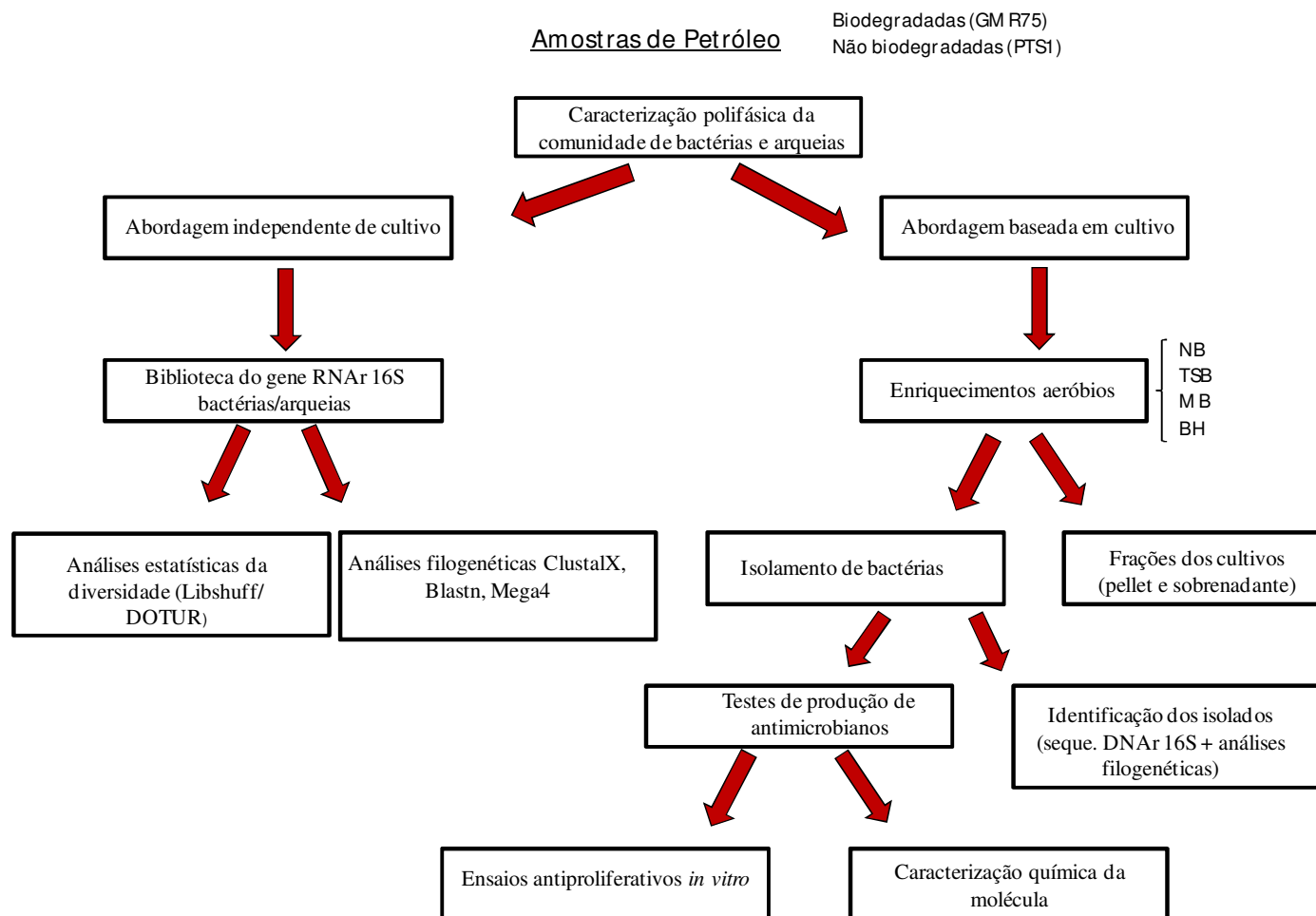
Os extratos, após evaporação do solvente, foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 1 g/ml. Para a adição na cultura de células, estas soluções foram diluídas pelo menos 400 vezes em RPMI/SFB/gentamicina, para evitar a toxicidade do DMSO.

Para o teste de atividade, foram plaqueados 100 µL de células em meio RPMI/SFB/gentamicina, nas suas respectivas densidades de inoculação (Tabela 3), em placas de 96 poços, as quais foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Depois desse período de adaptação, uma placa controle foi fixada através da adição de ácido tricloroacético para determinação da quantidade de proteínas no momento da adição dos extratos. Nas demais placas, os extratos foram adicionados nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL e, a seguir, incubadas por 48 horas. Após este período, as placas foram fixadas com 50 µL de ácido tricloroacético a 50% (TCA). Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora a 4°C e submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada, para a remoção dos resíduos

de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Após a lavagem, as placas foram mantidas em temperatura ambiente até a secagem completa.

As placas foram então coradas pela adição de 50 µL do corante protéico sulforrodamina B (SRB) a 0,4 % (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1 %, e incubadas a 4 °C, durante 30 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas com uma solução de ácido acético 1%. Após secagem à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com uma solução de Trizma Base na concentração de 10 µM e pH 10,5. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540 nm em um leitor de microplacas (Skehan *et al.*, 1990). Com isso, foram calculados os valores de TGI, (da sigla em inglês *Total Growth Inhibition*), concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular (Shoemaker *et al.*, 2006).

5 FLUXOGRAMA DETALHADO DAS ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO DO PROJETO:



6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Enriquecimentos microbianos aeróbios

Após 7 dias de incubação das amostras de petróleo GMR 75 e PTS1 nos diferentes meios de cultura, foi possível verificar o crescimento bacteriano pela turvação do meio e formação de precipitado em todos os meios.

Foi possível obter colônias isoladas após sucessivos repiques por esgotamento ou diluições seriadas de alíquotas dos enriquecimentos aeróbios. No total, foram isoladas 26 colônias bacterianas morfologicamente diferentes entre si, sendo 7 do poço PTS1 e 19 do poço GMR75.

A identificação dos isolados baseada no sequenciamento e análise do gene RNAr 16S revelou a recuperação de pelo menos 13 gêneros diferentes de bactérias, considerando os dois poços em estudo (Figura 2). Sequências de DNA de 3 isolados não apresentaram qualidade adequada para as análises filogenéticas subsequentes. Entretanto, buscas de similaridade utilizando a ferramenta Blast-n do Genbank revelaram que estes isolados são afiliados aos gêneros *Curtobacterium* (acesso Genbank, FJ626630.1), *Pseudomonas* (acesso Genbank, FJ482092.1) e à família *Nocardioideaceae* (acesso Genbank, FJ200392.1).

Pelas limitações técnicas inerentes ao estudo das bactérias anaeróbias, não foi possível isolá-las no presente estudo, dando prioridade para as bactérias aeróbias. Entretanto, em função das evidências crescentes sobre a relevância dos micro-organismos anaeróbios na biodegradação do petróleo em reservatórios, serão concentrados esforços na implementação de sistema de cultivo e manuseio de bactérias anaeróbias para estudos futuros na Divisão de Recursos Microbianos.

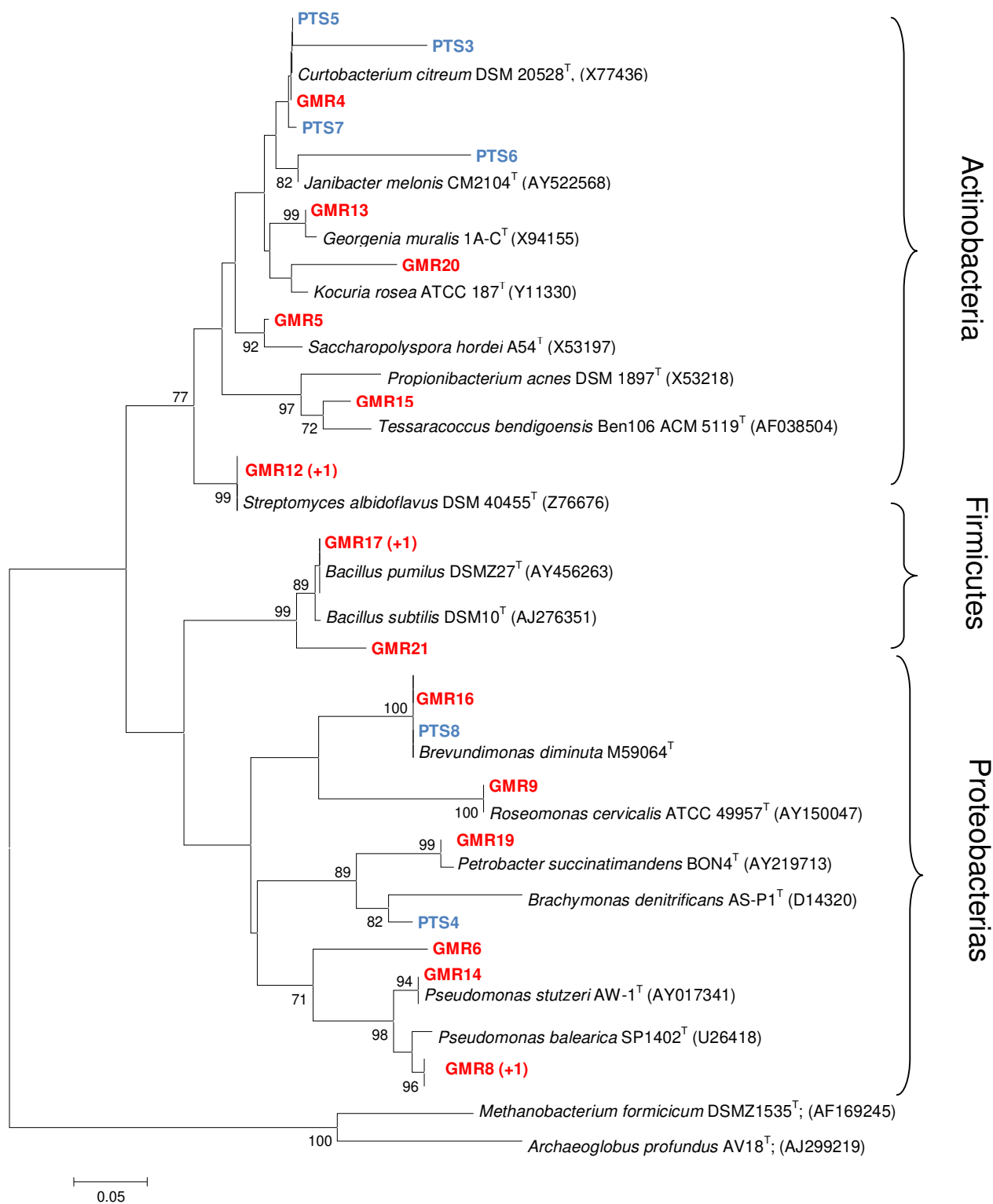


Figura 2. Análise filogenética das seqüências parciais do gene RNAr 16S das bactérias isoladas a partir dos enriquecimentos de petróleo dos poços PTS1 e GMR75 e micro-organismos relacionados recuperados da base de dados Genbank. Valores de *bootstrap* ≥ 70 podem ser observados na árvore. Os organismos *Methanobacterium formicicum* e *Archaeoglobus profundus* foram utilizados como *outgroups*.

6.2 Extração de DNA e PCR do gene RNAr 16S

Foram avaliados dois protocolos descritos pela literatura (Yoshida *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2002), incluindo modificações já estabelecidas pelo nosso grupo de pesquisa, assim como os kits comerciais *QIAmp DNA Stool Mini Kit* (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), *PowerSoil DNA isolation MOBIO* e *kit Fast DNA* (Q.biogene SPIN Kit for Soil) visando a obtenção do DNA total da microbiota presente no petróleo bruto. Nenhum destes protocolos produziu quantidade de DNA suficiente que pudesse ser visualizada em gel de agarose corado com brometo de etídio (dados não mostrados). Entretanto, o kit *PowerSoil DNA isolation (MOBIO)* ofereceu várias vantagens em relação aos demais protocolos, incluindo uma maior eficiência de extração de DNA, verificada pela melhor amplificabilidade do DNA em reações de PCR, e um volume inicial de amostra 10 vezes menor.

Os resultados de amplificação do gene RNAr 16S a partir do DNA total extraído das amostras de petróleo dos poços GMR e PTS estão mostrados na Figura 3.

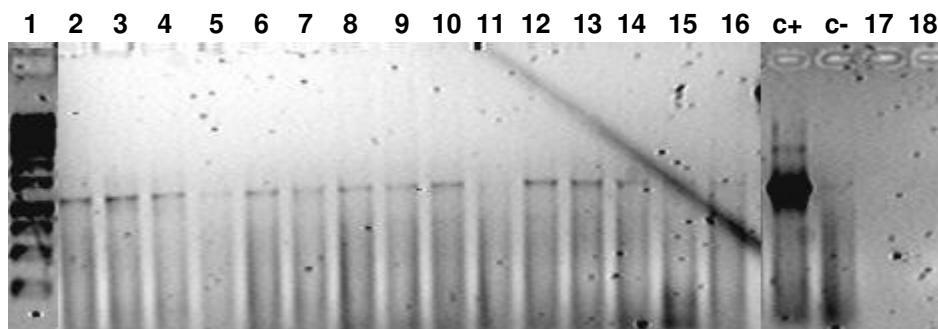


Figura 3. PCR do gene RNAr 16S a partir do DNA total das amostras de óleo biodegradado, não-biodegradado, utilizando primers genéricos para o Domínio Bactéria. **Canaletas:** **1**, Marcador de peso molecular *ladder* 1 Kb; **2, 3 e 4**, PCR a partir de 0,1, 1 e 2 uL de DNA do petróleo GMR75 extraído com kit Qiagen; **5, 6 e 7**, PCR a partir de 0,1, 1 e 2 uL de DNA do petróleo GMR75 extraído com kit Fast DNA; **8, 9 e 10**, PCR a partir de 0,1, 1 e 2 uL de DNA do petróleo GMR75 extraído com kit MoBio; **11, 12 e 13**, PCR a partir de 0,1, 1 e 2 uL de DNA do petróleo PTS1 extraído com kit Qiagen; **14, 15 e 16**, PCR a partir de 0,1, 1 e 2 uL de DNA do petróleo PTS1 extraído com kit MOBIO, **C+** *Streptomyces venezuelae*, utilizado como controle positivo da reação de PCR; **C-** controle negativo da reação de PCR (sem DNA); **17**, 1 uL de DNA do petróleo GMR75; e **18**, 1 uL de DNA do petróleo PTS1.

O PCR das amostras de DNA do petróleo são de difícil execução, uma vez que a quantidade de DNA extraído do petróleo é muito baixa. Para contornar esse problema foram feitas várias replicatas das reações de PCR com diferentes concentrações de DNA. Os produtos de PCR que pertenciam ao mesmo poço, provenientes de reações independentes, foram combinados em um mesmo tudo de 1,5 mL e o volume foi concentrado em speed vacuum. A Figura 4 mostra a banda correspondente ao fragmento do gene RNAr 16S amplificado a partir das amostras GMR75 e PTS1, após concentração em speed vacuum.

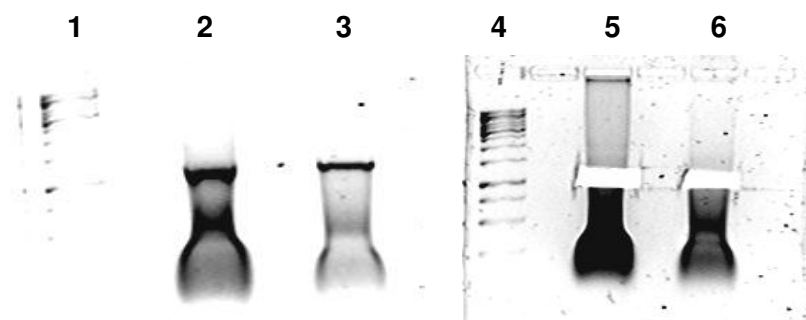


Figura 4: Canaletas: **1 e 4**, Marcador de peso molecular *ladder* 1 Kb; **2**, produto de PCR do gene RNAr 16S do poço GMR75; **3**, produto de PCR do gene RNAr 16S do poço PTS1; **5 e 6**, bandas recortadas do mesmo gel para purificação em colunas GFX.

A amplificação do gene RNAr 16S de arqueias foi ainda mais difícil de ser obtida que o de bactérias. Ao todo foram usadas 3 combinações de pares de *primers* diferentes (20f e 1017r, 46f e 1017r e 46f e 915r), de acordo com os dados da literatura, e testados 2 programas diferentes. A Figura 5 mostra os testes feitos com diferentes combinações de primers e programas na tentativa de obter amplificação do gene RNAr 16S de arqueias. A combinação de *primers* 46f e 915r com o programa ARC3 foi bem sucedida e permitiu a visualização de bandas intensas de tamanho esperado, correspondentes à amplificação do gene RNAr 16S, quando a estratégia de nested-PCR foi empregada (Figura 5, canaletas 14 a 19).

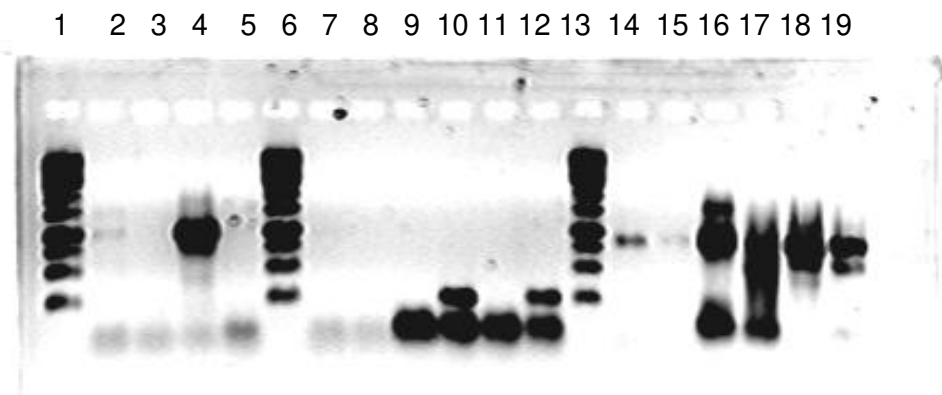


Figura 5. PCR do gene RNAr 16S de arqueia a partir do DNA total das amostras de óleo do poço GMR75 e do poço PTS1, utilizando diferentes pares de *primers*. **Canaletas: 1, 6 e 13** Marcador de peso molecular *ladder* 1 Kb; **2, 3, 4 e 5** amplicons obtidos com os *primers* 20F e 1017r e programa Arc2 a partir do poço GMR75, poço PTS1, controle positivo (C+ *Pirococcus worseyi*) e controle negativo (C-), respectivamente; **7, 8, 9, 10, 11 e 12**, amplicons obtidos com os *primers* 46F e 1017r e programa Arc2 a partir da amostra de DNA do GMR75, do PTS1, da amostra de PCR (*Nested*) anterior de GMR75, do PTS1, C+ e C-, respectivamente; **14, 15, 16, 17, 18, 19**, amplicons obtidos com os *primers* 46F e 915r e programa **ARC3** a partir da amostra de DNA do GMR75, do PTS1, da amostra de PCR anterior de GMR75 e PTS1 (*Nested*), a partir da amostra de PCR anterior de GMR75 e PTS1 (*Nested*) diluído 1/50, respectivamente.

Os produtos de PCR resultantes das diferentes replicatas de reação foram combinados, aplicados em eletroforese em gel de agarose e, após excisão das bandas, foram purificados em colunas GFX. Este procedimento permitiu obter produtos de amplificação do gene RNAr 16S de arqueias com qualidade e quantidade adequadas para clonagem (Figura 6).

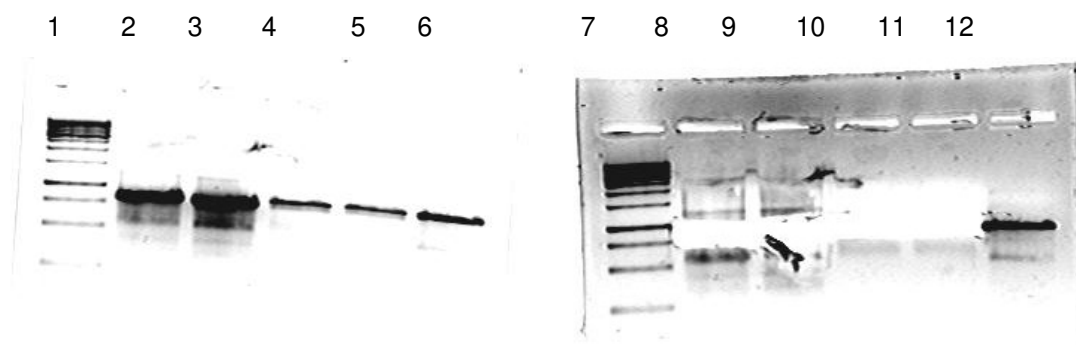


Figura 6. Canaletas: **1 e 7**, Marcador de peso molecular *ladder* 1 Kb; **2 e 3**, amplicon do gene RNAr 16S de arqueia do poço GMR75; **4 e 5**, amplicon do gene RNAr 16S de arqueia do poço PTS1, **6**, controle positivo C+; **8 e 9**, bandas recortadas do mesmo gel para purificação em colunas GFX para as amostras do poço GMR75; **10 e 11**, bandas recortadas do mesmo gel para purificação em colunas GFX para as amostras do poço PTS1.

6.3 Construção de bibliotecas do gene RNAr 16S e seqüenciamento

A análise das sequências de ambas as bibliotecas revelou uma diversa população de bactérias. Neste estudo, foram analisados um total de 129 clones para o poço GMR75 (biodegradado) e 140 clones para o poço PTS1 (não biodegradado), com qualidade para análises subsequentes por inferência filogenética.

No poço GMR75 pelo menos 35 gêneros bacterianos distintos, distribuídos dentre 8 filos (Firmicutes, Proteobacterias, Actinobacteria, Spirochaetes, Deferribacteres, Bacteroidetes, Thermotoga e Synergistetes) foram encontrados na biblioteca de genes RNAr 16S (Tabelas 4 e 5; Figura 7). O poço PTS1, apesar de ser considerado um poço não-biodegradado, apresentou uma microbiota com grande diversidade de bactérias. Neste caso, 31 gêneros diferentes foram encontrados, entre elas clássicas degradadoras de hidrocarbonetos (Tabelas 4 e 5). Não obstante, a diversidade observada em níveis taxonômicos mais baixos foi menor do que aquela encontrada no poço biodegradado GMR75, uma vez que apenas 5 filos bacterianos foram identificados (Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi e Thermotoga) (Figura 8).

A análise das sequências indicou que os gêneros mais abundantes no poço GMR75 foram *Deferribacteres* (12,4%), *Acinetobacter* (11,6%) e *Leuconostoc* (8,5%), e no poço PTS1 os gêneros mais abundantes foram *Geobacillus* (30%), *Leuconostoc* (15,7%) e *Petrotoga* (12,8%) (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. Gêneros mais próximos de Proteobactérias encontrados nas bibliotecas dos poços GMR75 e PTS1, número de clones em cada gênero e % de similaridade com as linhagens encontradas no banco de dados Blastn.

Filogenia	Grupos	Nº de clones		% de similaridade
		GMR75	PTS1	
Alfaproteobacteria	<i>Rhizobium</i>	2	3	99
Alfaproteobacteria	<i>Methylobacterium</i>	0	3	99
Alfaproteobacteria	<i>Paracoccus</i>	0	1	99
Alfaproteobacteria	<i>Pseudovibrio</i>	0	1	99
Alfaproteobacteria	<i>Xanthobacter</i>	1	0	99
Betaproteobacteria	<i>Achromobacter</i>	0	4	99
Betaproteobacteria	<i>Dechlorosoma/Azospira</i>	8	0	99
Betaproteobacteria	<i>Hydrogenophilus</i>	0	1	99
Betaproteobacteria	<i>Petrobacter</i>	0	1	96
Betaproteobacteria	<i>Thauera</i>	2	5	99
Gamaproteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	15	1	96-100
Gamaproteobacteria	<i>Citrobacter</i>	0	2	99
Gamaproteobacteria	<i>Lysobacter</i>	0	1	100
Gamaproteobacteria	<i>Rahnella</i>	1	4	97-99
Gamaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	4	1	99
Gamaproteobacteria	<i>Stenotrophomonas</i>	1	0	99
Deltaproteobacteria	<i>Geobacter</i>	1	0	98
Deltaproteobacteria	<i>Pelobacter</i>	1	0	98
Deltaproteobacteria	<i>Syntrophorhabdaceae</i>	1	0	98
Deltaproteobacteria	<i>Syntrophus</i>	1	0	95
Deltaproteobacteria	<i>Syntrophaceae</i> , não cultivada	1	0	98
Deltaproteobacteria	Bactéria não-cultivada	3	0	97

Tabela 5. Gêneros mais próximos de outros Filos encontrados nas bibliotecas dos poços GMR75 e PTS1, número de clones em cada gênero e % de similaridade com as linhagens encontradas no banco de dados Blastn.

Filogenia	Grupos	Nº de clones		% de similaridade
		GMR75	PTS1	
Actinobacteria	<i>Actinomyces</i>	0	1	93
Actinobacteria	<i>Brevibacterium</i>	1	0	99
Actinobacteria	<i>Corynebacterium</i>	0	1	99
Actinobacteria	<i>Curtobacterium</i>	0	1	99
Actinobacteria	<i>Dietzia</i>	3	0	97-100
Actinobacteria	<i>Kocuria</i>	2	6	99-100
Actinobacteria	<i>Propionibacterium</i>	1	5	98-99
Actinobacteria	<i>Rubrobacter</i>	2	0	99
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	4	1	98-99
Actinobacteria	Bactéria não-cultivada	0	1	99
Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i>	1	0	95
Bacteroidetes	<i>Petrimonas</i>	1	0	99
Chloroflexi	<i>Chloroflexi</i>	0	1	95
Deferribacteres	<i>Calditerrivibrio</i>	9	0	94-95
Deferribacteres	<i>Deferribacteres</i>	16	0	98-99
Firmicutes	<i>Acetivibrio</i>	0	1	99
Firmicutes	<i>Clostridium</i>	0	1	99
Firmicutes	<i>Geobacillus</i>	0	42	97-99
Firmicutes	<i>Lactobacillus</i>	0	2	98
Firmicutes	<i>Lactococcus</i>	4	1	99
Firmicutes	<i>Leuconostoc</i>	11	22	98-99
Firmicutes	<i>Oxobacter</i>	2	0	91
Firmicutes	<i>Paenibacillus</i>	0	7	99
Firmicutes	<i>Staphylococcus</i>	1	2	99-100
Firmicutes	<i>Streptococcus</i>	2	1	97-99
Firmicutes	<i>Veillonella</i>	1	0	99
Firmicutes	<i>Weissella</i>	10	0	97-99
Spirochaetes	<i>Spirochaetales</i> , não-cultivada	10	0	98-99
Synergistetes	<i>Aminanaerobia</i> , não cultivada	4	0	96-99
Thermotoga	<i>Petrotoga</i>	1	18	98-99
Thermotoga	<i>Thermotogae</i> , não cultivada	1	0	97

A análise de diversidade de arqueias só foi possível para o poço GMR75. Neste caso, 100% dos clones banco de genes RNAr 16S se mostraram afiliados à família Methanomicrobiaceae. As espécies mais próximas encontradas foram *Methanofollis liminatans* e *Methanofollis tationis* (Anexo 1). Infelizmente, o sequenciamento dos clones do poço PTS1 não foi bem sucedido mesmo após

inúmeras tentativas, tanto com os *primers* M13r e M13f, como com os *primers* específicos de arqueias (exemplo no Anexo 2).

A aplicação de *primers* universais para a amplificação direta por PCR de genes RNAr 16S a partir do DNA de comunidades microbianas, associada às metodologias de clonagem e sequenciamento, tem gerado uma vasta quantidade de dados, redefinindo a diversidade procariótica (Green & Keller, 2006).

Ambos os poços de petróleo estudados têm a característica de serem poços de extração primário, onde não houve a injeção de água para a recuperação secundária do petróleo, sugerindo que os componentes da microbiota detectados através das abordagens utilizadas são organismos indígenas aos poços.

A maioria dos gêneros de bactérias detectados nos poços GMR75 e PTS1 foi encontrada através da abordagem independente de cultivo. No entanto, alguns gêneros, como *Janibacter*, *Georgenia*, *Saccharopolyspora*, *Tessaracoccus*, *Brevundimonas* e *Brachymonas* não foram recuperados utilizando esta abordagem, sugerindo a necessidade de sequenciamento de um número maior de clones para que se possa cobrir toda a diversidade presente na amostra. Estes dados demonstram que uma visão mais abrangente da diversidade microbiana no óleo, assim como em outros ambientes, pode ser obtida usando uma combinação das técnicas convencionais baseadas em cultivo com as técnicas moleculares independentes de cultivo, corroborando resultados prévios reportados por outros autores (Chandler *et al.*, 1997; Stephen *et al.*, 1996; Sette *et al.*, 2007).

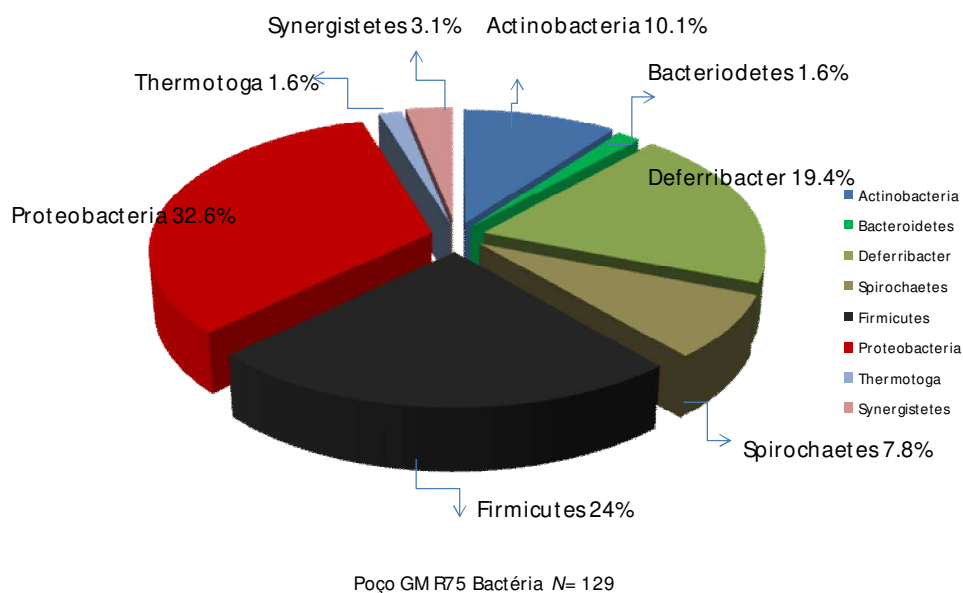


Figura 7. Diversidade de filos bacterianos encontrados na biblioteca de genes RNAr 16S da amostra de óleo do poço GM R75.

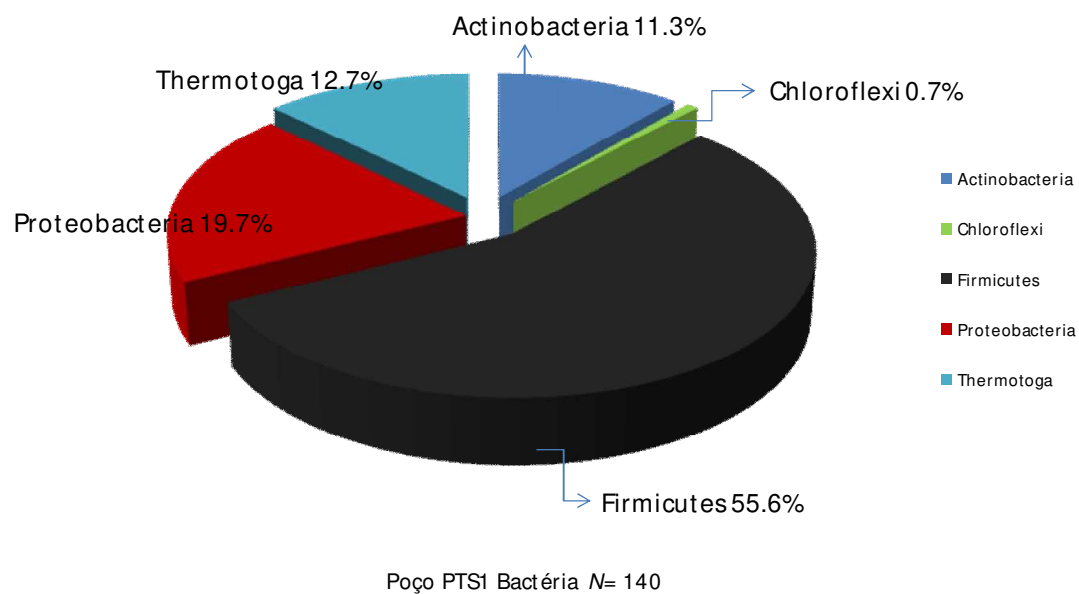


Figura 8. Diversidade de filos bacterianos encontrados na biblioteca de genes RNAr 16S da amostra de óleo do poço PTS1.

6.4 Significância ecológica dos membros dominantes das comunidades

De acordo com a revisão na literatura, os filos encontrados em ambos os poços já foram citados em ambiente petrolíferos, a saber: Actinobacteria, Bacteroidetes, Spirochaetes, Synergistetes, Deferribacteres, Chloroflexi, Firmicutes, Proteobacteria e Thermotogae.

O Filo Actinobacteria foi encontrado em ambos os poços estudados (Figura 10). Estas bactérias já foram identificadas em diversos poços de petróleo ao redor do mundo, e são bem conhecidas como degradadoras de hidrocarbonetos (Nazina *et al.*, 2002; Zrafi-Nouira *et al.*, 2008; Rouvière *et al.*, 2003; Salinas *et al.*, 2004). *Dietzia*, uma das espécies detectadas, já foi isolada e caracterizada em estudos anteriores por nosso grupo de pesquisa a partir de óleos da Bacia de Campos, e demonstrou excelentes atividades de lipases, esterases e monooxigenase (Vasconcellos, 2006; Vasconcellos *et al.*, 2009). *Streptomyces* spp. já foram isoladas de reservatórios de petróleo e caracterizadas quanto ao potencial degradador aeróbio de hidrocarbonetos (Radwan *et al.*, 1995, 1998), no entanto em trabalho publicado por (Sette *et al.*, 2007) foi detectado que a maior abundância deste gênero foi relacionado a poços não-biodegradados o que sugere que estes organismos não são os principais responsáveis pela degradação de hidrocarbonetos nos poços de petróleo.

Bacteroidetes, Spirochaetes, Synergistetes e Deferribacteres foram filos encontrados somente no poço GMR75 (Figura 10). Bacteroidetes e Spirochaetes já foram descritos em ambientes petrolíferos e em culturas de enriquecimentos inoculadas com óleo. São fermentadores de produtos da degradação anaeróbia de hidrocarbonetos, como, ácidos orgânicos de cadeia curta, em acetato ou H₂ (Schink *et al.*, 1997; Grabowski *et al.*, 2005; Zrafi-Nouira *et al.*, 2008; Dahle *et al.*, 2008; Wrighton, 2005). No entanto, esta fermentação só é energeticamente favorável quando as concentrações de acetato e hidrogênio são mantidas baixas pelos organismos acetotróficos e hidrogenotróficos (Schink *et al.*, 1997; Dojka *et al.*, 1998). As Synergistetes incluem bactérias recentemente descritas por Yamane e colaboradores (2008) em amostras de óleo bruto oriundas da China. Por fim as Deferribacteres que são bactérias ferro-redutoras acetoclásticas e já foram descritas em poços de petróleo ao redor do mundo (Pham *et al.*, 2009). Nove clones dentre as Deferribacteres foram associados ao gênero *Calditerrivibrio*. Não há descrição na literatura desses organismos em petróleo, sendo o único registro deste gênero em fontes termais do Japão (Iino *et al.*, 2008), com crescimento ótimo a 55°C. Isto torna esse resultado especificamente interessante, uma vez que todos os clones relacionados a este gênero apresentaram menos de 95% de similaridade com sequências depositadas no banco de dados GenBank, sugerindo que esta possa ser uma espécie nova do gênero de ocorrência em petróleo.

O Filo Chloroflexi foi encontrado apenas no poço PTS1 e contou com apenas 1 clone (Figura 10). Essas bactérias eram previamente conhecidas como bactérias verdes não relacionadas ao

enxofre (*green nonsulfur bacteria*). São ubíquas no ambiente e desempenham um papel importante na degradação de macromoléculas (Schink *et al.*, 1997; Wrighton, 2005).

O Filo Thermotogae foi detectado em ambos os poços (Figuras 10), sendo *Petrotoga* o gênero representado. Estas bactérias são anaeróbias, fermentadoras, halofílicas moderadas e características de poços de petróleo, sendo consideradas por muitos autores como bactérias indígenas a este ambiente. Já foram descritas em diferentes poços de alta temperatura ao redor do mundo, em alto mar no Congo e no Golfo do México (Miranda-Tello *et al.*, 2004; 2007).

Representantes do Filo Firmicutes foram encontrados em ambos os poços, relacionados às Classes *Bacilli* e *Clostridia* (Figura 9). Com relação à Classe *Bacilli*, os gêneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* foram comuns em ambos os poços. Estes são cocos Gram positivos não formadores de endosporos e anaeróbios facultativos. A presença de *Leuconostoc* e *Staphylococcus* já foi descrita em petróleo em estudo anterior (Sette *et al.*, 2007). Alguns autores demonstraram a utilização de *Leuconostoc* em processos de recuperação melhorada de óleo, conhecidos pela sigla de MEOR (*Microbial Enhancement Oil Recovery*) (Behlu" Igil & Mehmetogelu *et al.*, 2002). Ainda da família das *Leuconostoc* foram encontrados 10 clones afiliados ao gênero *Weissella*, não existem relatos da presença dessas bactérias em petróleo até então. Clones afiliados aos gêneros *Geobacillus*, *Paenibacillus* e *Lactobacillus* foram encontrados apenas no poço PTS1. *Geobacillus* foi o gênero mais abundante neste poço, com 42 clones. Estas bactérias são termofílicas, algumas degradadoras de hidrocarbonetos já descritas em poços de petróleo de alta temperatura. Outras linhagens podem estar associadas à degradação de parafina nos reservatórios (Chamkha *et al.*, 2008; Sood & Lal, 2007; Liu *et al.*, 2008). Da classe *Clostridia*, os gêneros *Oxobacter*, *Veillonella* e clones proximamente relacionados ao gênero *Desulfotomaculum* foram encontrados apenas no poço GMR75 e os gêneros *Acetivibrio* e *Clostridium* foram encontrados apenas no poço PTS1. Os membros dessa classe são anaeróbicos termofílicos ou mesofílicos já descritos em poços de petróleo (Yamane *et al.*, 2008), podendo ser organismos indígenas capazes de suportar altas temperaturas e pressão.

O Filo Proteobacteria foi representado por clones pertencentes às classes Alfa, Beta, Gama e Deltaproteobacteria (Figura 11). No entanto, as deltaproteobacterias foram encontradas somente no poço GMR75. Cinco gêneros, *Thauera*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Rahnella*, foram encontrados em ambos os poços. *Thauera* spp. são bactérias desnitrificantes, anaeróbias facultativas, importantes oxidadoras do tolueno em benzoyl-CoA, o qual é um intermediário central no catabolismo anaeróbico de compostos aromáticos (Leuthner *et al.*, 1999). *Pseudomonas* e *Acinetobacter* são bem conhecidas como hábeis degradadoras aeróbias de hidrocarbonetos e amplamente descritas em ambientes associados a petróleo (Bachoon *et al.*, 2001; van Beilen *et al.*,

1994, Bach *et al.*, 2003). *Rahnella* foi detectada recentemente em enriquecimentos de petróleo (Vasconcellos *et al.*, 2010).

Além das deltaproteobactérias, os clones relacionados a *Xanthobacter* (alfaproteobacteria), *Stenotrophomonas* (gamaproteobacteria) e *Dechlorosoma/Azospira* (betaproteobacteria) foram exclusivos ao poço GMR75. Uma espécie do gênero *Xanthobacter*, *Xanthobacter polyaromaticivorans*, descrita por Hirano (2004), é capaz de degradar compostos heterocíclicos aromáticos contendo enxofre em lodo de refinaria de petróleo. *Stenotrophomonas spp.* já foram previamente identificadas em reservatórios e ambientes contaminados com petróleo (Yoshida *et al.*, 2005). Bactérias relacionadas aos gêneros *Dechlorosoma/Azospira* são conhecidas por serem capazes de gerar oxigênio molecular através da redução de “(per)cloratos” em anaerobiose (Waller *et al.*, 2004), podendo representar uma fonte de oxigênio biogênico em ambientes anaeróbicos, o que levanta a hipótese da possível formação de ilhas de respiração aeróbia em comunidades petrolíferas.

Das proteobactérias encontradas exclusivamente no poço PTS1 estão *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudovibrio*, *Achromobacter*, *Hydrogenophilus*, *Petrobacter*, *Citrobacter* e *Lysobacter*. *Methylobacterium spp.* já foram encontradas em poços de petróleo na Bacia de Campos, Brasil (Sette *et al.*, 2007) e em poços não biodegradados do oriente médio (Yamane *et al.*, 2008). *Paracoccus spp.* foram encontrados em solo contaminado com petróleo e possuem capacidade degradadora de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Davis *et al.*, 1969; Zhang *et al.*, 2004). Um clone relacionado a *Pseudovibrio* que são bactérias desnitrificantes, transformam NO_3^- e NO_2^- em N_2O e N_2 . Dois clones relacionados ao gênero *Petrobacter* (Salinas *et al.*, 2004), são bactérias redutoras de nitrato moderadamente termofílicas isoladas de poços de petróleo da Austrália. Cinco clones foram afiliados ao gênero *Achromobacter* (Mulkins-Phillips *et al.*, 1974), em artigo publicado por Vasconcellos e colaboradores (2009) também detectaram *Achromobacter* em amostras de petróleo não-biodegradado e moderadamente biodegradado, no entanto uma espécie, *Achromobacter xylosoxidans*, foi isolada de poço de petróleo altamente biodegradado, o que indica uma presença bastante ampla em reservatórios de petróleo. Esta última possui especial habilidade de degradar biomarcadores de petróleo como o “colestano”. *Hydrogenophilus*, *Lysobacter* e *Citrobacter* não possuem descrição na literatura de sua presença em óleo bruto.

As arqueias metanogênicas, encontradas apenas no poço GMR75, já foram detectadas em diversos reservatórios ao redor do mundo (Dahle *et al.*, 2008; Grabowski *et al.*, 2005; Yamane *et al.*, 2008). Li e colaboradores (2007) encontraram arqueias metanogênicas em amostras de água de formação de reservatório de petróleo terrestre de alta temperatura. Em outro estudo, Pham e colaboradores (2009) detectaram estes organismos em água de formação de reservatório de petróleo mesotérmico. As arqueias metanogênicas têm um importante papel no processo terminal de degradação dos hidrocarbonetos em reservatórios de petróleo.

6.5 Hipóteses para o processo de degradação de hidrocarbonetos

De acordo com Stams (1994), a possível sequência de eventos capaz de explicar a degradação de moléculas orgânicas complexas em anaerobiose a dióxido de carbono e metano, requer a ação de três grandes grupos metabólicos de bactérias: **Fermentadoras, Sintróficas Acetogênicas e Metanogênicas.**

Do grupo das bactérias fermentadoras foram encontradas em ambos os poços bactérias já descritas em ambientes petrolíferos, como *Leuconostoc* e *Petrotoga*. Entretanto, não se sabe bem a partir de quais moléculas elas são capazes de crescer em reservatórios.

Algumas hipóteses de degradação de hidrocarbonetos em anaerobiose já foram levantadas (tendo como aceptores finais de elétrons nitrato, ferro ou sulfato), sendo que mecanismo de ativação mais comum detectado em diversos sistemas fisiológicos de anaeróbios é a incorporação de um radical fumarato nos hidrocarbonetos a qual gera produtos com succinato na molécula, capazes de entrar na β -oxidação. Os artigos de Widdel e colaboradores (2001) e Aitkens *et al.* (2004) ilustram bem os tipos de biodegradação em anaerobiose conhecidos, bem como algumas bactérias envolvidas, capazes de gerar precursores orgânicos para o metabolismo de outras bactérias. Por outro lado, Slobodkin e colaboradores (1999), mostraram que algumas linhagens têm a capacidade de crescer (quimio)litotroficamente com auxílio de hidrogênio molecular e ferro, sendo portando estes micro-organismos independentes da presença de hidrocarboneto mas possivelmente associado à mistura do petróleo contribuindo para o manutenção do consórcio (Stevens *et al.*, 2006).

Já os produtos da fermentação, como ácidos graxos maiores que dois átomos de C, álcoois maiores que um átomo de carbono e ácidos graxos aromáticos, compostos possivelmente oxidados no metabolismo acetogênico, seriam a base da cadeia metabólica para as bactérias seguintes do consórcio (Schink *et al.*, 1997).

Em ambientes metanogênicos a degradação de hidrocarbonetos supostamente ocorre pela associação sintrófica (processo no qual uma espécie utiliza como substrato produtos do metabolismo de outras espécies) entre bactérias acetogênicas (*Syntrophus*), as quais metabolizam hidrocarbonetos (ou compostos menores resultantes do metabolismo das fermentadoras) em acetato e H_2 , e micro-organismos metanogênicos que utilizam estes compostos - acetato e H_2/CO_2 – e formam metano como produto final. Esse mecanismo foi proposto para a degradação de compostos monoaromáticos e alcanos em anaerobiose (Zengler *et al.*, 1999). Recentemente, Jones e colaboradores (2008) validaram o estudo da degradação de óleo bruto em anaerobiose pela via metanogênica de redução de CO_2 e H_2 , à qual foi dado o nome de MADCOR. Ainda neste estudo, verificou-se que a maior parte da degradação de hidrocarbonetos era feita pela via metanogênica hidrogenotrófica (75-92%), a qual utiliza o H_2 ao invés de acetato para a produção de metano,

indicando que o acetato deva ser oxidado sintroficamente em CO_2 e hidrogênio antes de ser convertido em metano. Estes resultados fortalecem as evidências anteriores de que para ocorrerem as reações acetogênicas é essencial que haja uma baixa pressão de H_2 (da ordem de 10^{-4} atm), para que as reações sejam termodinamicamente favoráveis ($\Delta G < 0$) (Schink *et al.*, 1997; Stams *et al.*, 2006).

Comparando as comunidades microbianas das amostras de óleo dos poços em estudo, é possível identificar alguns grupos de micro-organismos chaves na cadeia ecológica de degradação de hidrocarbonetos no poço GMR75. Da via destacada acima, que envolvem Fermentadoras → Sintróficas acetogênicas → Metanogênicas, foram encontrados representantes dos três grupos no poço biodegradado (GMR75), ao passo que no poço não-biodegradado (PTS1) somente as fermentadoras foram detectadas.

Das intermediárias **sintróficas acetogênicas**, foram encontrados 8 clones afiliados à Classe Deltaproteobacteria, sendo 3 desses clones proximamente relacionados com bactérias do gênero *Syntrophus*, similares àquelas encontradas em estudos prévios (Zengler *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2008). Outros 4 clones representantes do Filo *Synergistetes* também foram encontrados, os quais possivelmente exercem o mesmo papel ecológico de produtores de acetato no ambiente (Pham *et al.*, 2009). Estas bactérias, conhecidas como homoacetogênicas, são capazes de catalizar a formação de acetato (CH_3COO^-) a partir de unidades de Carbono (C1), como CO_2 (Diekert *et al.*, 1994). Estas bactérias também foram descritas recentemente por Yamane e colaboradores (2008) em óleo bruto oriundo da China. Segundo estes autores, as *Synergistetes* parecem estar bem adaptadas a condições de alta temperatura, alta pressão e anaerobiose, podendo ser indígenas a reservatórios de petróleo.

Um caso especial foi relatado por Shink e colaboradores (1997) de bactérias homoacetogênicas da linhagem AOR, que podem realizar tanto a formação quanto a degradação de acetato, em ambas as direções, provavelmente com o mesmo aparato bioquímico, dependendo simplesmente das concentrações dos substratos e dos produtos. Podem ainda, sintetizar ATP em ambas as direções, ilustrando o quão próximo do equilíbrio termodinâmico é o metabolismo energético das bactérias anaeróbias no subsolo.

Por fim, foram encontradas arqueias metanogênicas afiliadas à Família Methanomicrobiaceae, e proximamente relacionadas ao gênero *Methanofollis* e a um isolado obtido de cultura primária de água de formação proveniente do depósito de óleo Gangxi, na Rússia (no. de acesso no Genbank GU129125). Estas arqueias são cocos irregulares, mesofílicas, já foram isoladas de reatores de degradação de butirato e têm a característica de produzirem metano apenas pelo consumo de H_2 , o que caracterizaria o final da rota de degradação anaeróbia dos hidrocarbonetos (Zellner *et al.*, 1999).

Vale ressaltar ainda a grande abundância de bactérias ferro-redutoras do Filo Deferribacteres (representadas por 15 clones de bactérias não cultivadas e 9 clones do gênero *Calditerrivibrio*), que utilizam o acetato em seu metabolismo, o que reforça a hipótese da presença de um intermediário acetogênico na comunidade, necessário para sustentar a população dessas acetocláticas (Hori *et al.*, 2007). A utilização do acetato pelas ferro-redutoras é outro fator que reforça a idéia de que a metanogênese nos poços estudados deva ser principalmente hidrogenoclástica, pois a redução do ferro III é mais energética que a metanogênese acetoclástica e as ferro-redutoras poderiam ter acesso mais rapidamente ao carbono do acetato do que estas últimas (Achtnich *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 1996).

Quanto ao potencial aeróbio de biodegradação nos poços, de acordo com as linhagens encontradas e comparando-as àquelas já levantadas na literatura, notamos a ocorrência de clássicas biodegradadoras em ambos os poços. No entanto, pela abundância observada de clones representantes de bactérias degradadoras, como *Acinetobacter*, *Thauera*, *Dietzia*, *Streptomyces* e *Pseudomonas*, pode-se inferir um possível maior potencial degradador para a comunidade presente no poço GMR75.

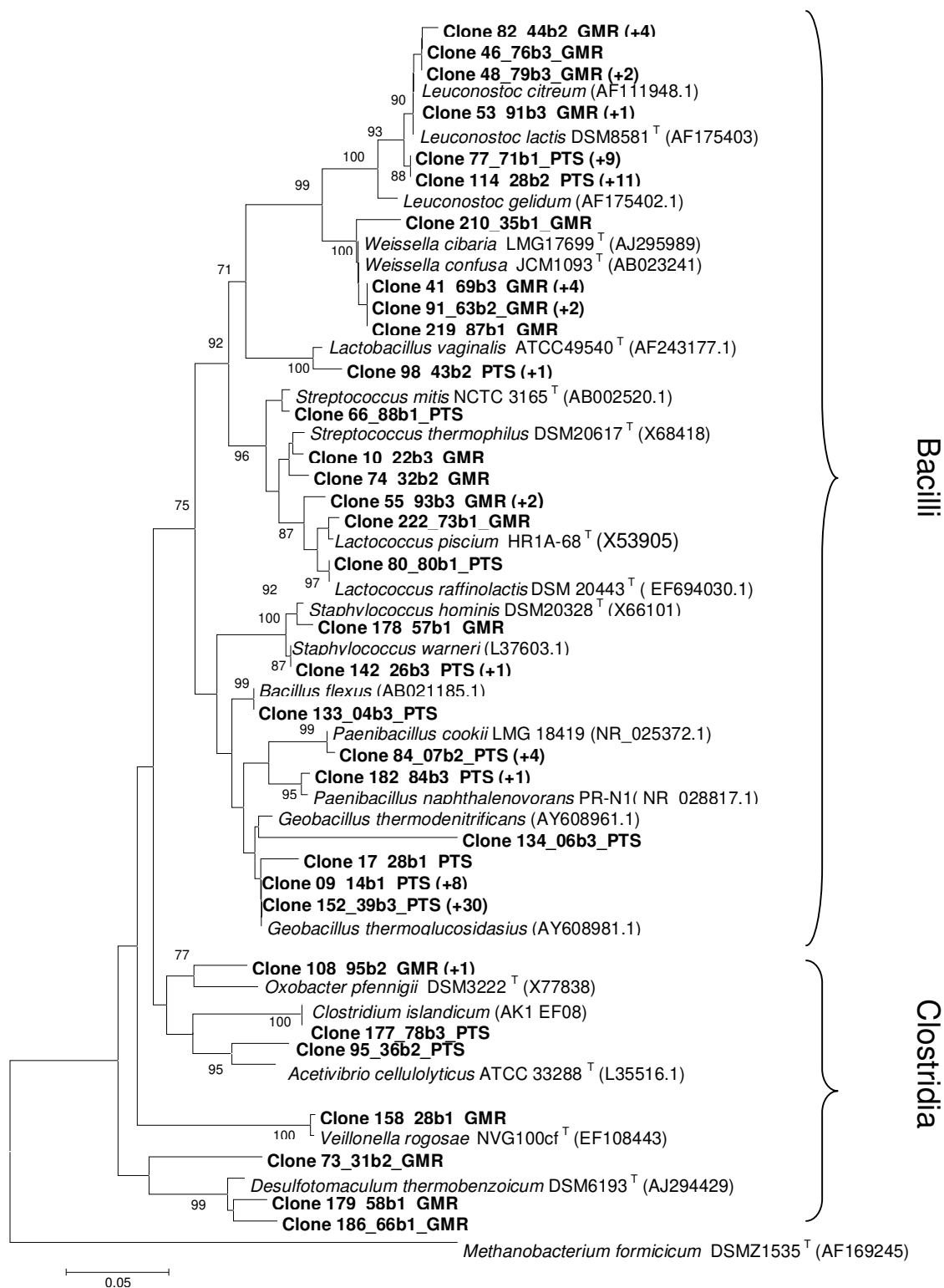


Figura 9. Análise filogenética baseada nas sequências do gene RNAr 16S das bibliotecas de clones dos poços GMR75 e PTS1, representando membros do filo *Firmicutes* e micro-organismos relacionados recuperados das bases de dados. Valores de *bootstrap* acima de 70 estão representados nos nós. *Methanobacterium formicicum* foi utilizada como *outgroup*. Números entre parênteses indicam clones adicionais com $\geq 97\%$ de similaridade de sequência com o clone representado na árvore.

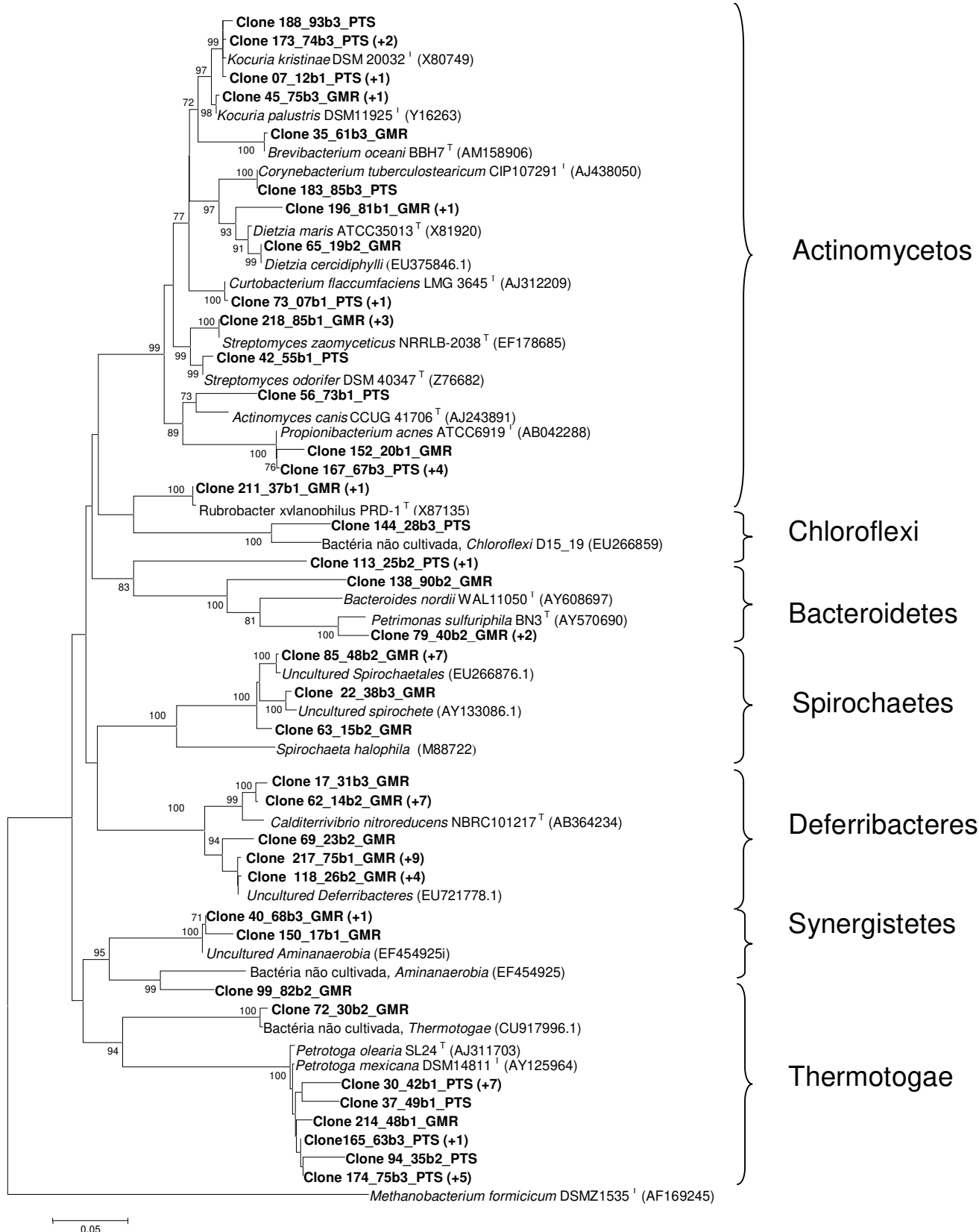


Figura 10. Análise filogenética baseada nas sequências do gene RNAr 16S das bibliotecas de clones dos poços GMR75 e PTS1, representando membros dos filos *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Deferribacteres*, *Synergistetes*, *Thermotogae* e micro-organismos relacionados recuperados das bases de dados. Valores de *bootstrap* acima de 70 estão representados nos nós. *Methanobacterium formicicum* foi utilizada como *outgroup*. Números entre parênteses indicam clones adicionais com $\geq 97\%$ de similaridade de sequência com o clone representado na árvore.

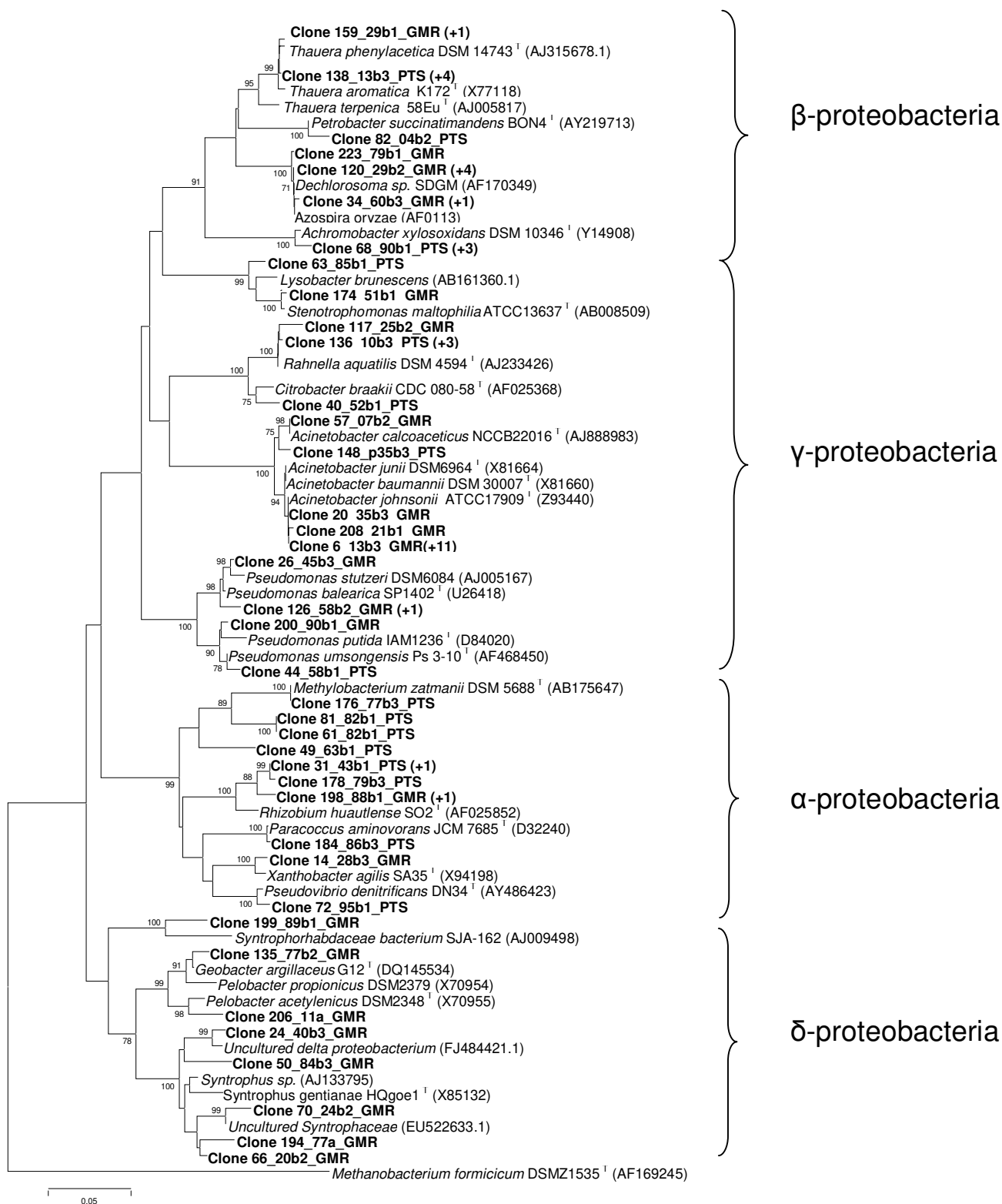


Figura 11. Análise filogenética baseada nas sequências do gene RNAr 16S das bibliotecas de clones dos poços GMR75 e PTS1, representando membros do filo *Proteobacteria* e micro-organismos relacionados recuperados das bases de dados. Valores de *bootstrap* acima de 70 estão representados nos nós. *Methanobacterium formicicum* foi utilizada como *outgroup*. Números entre parênteses indicam clones adicionais com $\geq 97\%$ de similaridade de sequência com o clone representado na árvore.

6.6 Análises de diversidade

O programa Libshuff foi usado para comparar a diversidade filogenética entre as bibliotecas GMR75 e PTS1, bem como a cobertura obtida com relação às amostras ambientais. Duas bibliotecas são consideradas diferentes se suas curvas de cobertura homóloga e heteróloga diferem significativamente (Singleton *et al.*, 2001). Essa análise permitiu mostrar estatisticamente que há diferenças significativas entre as bibliotecas de genes RNAr 16S das amostras de óleo, com valor de P igual a 0.001 para ambas as amostras (Figura 12, A e B).

A) Curvas de cobertura para GMR75 (X) comparada ao PTS1 (Y)

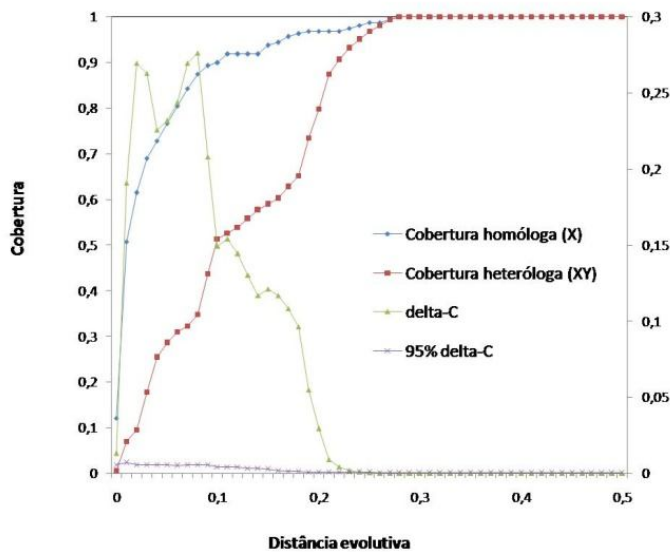
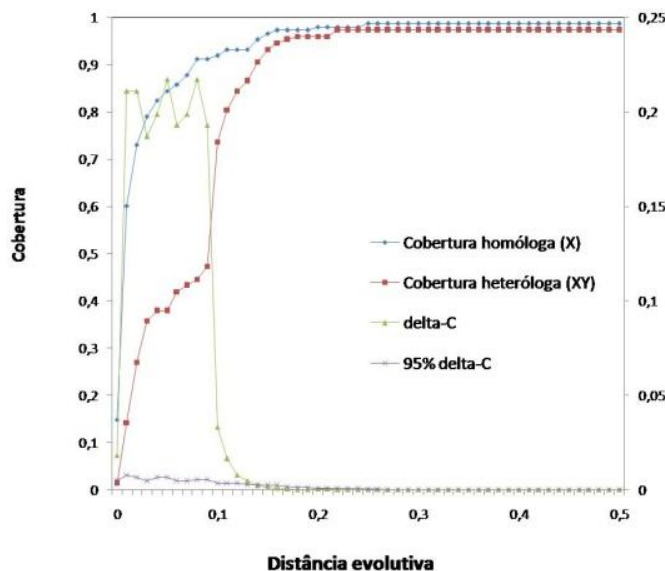


Figura 12. Comparação da cobertura genética entre as bibliotecas dos poços GMR75 e PTS1.

A- Cobertura homóloga GMR75 (linha e círculos azuis) e cobertura heteróloga representada pela linha vermelha. Linhas verdes indicam o valor de $(C_x - C_{xy})^2$ para a amostra original e linha roxas mostram $P=0,001$ de valores $(C_x - C_{xy})^2$ para uma amostragem randomizada.

B) Curvas de cobertura para PTS1 (X) comparada ao GMR75 (Y)



B- Cobertura homóloga PTS1 (linha e círculos azuis) e cobertura heteróloga representada pela linha vermelha. Linhas verdes indicam o valor de $(C_x - C_{xy})^2$ para a amostra original e linha roxas mostram $P=0,001$ de valores $(C_x - C_{xy})^2$ para uma amostragem randomizada.

A análise da distribuição de $(C_x - C_{xy})^2$ (diferença entre os bancos) ao longo da distância taxonômica (D) revelou que os valores calculados para os dados reais (linhas verdes) excederam os valores calculados usando os dados randomizados (linhas roxas) em distâncias taxonômicas menores que 0,23, no caso da análise de GMR75 X PTS1 (quanto da diversidade da biblioteca GMR75 está representada na biblioteca PTS1) (Figura 12A). Estes resultados mostraram que as bibliotecas diferiram em níveis taxonômicos desde sequências proximamente relacionadas, como linhagens e espécies, até taxa mais baixos, como filós. Isto é explicado pelo fato de vários filós presentes na biblioteca GMR75 não terem sido observados na biblioteca PTS1. A curva de cobertura homóloga mostrou que a biblioteca GMR75 apresentou altas estimativas de cobertura para distâncias taxonômicas $D \geq 0,20$, como filo. Isso indica que mesmo que um número maior de sequências fosse analisado, novos filós provavelmente não seriam detectados.

A biblioteca PTS1, por outro lado, apresentou altas estimativas de cobertura para distâncias taxonômicas $D \geq 0,13$, sugerindo que taxa como ordens e classes foram totalmente amostrados na biblioteca (Figura 12B). A análise da cobertura heteróloga de PTS1 X GMR75 revelou que as bibliotecas diferiram em níveis taxonômicos $D \leq 0,10$, como espécies, gêneros e famílias. Neste caso, taxa mais inferiores como ordens, classes e filós da biblioteca PTS1 estão contidos na biblioteca GMR75.

Entretanto quando a distância considerada é de 0,03 (nível de espécie), fica clara a necessidade de aumentar o esforço amostral a fim de cobrir a diversidade de espécies de ambas as amostras, GMR75 e PTS1, ou seja, se uma quantidade maior de clones fosse sequenciada, novas unidades taxonômicas operacionais (UTO's) ou "espécies" ainda seriam encontradas.

As UTO's identificadas com auxílio do Programa DOTUR foram utilizadas para o cálculo dos estimadores de riqueza Chao e Ace e do índice de diversidade Shannon. As curvas foram obtidas para os diferentes níveis de distância taxonômica (D) entre as sequências, sendo o valor 0,2 correspondente à distância filogenética observada entre filós, o valor 0,1 correspondente à distância filogenética observada entre as ordens, 0,05 entre os gêneros e 0,03 entre as espécies. Considerando o valor de $D = 0,03$, foram definidas 63 UTO's no poço GMR75, sendo 40 singletons e 10 doubletons; e 47 UTO's no poço PTS1, sendo 27 singletons e 8 doubletons.

A análise de sequências do gene RNAr 16S aliada ao uso de estimadores não paramétricos permite comparações diretas entre membros de diferentes comunidades (Schloss e Handelsman, 2006). O índice de Shannon dá um peso maior para as espécies mais abundantes na amostra, sendo menos sensível à riqueza de espécies.

Tabela 6. Índice de diversidade e estimadores de riqueza das bibliotecas de genes RNAr 16S obtidas das amostras de óleo dos poços GMR75 e PTS1. A classificação das sequências foi baseada no valor de *cutoff* de 0,03 determinado pelo DOTUR.

Amostra	Dados Observados	ACE	Chao	Shannon
GMR75	63	179,136	153,214	3,9925
PTS1	47	135,041	104,375	3,5952

O cálculo do índice de diversidade Shannon revelou valores de diversidade muito similares para as bibliotecas de ambas as amostras de petróleo, sendo um pouco mais alto para o poço GMR75 (Tabela 6).

Magurran (2004) descreveu que o valor do índice de Shannon obtido a partir de dados empíricos geralmente cai entre 1,5 e 3,5, e raramente ultrapassa 4. Baseado nos valores do índice de diversidade encontrados na literatura para amostras de lodo (Lin et al., 2009), solo (Gremion et al., 2003) e esponjas marinhas (Mohamed et al., 2008), os índices de diversidade das bibliotecas GRM75 e PTS1 foram considerados altos (distância = 0.03).

Estimadores de riqueza não paramétricos, tais como ACE (*abundance-based coverage estimators*) e Chao1, foram descritos para estimar a riqueza total de filotipos (sequências de RNAr distintas) ou UTO's a partir da frequência de filotipos em uma biblioteca de clones (Hughes et al., 2001). Estes índices foram usados neste estudo para estimar o número total de UTO's nas comunidades de bactérias das amostras de petróleo. Os valores de ACE e Chao observados mostraram-se maiores para a amostra GMR75, corroborando os outros dados de análise de composição de comunidades discutidos anteriormente. Não obstante, em ambas as bibliotecas o número estimado de filotipos em nível de espécie foi bem maior do que os números observados (63 UTO's no poço GMR75 e 47 UTO's no poço PTS1 (Tabela 6).

6.7 Ensaios da atividade antimicrobiana

A idéia inicial de prospecção desses antimicrobianos era tentar estabelecer uma possível correlação entre o grau de biodegradação dos óleos e a produção de antimicrobianos por componentes da microbiota do reservatório, na tentativa de explicar porque um poço encontrado a cerca de 500 m de profundidade (considerado raso) encontra-se biodegradado e um poço a cerca de 800 m de profundidade (também raso) apresenta óleo não-biodegradado. A hipótese inicial era que membros da microbiota do poço PTS1 (não biodegradado) poderiam estar secretando antimicrobianos no meio, capazes de inibir o crescimento de outras bactérias degradadoras do petróleo.

Foram realizados então os ensaios de atividade antimicrobiana utilizando isolados bacterianos e as frações de cultivo, *pellet* e sobrenadante, conforme descrito anteriormente. Linhagens de bactérias, isoladas em estudos prévios a partir de reservatórios da Bacia de Campos e identificadas por nosso grupo de pesquisa como pertencentes aos gêneros *Bacillus* (8), *Halomonas* (1), *Micrococcus* (1), *Staphylococcus* (1), *Kocuria* (1), *Citricella* (1), *Marinobacter* (1), *Achromobacter* (1) e *Brevudimonas* (2), somadas às bactérias isoladas a partir dos diferentes enriquecimentos aeróbios realizados no presente estudo, foram testadas umas contra as outras como produtoras de antimicrobianos.

As frações do enriquecimento, possíveis locais de acúmulo de antimicrobianos, não apresentaram nenhum resultado de inibição satisfatório, sendo os experimentos realizados em três diferentes momentos, em duplicatas. No entanto, quando testamos as linhagens isoladas em estudos prévios como produtoras de antimicrobianos, obtivemos resultados interessantes em relação a três linhagens de *Bacillus*, uma delas *Bacillus firmus* e outras duas *Bacillus pumilus*. A linhagem *B. firmus* P1-1 foi a que melhor apresentou resultados, inibindo cerca de 90% das linhagens testadas, seguida pelas linhagens distintas de *B. pumilus* SG-30 e SG-32 com 70% e 60% de inibição, respectivamente (exemplo na Figura 13).

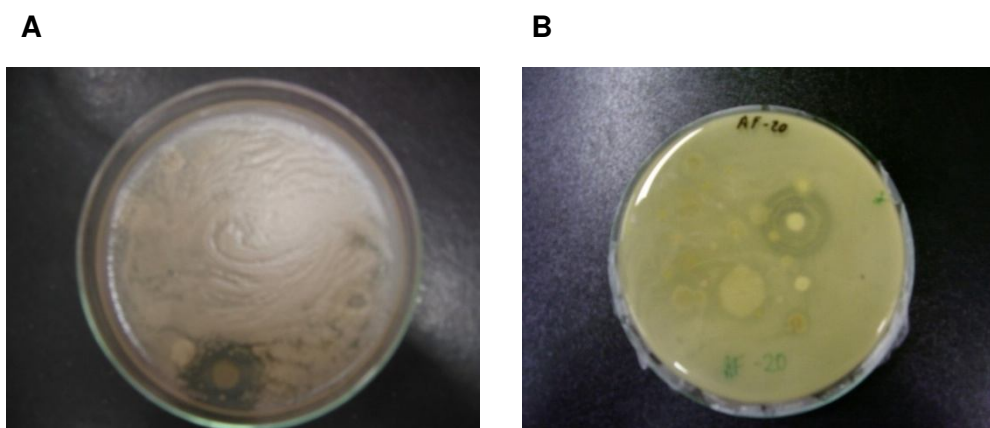


Figura 13. (A) Halo demonstrando a inibição de *Bacillus thuringiensis* (linhagem indicadora) por *Bacillus pumilus* SG-32 (linhagem produtora); e (B) de *Marinobacter* sp. (linhagem indicadora) por *Bacillus firmus* P1-1 (linhagem produtora).

Os biocidas têm sido considerados o método mais comum de combate à biocorrosão de superfícies e biodeterioração do óleo em sistemas fechados, como tanques de estocagem e resfriamento (Cheung & Beech, 1996). Entretanto, o custo e o impacto ambiental destes compostos devem ser levados em consideração, principalmente no caso de sistemas abertos. Bactérias formadoras de biofilme, incluindo *Bacillus*, são capazes de proteger diferentes superfícies metálicas

através do consumo de oxigênio dissolvido e/ou através da produção de substâncias antimicrobianas, que servem para controlar as populações competidoras no seu ambiente, e que acabam por inibir as bactérias redutoras de sulfato (Jayaraman *et al.*, 1999; Ornek *et al.*, 2002). Algumas destas substâncias são ativas apenas contra linhagens ou espécies proximamente relacionadas (Tagg *et al.*, 1976), enquanto outras apresentam um amplo espectro de atividade (Azuma *et al.*, 1992). Algumas linhagens de *Bacillus* já foram identificadas como produtoras de peptídeos antimicrobianos, como gramicidina S (Azuma *et al.*, 1992), polymixina B (Fujita-Ichikawa & Tochikubo, 1993), indolicina e batenecina (Jayaraman, 1999).

Estudos realizados por Korenblun e colaboradores (2005; 2008) reportaram o isolamento de três linhagens de *Bacillus* de reservatórios de óleos brasileiros, *Bacillus subtilis* (LFE-1), *Bacillus firmus* (H2O-1) e *Bacillus licheniformis* (T6-5), com capacidade de produção de substâncias antimicrobianas (AMS). Estas AMS inibiram o crescimento de outras linhagens de *Bacillus*, assim como o crescimento de consórcios de BRS recuperadas dos reservatórios.

6.8 Resultados do estudo da produção de antimicrobianos

As bactérias isoladas neste estudo a partir dos poços petróleo GMR75 e PTS1, bem como as frações dos meios de cultivo, não apresentaram resultados satisfatórios de inibição perante as linhagens indicadoras testadas. No entanto, 3 bactérias isoladas de projetos anteriores e testadas como indicadoras e produtoras em nosso estudo apresentaram significativa atividade de produção de metabólitos antimicrobianos.

6.8.1 Testes antiproliferativo *in vitro*

Os estudos para os testes antiproliferativos foram feitos a partir dos extratos brutos de duas linhagens, *Bacillus firmus* P1-1 e *Bacillus pumilus* SG-32. A Figura 14 apresenta os resultados obtidos na forma de Gráfico da Média (*Mean Graph*) para os valores de TGI, onde as barras expressas por valores maiores do que zero representam linhagens de células tumorais mais sensíveis frente à droga em relação à média das linhagens testadas, enquanto as barras com valores negativos representam linhagens menos sensíveis frente à droga em relação à média das linhagens testadas.

O valor de TGI permite avaliar a potencialidade e/ou seletividade de uma determinada amostra. São consideradas potentes as amostras que apresentam baixos valores de TGI, ou seja, que inibem totalmente o crescimento celular em baixas concentrações; e seletivas as amostras que apresentam baixos valores de TGI somente para determinadas linhagens tumorais. A atividade citocida é considerada mais interessante, já que proporciona a eliminação da célula tumoral, além da

redução das chances de formação de células resistentes a substâncias quimioterápicas (Petinari *et al.*, 2004).

Ainda, cabe ressaltar que a doxorrubicina, utilizada como controle positivo, é uma substância pura e sua atividade não deve ser comparada com misturas complexas de substâncias, tais como as de extratos brutos. Nestes casos, a atividade do extrato bruto pode ser menor ao da doxorrubicina, talvez pelo fato da substância responsável pela atividade estar diluída no extrato bruto. Essa comparação deve ser realizada em etapas posteriores, onde os compostos isolados são testados frente às linhagens tumorais humanas comparando-se com quimioterápicos como a doxorrubicina.

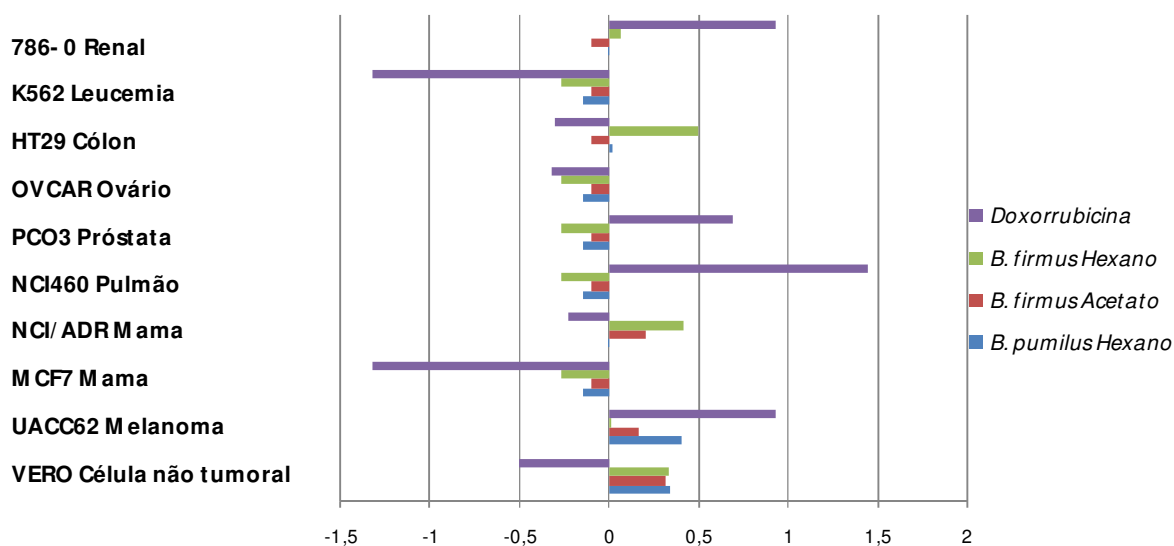


Figura 14. Resultado dos testes antiproliferativos com amostras de extrato bruto hexânico e de acetato de *B. firmus* P1-1 e extrato bruto hexânico de *B. pumilus* SG-32. Linhagens celulares mais sensíveis aos extratos são visualizadas como barras à direita, enquanto células mais resistentes apresentam barras à esquerda da média. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

De acordo com a Figura 14, verificou-se que os 3 extratos brutos testados apresentaram potencial anticâncer contra algumas linhagens tumorais. Os extratos de *B. firmus*, representados nas cores verdes e vermelhas, apresentaram melhores atividades anticâncer que o controle doxorrubicina contra as linhagens tumorais de HT29 cólon e NCI/ADR mama, ainda apresentaram pequena atividade anticâncer contra UACC62 melanoma e 786-0 renal. O extrato bruto de *B. pumilus* apresentou atividade anticâncer contra linhagem UACC62 melanoma. Cabe ressaltar que estes extratos apresentaram também um potencial citotóxico contra linhagens não-tumorais Vero. No entanto, estes resultados não inviabilizam a aplicação potencial do composto produzido por estas linhagens de *Bacillus* como agente antitumoral, pois esta inibição pode ter sido causada por outras moléculas eventualmente presentes nos extratos brutos. Neste sentido, novos testes usando o composto purificado deveriam ser feitos a fim de se obter resultados conclusivos.

A Tabela 8 apresenta os valores de TGI (*Total Growth Inhibition*) encontrados para as diferentes frações testadas com atividade anticâncer. Valores menores que 250 são aqueles que apresentaram atividade anticâncer nos testes, quanto mais próximo de zero maior é a capacidade inibitório do composto. Valores acima de 250 não apresentaram atividade e estão representados apenas como >250.

Tabela 8. Valores de TGI dos extratos brutos testados contra atividade tumoral. As frações em amarelo foram as que exibiram atividades antimicrobianas e estão no gráfico da média da Figura 17.

Extratos/Linhagens	UACC62	MCF7	NCI/ ADR	NCI460	PCO3	OVCAR	HT29	K562	VERO	786-0
Ext. part. Hexano <i>B. pumilus</i> 1524	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Ext. part. Acetato <i>B. pumilus</i> 1525	229,15	>250	212,83	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Ext. Sox. Hexano <i>B. pumilus</i> 1526	69,83	>250	179,13	>250	>250	249,86	168,10	>250	80,78	179,93
Ext. Sox. Acetato <i>B. pumilus</i> 1527	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Ext. Sox. Metanol <i>B. pumilus</i> 1528	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Ext. part. Hexanico <i>B. firmus</i> MB 1552	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Ext. part. Hexanico <i>B. firmus</i> TSB 1553	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Ext. part. Acetato <i>B. firmus</i> MB 1554	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Ext. part. Acetato <i>B. firmus</i> TSB 1555	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Ext. Sox. Acetato <i>B. firmus</i> 1556	134,44	>250	123,72	>250	>250	>250	>250	>250	97,20	>250
Ext. Sox. Hexano <i>B. firmus</i> 1557	133,40	>250	51,98	>250	>250	>250	42,89	>250	63,67	115,90
Ext. Sox. Metanol <i>B. firmus</i> 1558	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Doxorrubicina	1,38	>250	20,12	0,43	2,44	24,72	23,98	>250	38,41	1,41

Apesar dos resultados dos testes antiproliferativos terem se mostrado mais promissores para a linhagem *Bacillus firmus* P1-1, a linhagem *Bacillus pumilus* SG-32 foi escolhida para os testes subsequentes de caracterização do composto antimicrobiano, uma vez que apresentou halos de inibição significativamente mais nítidos do que os halos observados para *Bacillus firmus*. Os experimentos foram realizados em colaboração com a Divisão de Fitoquímica do CPQBA/UNICAMP, sob a supervisão da Dra. Mary Ann Foglio.

6.8.2 Caracterização cromatográfica da substância antimicrobiana de *Bacillus pumilus* SG-32

A análise de cromatografia de camada delgada (CCD) revelou bandas bem definidas para as duas misturas de solventes usadas, hexano/acetato de etila e diclorometano/metanol (Figuras 15 e 16). Foram analisados os compostos correspondentes às bandas que estavam melhor definidas, que corresponderam às amostras resultantes da extração por soxhlet utilizando os solventes hexano e acetato de etila.



Figura 15. Perfil observado por cromatografia de camada delgada (CCD) eluída com mistura de solventes Hexano/Acetato de etila (50:50) e revelada com reagente de anisaldeído, dos extratos brutos do sobrenadante (1: hexano e 2: acetato de etila) e extratos brutos da cultura com soxhlet (3: hexano, 4: acetato de etila e 5: metanol).

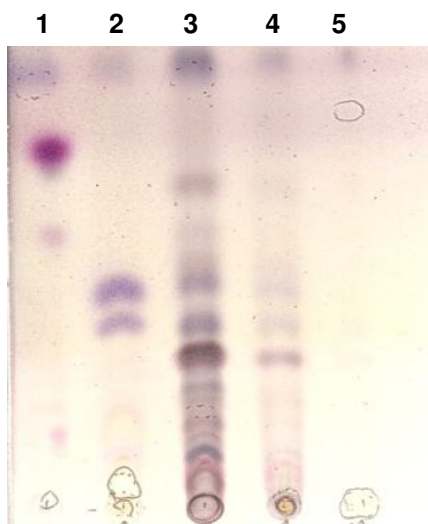


Figura 16. Perfil observado por cromatografia de camada delgada (CCD) eluída com mistura de solventes Diclorometano/Metanol (98:2) e revelada com reagente de anisaldeído, dos extratos brutos do sobrenadante (1: hexano e 2: acetato de etila) e extratos brutos da cultura com soxhlet (3: hexano, 4: acetato de etila e 5: metanol).

A partir dos ensaios de cromatografia de camada delgada foi possível observar dois pontos importantes: i) a melhor mistura de solvente para eluição foi o diclorometano/metanol (98:2); ii) o solvente que extraiu melhor os compostos de interesse foi o hexano (solvente menos polar).

Para checar a porção do extrato que possuía atividade antimicrobiana, foi realizado um ensaio de bioautografia, primeiramente com revelador MTT (metiltiazol tetrazólio) sobre a placa de CCD. O ensaio permitiu detectar duas zonas de inibição referente ao extrato hexânico de *B. pumillus*

SG-32 (Figura 17, círculos vermelhos). As outras regiões mais claras visualizadas na Figura 17 correspondem a artefato de técnica.

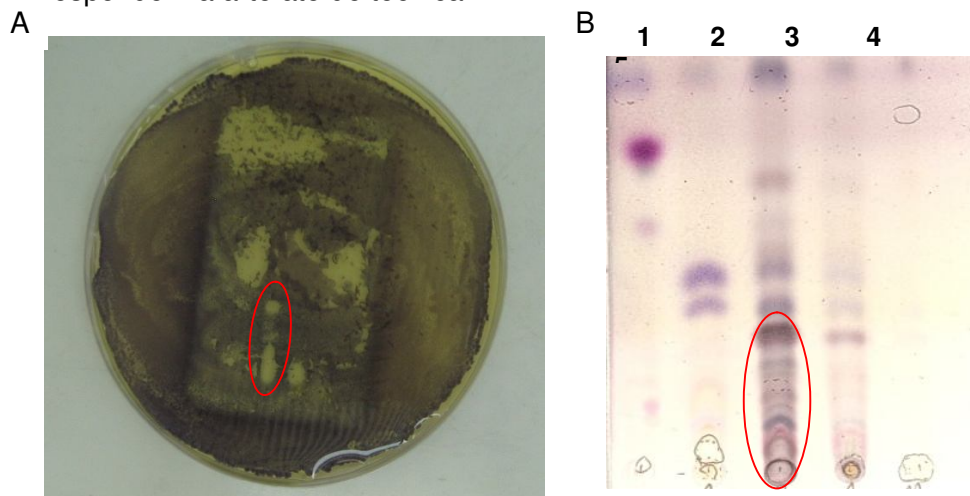


Figura 17. Bioautografia dos extratos brutos. Painel A corresponde a placa revelada com MTT e o círculo vermelho representa a porção do extrato que possui atividade antimicrobiana. Painel B corresponde ao perfil observado da CCD revelada com anisaldeído, o círculo vermelho representa a porção correspondente da placa ao lado

Em seguida, para obter frações mais puras do extrato bruto, foram utilizadas as técnicas cromatografia preparativa e separação por coluna (Figura 18). A cromatografia em placa preparativa se mostrou pouco eficiente na recuperação de massa do composto, sendo que menos de 1 mg de cada fração foi recuperada, e foi então descartada. A separação por coluna foi mais eficiente e foi utilizada nos testes subsequentes.

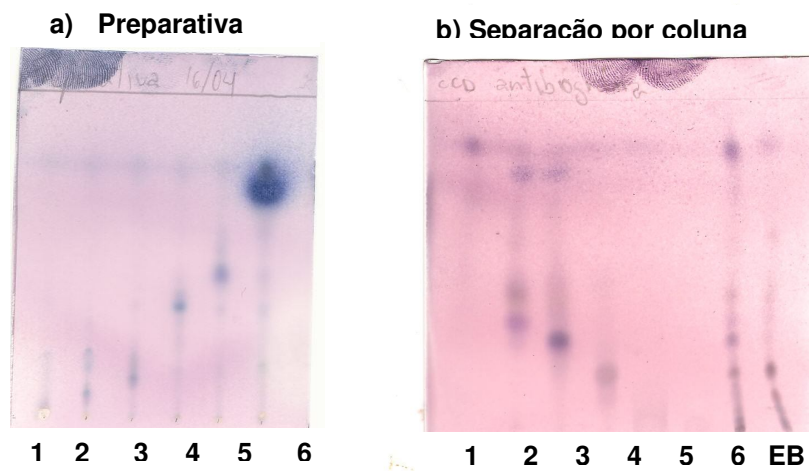


Figura 18. a) CCD das frações recuperadas após purificação pela técnica de cromatografia preparativa de 1 a 6 as frações recuperadas b) CCD das frações recuperadas pela purificação em coluna de sílica. As duas últimas corridas EB e C-, correspondem respectivamente ao extrato bruto sem purificar e ao controle negativo, que foi feita extração apenas do meio de cultura sem inoculação de micro-organismos.

Uma nova bioautografia foi feita a partir das frações recuperadas na separação por coluna (Figura 19).

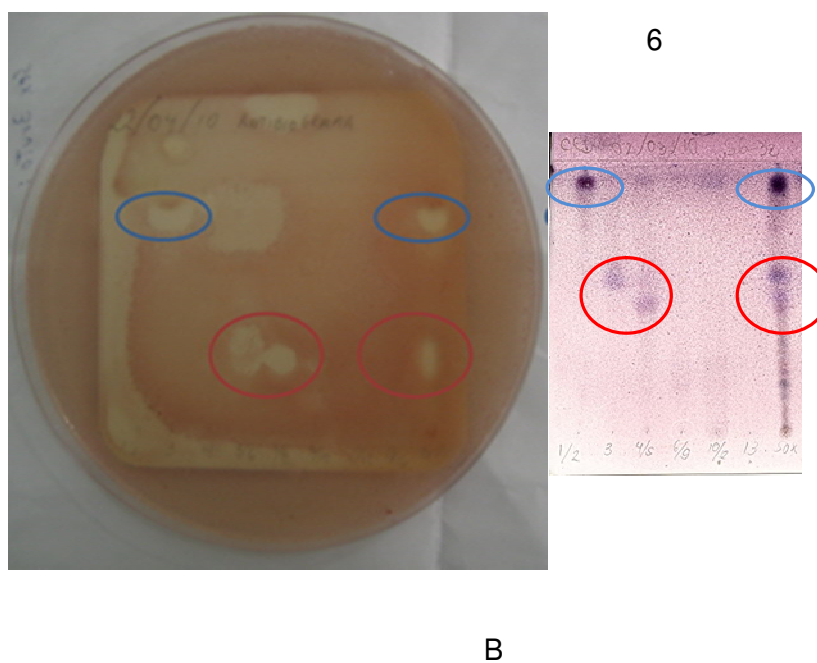


Figura 19. Bioautografia das bandas dos compostos com inibição. Painel A corresponde a placa revelada com CTT (2,3,5-cloroeto de trifenil tetrazolium) e Painel B representa a placa de CCD revelada com anisaldeído. Canaleta 1: fração 3 separada do extrato bruto. 2: Fração 5 separada do extrato bruto. 3: Extrato bruto com a presença das bandas das frações 3 e 5 com ação antimicrobiana. 4: Fração 3 correspondente na placa de CCD. 5: Fração 5 correspondente na placa de CCD e 6 Extrato bruto revelado em placa de CCD. Círculos azuis representam a fração 3 do extrato e os círculos vermelhos a fração 5.

Dos compostos isolados com atividade antimicrobiana, foram recuperados 16,2 mg do composto da fração (3) e 9,0 mg do composto da fração (5), correspondentes às zonas de inibição da Figura 19.

Em seguida, foi feita uma análise por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas CG-EM, na tentativa de elucidar a classe das moléculas em questão, Figuras 20 e 21. Os fragmentogramas dos picos visualizados nos cromatogramas estão destacados na Tabela 9.

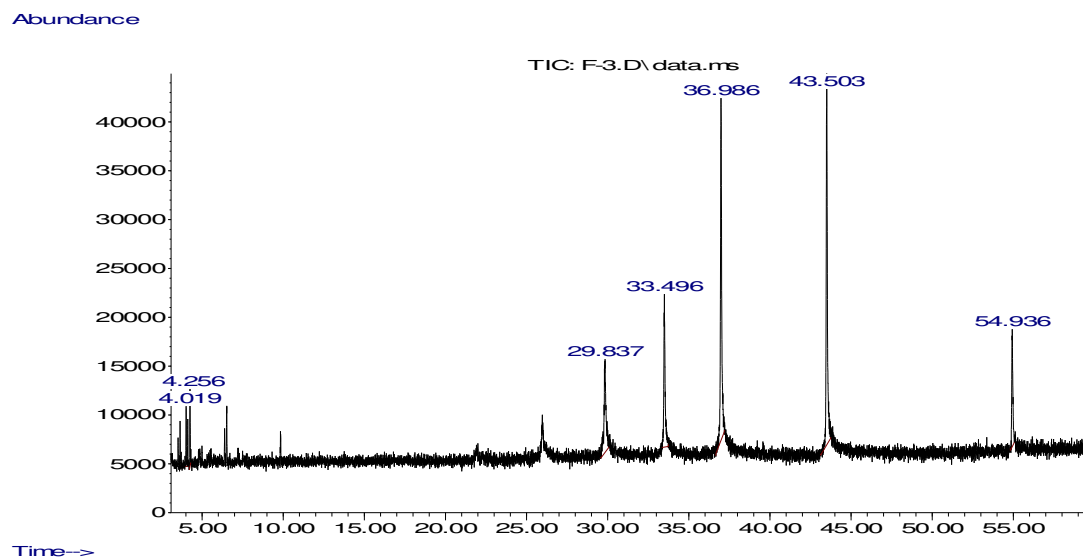


Figura 20. Perfil cromatográfico observado por CG/EM da Fração 3 do extrato Hexânico de *B. pumilus* SG-32.

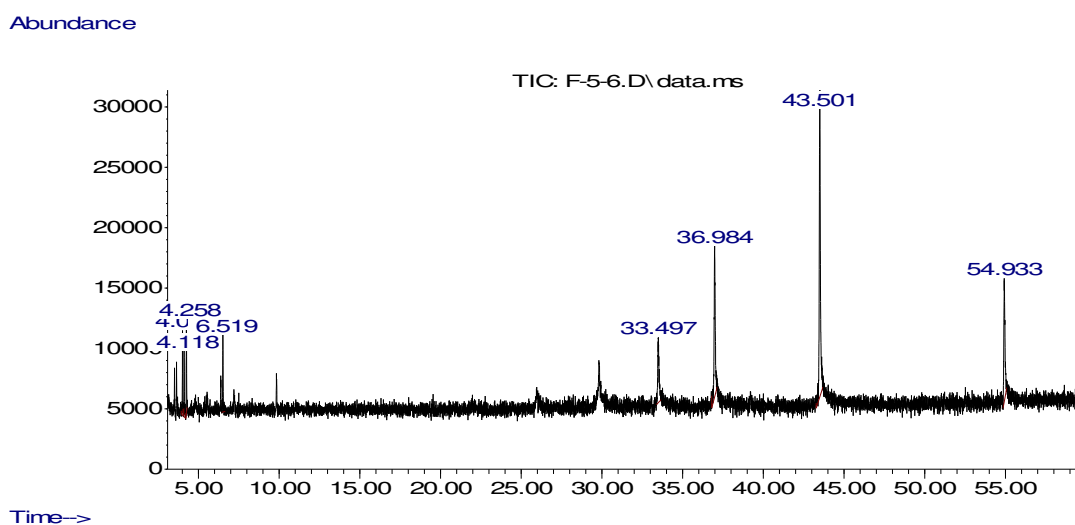


Figura 21. Perfil cromatográfico observado por CG/EM da Fração 5 do extrato Hexânico de *B. pumilus* SG-32.

Um levantamento na literatura dos resultados obtidos do CG-EM não revelou nada parecido com o que foi encontrado, que são compostos que remetem a uma série de hidrocarbonetos, (hexadecano, heptadecano, octadecano, etc). Tabela 9.

Tabela 9. Fragmentogramas obtidos das frações 3 e 5 dos cromatogramas acima. Os picos que obtiveram resolução estão representados abaixo.

	Picos t _R (min.)	IR* experimental	IR teórico (Adams, 2007)	Composto mais próximo
Fragmentogramas da fração 3	29,84	1597	1600	Hexadecano
	33,50	1698	1700	Heptadecano
	36,99	1798	1800	Octadecano
	43,50	1999	2000	Eicosano
Fragmentogramas da fração 5	6,52	1000	1000	Decano
	33,50	1698	1700	Heptadecano
	36,98	1798	1800	Octadecano
	43,50	1999	2000	Eicosano

*IR : Índice de Retenção

Em função das incertezas geradas pela metodologia, foi realizada uma análise de cromatografia gasosa de uma amostra do controle negativo, só com a extração do meio de cultura com hexano sem inóculo com o micro-organismo. Os resultados foram muito similares aos testes dos extratos, o que gerou dúvidas quanto à metodologia empregada Figura 22.

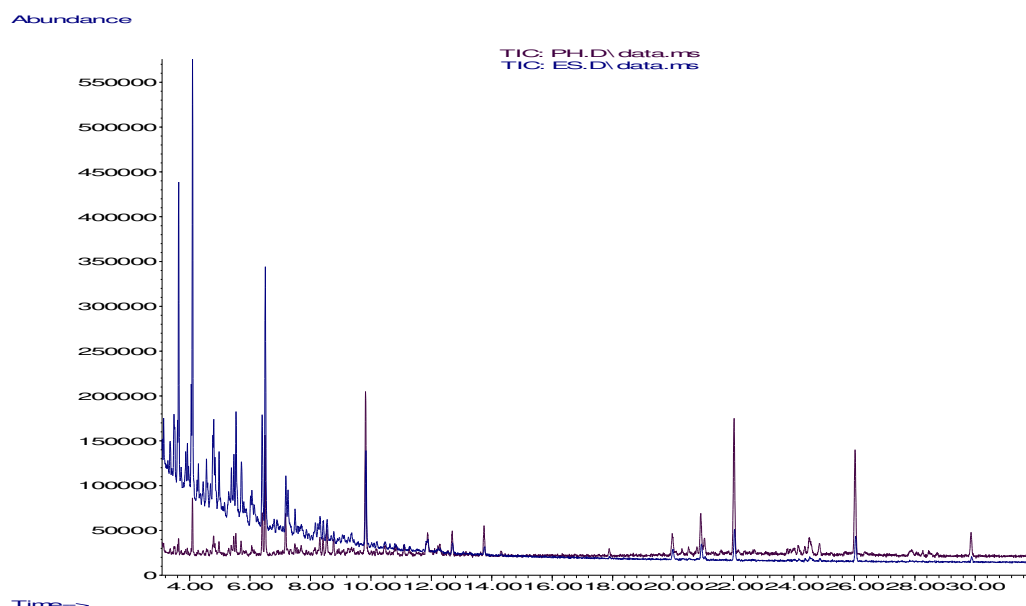


Figura 22. Espectros do extrato bruto com composto em azul e do controle negativo do meio de cultura em roxo. à exceção do ruído inicial do gráfico do extrato bruto, os picos seguintes são equivalentes.

Para elucidar melhor a molécula de interesse, foi utilizada a metodologia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de carbono e hidrogênio. Os resultados dos testes estão listados nos Anexos 3, 4, 5, 6, 7 e 8.. Apenas o composto da fração 3 foi passível de identificação. Para a fração 5 do composto, os resultados da Ressonância Magnética Nuclear revelaram que a quantidade isolada

foi insuficiente para os testes e o grau de pureza insatisfatório para as análises, como visto nos espectros dos Anexos 9 e 10. A Tabela 8 resume os valores dos dados experimentais obtidos até então da fração 3 do composto.

Tabela 8. Dados espectrais de RMN¹H e ¹³C do composto isolado (11 Tesla, CDCl₃).

Carbono (tipo)	$\delta^{13}\text{C}$ (<i>experimental</i>)	$\delta^{13}\text{C} \times \delta\text{H}$
		<i>HSQC</i>
CH ₃	15,37	s 0,97
CH ₃	17,35	1,30
CH ₃	22,01	2,05
CH ₃	22,65	2,00
CH ₃	36,61	1,00
CH ₂	18,37	1,37
CH ₂	22,48	0,83; 1,23
CH ₂	29,71	1,18; 1,25
CH ₂	37,40	1,05
CH ₂	38,89	1,05
CH ₂	43,51	1,2; 1,3
CH	30,90	2,1
CH	34,97	2,61
CH	44,60	1,4
CH	57,42	1,18
CH	72,70	5,1
CH	109,52	6,17
CH	140,57	6,18
C ^o	30,92	-
C ^o	33,08	-
C ^o	39,69	-
C ^o	122,23	-
C ^o	149,38	-
C ^o	170,48	-
C ^o	208?	-

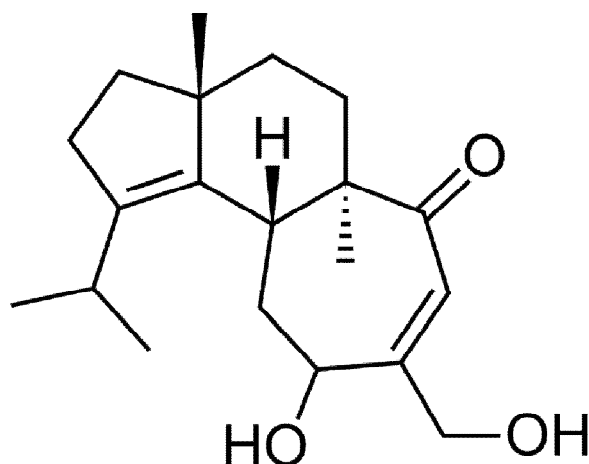


Figura 23. Esqueleto hipotético do composto ciatina (do inglês *Cyathin*).

A comparação dos dados experimentais obtidos neste estudo com aqueles da literatura (Shibata *et al.* 1998, Wachter *et al.* 1999, Urzúa *et al.* 2008, Enquist *et al.* 2009, Ayer *et al.* 1978, 1979, Kamo *et al.* 2004, Kenmoku *et al.* 2002, Shiono *et al.* 2008, Marcotullio *et al.* 2006, Nicoletti *et al.* 1996, Dong *et al.* 2009, Ward *et al.* 1987) sugerem que o composto obtido da fração 3 do extrato de cultivo de *Bacillus pumilus* SG-32 é um diterpeno com esqueleto básico do tipo ciatina (do inglês “Cyathin”). (Figura 23)

De acordo com a revisão feita por Enquist e Stoltz (2009), esta classe dos diterpenos já foi isolada de diversos organismos, como fungos e esponjas, mas não há relato até então dessa classe de compostos sendo produzida por bactérias. As ciatinas têm a característica de possuírem uma estrutura com anéis de 5-6-7 carbonos. Esta classe de compostos têm demonstrado importante atividade biológica, como antibiótica e antimicrobiana (Allbutt *et al.*, 1971; Ayer *et al.*, 1979; Shibata *et al.*, 1998; Wachter *et al.*, 1999), antitumoral (Peng *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2006; Sennett *et al.*, 1992) e a mais significativa delas, a habilidade de estimular a síntese de Fator de Crescimento Nervoso (da sigla em inglês NGF- *Nerve Growth Factor*), capacidade que implica em potencial terapêutico para tratamento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (Kawagishi *et al.*, 1994; Kawagishi *et al.*, 1996; Conner *et al.*, 1998; Kita *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2004).

A elucidação completa da molécula ainda não foi possível de ser obtida, os resultados dos experimentos com RMN não deram uma resolução capaz de se chegar ao composto final, novos experimentos serão feitos num esforço em se elucidar a conformação final da molécula.

7 .CONCLUSÕES

Analisando a microbiota presente em ambas as amostras de petróleo, biodegradada e não-biodegradada, foi possível concluir que as bactérias que compõem o nicho ecológico do petróleo biodegradado possivelmente utilizam da via de degradação anaeróbia metanogênica de redução de CO₂ e H₂ da sigla em inglês MADCOR. Além disso, apesar de terem sido encontrados clones representantes de micro-organismos com potencial de degradação no poço PTS1, a diversidade e abundância da microbiota com esse potencial foi maior no poço GMR75.

Os enriquecimentos aeróbios das amostras de óleo permitiram o isolamento de vários gêneros de bactérias que não foram detectados utilizando a abordagem independente-de-cultivo, demonstrando que uma visão mais abrangente da diversidade microbiana presente em reservatórios de petróleo pode ser obtida usando uma abordagem polifásica de estudo de comunidades microbianas, combinando técnicas convencionais baseadas em cultivo com técnicas moleculares.

Nossa hipótese de que poderia haver algum agente antimicrobiano inibindo o crescimento de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos no poço não-biodegradado não foi confirmada. No entanto, os ensaios de atividade antimicrobiana demonstraram que a bactéria *Bacillus pumilus* SG-32 apresentou inibição do crescimento de 60% das indicadoras testadas. A caracterização química do composto sugere que a molécula seja um diterpeno da classe das Ciatinas (do inglês *Cyathins*).

Ensaio antiproliferativos *in vitro* demonstraram que os extratos brutos de *B. firmus* P1-1 e *B. pumilus* SG-32 testados apresentaram potencial anticâncer contra algumas linhagens tumorais. Estes extratos apresentaram também um potencial citotóxico contra linhagens não-tumorais Vero. No entanto, novos testes usando o composto purificado devem ser feitos a fim de se obter resultados conclusivos, pois esta inibição pode ter sido causada por outras moléculas eventualmente presentes nos extratos brutos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham WR, Nogales B, Golyshin PN, Pieper DH & Timmis KN.** (2002) Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:246-53.
- Achtnich C, Bak F and Conrad R.** (1995) Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biol. Fertil. Soils* 19:65–72.
- Adams RP.** (2007) Identification of Essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy 4th ed. Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois.
- Allbutt AD, Ayer WA, Brodie HJ, Johri BN, Taube H.** (1971). Cyathin, a new antibiotic complex produced by *Cyathus helenae*. *Canadian Journal of Microbiology* 17 (11): 1401–7.
- Aitken CM, Jones DM, Larter SR.** (2004) Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs. *Nature* 431: 291-294.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* Sep 1;25(17):3389-402. Review.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer K.** (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.
- Amend JP, Teske A.** (2005) Expanding frontiers in deep subsurface microbiology *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 219:131– 155 .
- Ayer WA, Ling SP,** (1979) Synthetic efforts toward cyathane diterpenoid natural products *Can. J. Chem.*, 57, 3332–3337.
- Ayer WA, Lee SP and Nakashima TT.** (1979) Metabolites of bird's nest fungi. Part 11. Diterpenoid metabolites of *Cyathus earlei* Lloyd. *Can. J. Chem.*, 57, 3338–3343.
- Azuma T, Harrison GI and Demain AL.** (1992) Isolation of a gramicidin S hyperproducing strain of *Bacillus brevis* by use of a fluorescence activated cell sorting system. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38:173–178.
- Bach H, Berdichevsky Y, Gutnick D.** (2003) An exocellularprotein from the oil-degrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier emulsan. *Appl Environ Microbiol* 69:2608–2615.
- Bachoon DS, Araujo R, Molina M, Hodson RE** (2001) Microbial community dynamics and evaluation of bioremediation strategies in oil-impacted salt marsh sediment microcosms. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 27:72–79.
- Barns SM, Fundyga RE, Jeffries MW.** (1994) Remarkable archaeal diversity detected in a yellowstone-nationalpark hot spring environment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 (5), 1609–1613.
- Bastin E.** (1926) Microorganisms in oil fields. *Science*, 63:21-24.
- Behlu İlgi K, Mehmetogelu MT.** (2002) Bacteria for improvement of oil recovery: a laboratory study. *Energy Sources* 24:413–421.

- Blanquet SH; Benoit Y, Mare'chaux C, Monot F.** (2005). Assessing the role of alkane hydroxylase genotypes in environmental samples by competitive PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 1392–1403.
- Bonch-Osmolovskaya EA, Miroschnichenko ML, Lebedinsky AV, Chernyh NA, Nazina TN, Ivoilov VS, Belyaev SS, Boulygina ES, Lysov YP, Perov AN, Mirzabekov AD, Hippe H, Stackebrandt E, L'Haridon S, Jeanthon C.** (2003) Radioisotopic, culture-based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6143-51.
- Cardenas E, Tiedje JM.** (2008) New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Curr Opin Biotechnol.* Dec;19(6):544-9.
- Chamkha M, Mnif S, Sayadi S.** (2008) Isolation of a thermophilic and halophilic tyrosol-degrading *Geobacillus* from a Tunisian high-temperature oil field. *FEMS Microbiol. Lett.* 283:23-29.
- Chandler DP, Shu-Mei L, Spadoni CM, Drake GR, Balkwill DL, Fredrickson JK, Brockman FJ.** (1997) A molecular comparison of culturable aerobic heterotrophic bacteria and 16S rDNA clones derived from a deep subsurface sediment. *FEMS Microbiol Ecol* 23:131–144.
- Chao A.** (1984) Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* 11:265–270.
- Chao A, Ma MC, Yang MCK.** (1993). Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. *Biometrika* 80: 193–201.
- Chen X, Stewart PS** (2000) Biofilm removal caused by chemical treatments. *Water Res* 34:4229–4233.
- Chen CL, Wu JH, Liu WT.** (2008) Identification of important microbial populations in the mesophilic and thermophilic phenol-degrading methanogenic consortia. *Water Res.* Apr;42(8-9):1963-76.
- Cheung CWS & Beech IB.** (1996) The use of biocides to control sulfate-reducing bacteria in biofilms on mild steel surfaces. *Biofouling* 9, 231–249.
- Cherif A, Ouzari H, Daffonchio D, Cherif H, Ben Slama K, Hassen A, Jaoua S. and Boudabous A.** (2001) Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Letters in Applied Microbiology* 32, 243–247.
- Connor B, Dragunow M.** (1998) The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Rev* 27: 1–39 36.
- Connan J.** (1984) In: Brooks J, Welte DH Advances in petroleum geochemistry, vol 1. Academic, London, pp 299–335.
- Cunha CD, Rosado AS, Sebastián GV, Seldin L, von der Weid. I.** (2006). Oil biodegradation by *Bacillus* strains isolated from the rock of an oil reservoir located in a deepwater production basin in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, 949-959.
- Dahle H, Garshol F, Madsen M, Birkeland N.** (2008) Microbial community structure analysis of produced water from a high-temperature North Sea oil-field. *Antonie van Leeuwenhoek* 93:37–49.
- Davis DH, Doudoroff M, Stanier RY, Mandel M** (1969) Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: taxonomic implications. *Int J Syst Bacteriol* 19:375–390.

- Diekert G, Wohlfarth G.** (1994) Metabolism of homocetogens *Antonie Van Leeuwenhoek*. 66(1-3):209-21.
- Dojka MA, Hugenholtz P, Haack SK and Pace NR.** (1998) Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3869-3877.
- Dong M, Chen S, Kita K, Ichimura Y, Guo W, Lu S, Sugaya S, Hiwasa T, Takiguchi M, Mori N, Kashima A, Morimura K, Hirota M and Suzuki N.** (2009) Anti-proliferative and apoptosis-inducible activity of Sarcodonin G from *Sarcodon scabrosus* in HeLa cells *International Journal of Oncology* 34: 201-207.
- Enquist JA, Stoltz BM.** (2008) Synthetic efforts toward cyathane diterpenoid natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 26, 661-680.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P.** (1989) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8:175-85.
- Fujita-Ichikawa Y, Tochikubo K.** (1993) Quantitative analysis of polymyxin B released from polymyxin B-treated dormant spores of *Bacillus subtilis* and relationship between its permeability and inhibitory effect on outgrowth. *Microbiol Immunol.*;37(12):935-41.
- Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL & Field KG.** (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345:60-63.
- Grabowski A, Blanchet D, Jeanthon C.** (2005) Characterization of long-chain fatty-acid-degrading syntrophic associations from a biodegraded oil reservoir. *Res Microbiol.* Aug;156(7): 814-21.
- Green BD, Keller M.** (2006) Capturing the uncultivated majority. *Curr. Op. Biotechnol.* 17:36-240.
- Greene AC, Patel BK, Sheehy AJ.** (1997) *Deferribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic manganese- and iron-reducing bacterium isolated from a petroleum reservoir. *Int J Syst Bacteriol.* Apr;47(2):505-9.
- Gremion F, Chatzinotas A, Harms H.** (2003) Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicates that *Actinobacteria* might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil. *Environ Microbiol.* 5: 896-907.
- Großkopf R, Stubner S, Liesack W.** (1998) Novel Euryarchaeita lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms *Appl Environ Microbiol.* Dec;64(12):4983-9.
- Hamamura N, Yeager CM, Arp DJ.** (2001) Two distinct monooxygenases for alkane oxidation in *Nocardioides* sp. strain CF8. *Appl Environ Microbiol.* Nov;67(11):4992-8.
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM.** (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5:R245-249.
- Head IM, Jones DM, Larter SR.** (2003). Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature.* 426:344-52.
- Hess A, Zarda B, Hahn D, Haner A, Stax D, Hohener P, and Zeyer J.** (1997) In situ analysis of denitrifying toluene and xylene-degrading bacteria in a diesel fuel-contaminated laboratory aquifer column. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2136-2141.

- Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EMH.** (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoresis separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3233-3241.
- Hirano S, Kitauchi F, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M, Kanaya S.** (2004) Isolation and characterization of *Xanthobacter polyaromaticivorans* sp. nov. 127W that degrades polycyclic and heterocyclic aromatic compounds under extremely low oxygen conditions. *Biosci Biotechnol Biochem.* Mar;68(3):557-64.
- Hori T, Noll M, Igarashi Y, Friedrich MW and Conrad R.** (2007) Identification of Acetate-Assimilating Microorganisms under Methanogenic Conditions in Anoxic Rice Field Soil by Comparative Stable Isotope Probing of RNA. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73, No.1 101–109.
- Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH & Bohannon BJM.** (2001). Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4399-4406.
- Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger KL, Pace NR.** (1998a) Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol.* 180:366-76.
- Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR.** (1998b). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180: 4765-4774.
- Hyronimus B, Le Marrec C and Urdaci MC.** (1998) Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* 14. *Journal of Applied Microbiology* 85, 42–50.
- Iino T, Nakagawa T, Mori K, Harayama S, Suzuki K.** (2008) *Calditerrivibrio nitroreducens* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, nitrate-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58:1675-9.
- Jack RF, Ringelberg DB, White DC** (1992) Differential corrosion rates of carbon steel by combinations of *Bacillus* sp., *Hafnia alvei* and *Desulfovibrio gigas* established by phospholipid analysis of electrode biofilm. *Corrosion Sci* 33: 1843±1853.
- Jayaraman, A., Earthman, J.C., Wood, T.K.** (1997) Corrosion inhibition by aerobic biofilms on SAE 1018 steel. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47, 62–68.
- Jayaraman A, Hallock PJ, Carson RM, Lee CC, Mansfeld FB, Wood TK.** (1999) Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms on steel with antimicrobial peptides generated in situ. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52, 267–275.
- Jones DM, Head IM, Gray ND, Adams JJ, Rowan AK, Aitken CM, Bennett B, Huang H, Brown A, Bowler B FJ, Oldenburg T, Erdmann M & Larter SR.** (2008) Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs *Nature* Vol 451.
- Kamo T, Imura Y, Hagio T, Makabe H, Shibata H and Hirota M.** (2004) Anti-inflammatory cyathane diterpenoids from *Sarcodon scabrosus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 1362-1365,
- Kanally RA, Harayama S.** (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Biotechnology* v 182 n 8 p. 2059-2067.
- Kawagishi H, Shimada A, Shirai R, Okamoto K, Ojima F, Sakamoto H, Ishiguro Y. and Furukawa S.** (1994) Erinacines A, B and C, strong stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Lett.* v. 35, Issue 10, p. 1569-1572.

- Kawagishi H, Shimada A, Hosokawa S, Mori H, Sakamoto H, Ishiguro Y, Sakemi S, Bordner J, Kojima N and Furukawa S.** (1996) Erinacines E, F, and G, stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericum erinaceum*. *Tetrahedron Lett* v. 37, Issue 41, p. 7399-7402.
- Kenmoku H, Shimai T, Toyomasu T, Kato N, Sassa T.** (2002) Erinacine Q, a new Erinacine from *Hericum erinaceum* and its biosynthetic route to Erinacine C in the basidiomycete. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66 (3) 571-575.
- Kimura, M.** (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Biol.* v. 16: 111-120.
- Kita T, Takaya Y, Oshima Y and Ohta T.** (1998) Scabronines B, C, D, E and F, novel diterpenoids showing stimulating activity of nerve growth factor-synthesis, from the mushroom *Sarcodon scabrosus* *Tetrahedron*,v. 54, 11877–11886.
- Kok M, Oldenhuis R, van der Linden MP, Raatjes P, Kingma J, van Lelyveld PH, Witholt B.** (1989) The *Pseudomonas oleovorans* alkane hydroxylase gene: sequence and expression. *J Biol Chem.* 264(10):5435-41.
- Korenblum E, der Weid I, Santos AL, Rosado AS, Sebastián GV, Coutinho CM, Magalhães FC, Paiva MM, Seldin L.** (2005) Production of antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* HO-1 and *B. licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil. *J Appl Microbiol.* 98(3):667-75.
- Korenblum E, Sebastián GV, Paiva MM, Coutinho CM, Magalhães FC, Peyton BM, Seldin L.** (2008) Action of antimicrobial substances produced by different oil reservoir *Bacillus* strains against biofilm formation. *Appl Microbiol Biotechnol* 79: 97–103.
- Kudo Y, Shibata S, Miyaki T, Aono T, and Oyaizu H.** (1997). Peculiar archaea found in Japanese paddy soils. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 61: 917-920.
- Lane DJ.** (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, pp. 115-175.
- Larter S, Wilhelms A, Head IM, Koopmans M, Aplin R, Di Primio R, Zwach C, Erdmann M, Telnaes N** (2003) The controls on the composition of biodegraded oils in the deep subsurface – part 1: biodegradation rates in petroleum reservoirs. *Org Geochem* 34:601–613.
- Leadbetter JR.** (2003) Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:274-81.
- Leuthner B, Heider J.** (1999). Anaerobic toluene catabolism of *Thauera aromatic*: the bbs operon codes for enzymes of beta-oxidation of the intermediate benzylsuccinate. *Journal of Bacteriology*, vol.182 n.2. p.272-277.
- Li H, Yang S, Um B.** (2007a) Phylogenetic Diversity of the Archaeal Community in a Continental High-Temperature Water-Flooded Petroleum Reservoir. *Curr Microbiol* 55:382-388.
- Li H, Yang S, Um B, Rong Z, Zhang J.** (2007b) Molecular phylogenetic diversity of the microbial community associated with a high-temperature petroleum reservoir at an offshore oil field. *FEMS Microbiol Ecol* 60 74-84.
- Lin S, Jin S, Fu L, Quan C. & Yang YS.** (2009) Microbial community variation and functions to excess sludge reduction in a novel gravel contact oxidation reactor. *J Hazard Mater.* 165:1083-1090.

- Liu QK, Wang J, Li GQ, Ma T, Liang FL, Liu RL.** (2008) Characterization of a thermophilic *Geobacillus* strain DM-2 degrading hydrocarbons *Huan Jing Ke Xue*. 29(12):3554-60.
- Ma BJ, Liu JK.** (2005) A new bitter diterpenoid from *Sarcodon scabrosus*. *J Basic Microbiol* 45 328-330.
- Maeng JH, Sakai Y, Tani Y, Kato N.**(1996) Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of n-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *J Bacteriol*. Jul;178(13):3695-700.
- Magot M, Ollivier B, Patel BKC.** (2000). Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek* v.77:103-116.
- Magurran AE.** (2004) Measuring biological diversity. USA: Blackwell Science Ltd. 256p.
- Malik S, Beer M, Megharaj M, Naidu R.** (2008) The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environ Int*. Feb;34(2):265-76.
- Maier T, Förster HH, Asperger O, Hahn U.** (2001) Molecular characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp. EB104. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 24;286(3):652-8.
- Manefield M, Whiteley AS, Griffiths RI and Bailey MJ.** (2002). RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. *Appl. Environ. Microbiol*. 68:5367-5373.
- Marcotullio MC, Pagiotti R, Campagna V, Maltese F, Fardella G, Altinier G, Tubaro A.** (2006) Glaucopine C, a new diterpene from the fruiting bodies of *Sarcodon glaucopus*. *Natural Product Reserch*, Vol 20, n 10, 917-921.
- Massana R, Murray AE, Preston CM, DeLong EF.** (1997) Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic *Archaea* in the Santa Barbara Channel. *Appl. Environ. Microbiol*. 63:50-56
- Mendes LW.** (2009). Análise molecular das estruturas e diversidade de comunidades microbianas em solo de manguezal preservado da Ilha do Cardoso –SP. Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo.
- Meyer S, Moser R, Neef A, Stahl U, and Kampfer P.** (1999) Differential detection of key enzymes of polyaromatic hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes. *Microbiology* 145: 1731-1741.
- Miranda-Tello E, Fardeau ML, Joulain C, Magot M, Thomas P, Tholozan JL, Ollivier B.** (2007) *Petrotoga halophila* sp. nov., a thermophilic, moderately halophilic, fermentative bacterium isolated from an offshore oil well in Congo *Int J Syst Evol Microbiol*. 57 40-4.
- Miranda-Tello E, Fardeau ML, Thomas P, Ramirez F, Casalot L, Cayol JL, Garcia JL, Ollivier B.** (2004) *Petrotoga mexicana* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic and xylanolytic bacterium isolated from an oil-producing well in the Gulf of Mexico. *Int J Syst Evol Microbiol*. Jan;54 (Pt 1):169-74.
- Mohamed NM, Enticknap JJ, Lohr JE, McIntosh SM & Hill RT.** (2008). Changes in Bacterial Communities of the Marine Sponge *Mycale laxissima* on Transfer into Aquaculture. *Appl. Environ Microbiol*. 74:1209-1222.
- Mulkins-Phillips GJ, Stewart JE.**(1974). Effect of environmental parameters on bacterial degradation of Bunker C oil, crude oils, and hydrocarbons. *Appl. Microbiol*. 28:915-922.
- Nazina TN, Grigor'ian AA, Sue KF, Sokolova DSh, Novikova EV, Turova TP, Poltarau AB, Beliaev SS, Ivanov MV.** (2002) Phylogenetic diversity of aerobic saprotrophic bacteria isolated from the Daqing oil field *Mikrobiologiya*. Jan-Feb;71(1):103-10.

- Nicoletti M, Di Fabio A, D'Andrea A, Salvatore G, Baren CV, Coussio JD.** (1996) Diterpenoid acids from *Mulinum spinosum*. *Phytochemistry* vol 43, n5 1065-1067.
- Okerentungba PO, Ezeronye OU.** (2003). Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria *Af. J. Biothec.* 2(9): 288-292.
- Oliveira VM, Sette LD, Simioni KCS, Santos Neto EV.** (2008) Bacterial diversity characterization in petroleum samples from Brazilian reservoirs *Braz. J. Microbiol.* vol.39 no.3.
- Ornek D, Jayaraman A, Syrett BC, Hsu CH, Mansfeld FB. and Wood TK.** (2002) Pitting corrosion inhibition of aluminum 2024 by *Bacillus* biofilms secreting polyaspartate or c-polyglutamate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 651–657.
- Orphan VJ, Taylor LT., Hafenbradl D, Delong EF.** (2000) Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblage associated with high temperature petroleum reservoirs. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 700-711.
- Orphan, VJ, Howes CH, Hinrichs KU, McKeegan, KD, Delong EF.** (2001) Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science* 293:484-487.
- Peng J, Walsh K, Weedman V, Bergthold JD, Lynch J, Lieu KL, Braude IA, Kelly M. and Hamann MT.** (2002) The new bioactive diterpenes cyanthiwigins E-AA from the Jamaican sponge *Myrmekioderma styx*., *Tetrahedron*, 58, 7809–7819.
- Peng J, Avery MA and Hamann MT.** (2003) Cyanthiwigin AC and AD, Two Novel Diterpene Skeletons from the Jamaican Sponge *Myrmekioderma styx* *Org. Lett.*, 5, 4575–4578;
- Peng J, Kasanah N, Stanley CE, Chadwick J, Fronczek FR and Hamann MT.** (2006) Microbial Metabolism Studies of Cyanthiwigin B and Synergetic Antibiotic Effects. *J Nat Prod.* 69:727–730.
- Peters V and Conrad R.** (1996). Sequential reduction processes and initiation of CH₄ production upon flooding of oxic upland soils. *Soil Biol. Biochem.* 28:371–382
- Petinari L, Kohn LK, de Carvalho JE, Genari SC.** (2004) Cytotoxicity of tamoxifen in normal and tumoral cell lines and its ability to induce cellular transformation in vitro. *Cell Biol Int.* 28(7):531-9.
- Pham VD, Hnatow LL, Zhang S, Fallon RD, Jackson SC, Tomb JF, DeLong EF, Keeler SJ** (2009) Characterizing microbial diversity in production water from an Alaskan mesothermic petroleum reservoir with two independent molecular methods. *Environ Microbiol.* Jan;11(1):176-87.
- Pitcher DG, Saunders NA and Owen RJ.** (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology* 8, 151-156.
- Radwan SS, Sorkhoh NA, Fardoun F, Al-Hasan RH** (1995) Soil management enhancing hydrocarbon biodegradation in the polluted Kuwaiti desert. *Appl Microbiol Biotechnol* 44(1–2):265–270.
- Radwan SS, Barabas G, Sorkhoh NA, Damjanovich S, Szabo I, Szollosi J, Matko J, Penyige A, Hirano T, Szabo IM** (1998) Hydrocarbon uptake by *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* 169(1):87–94.
- Ramana, CV, Sasikala C, Arunasri K, Anil Kumar P, Srinivas TN, Shivaji S, Gupta P, Suling J, and Imhoff JF.** (2006) *Rubrivivax benzoatilyticus* sp. nov., an aromatic, hydrocarbon degrading purple betaproteobacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2157-216

- Rappe MS & Giovannoni SJ.** (2003) The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:369-394.
- Ravot G, Magot M, Ollivier B, Patel BK, Ageron E, Grimont PA, Thomas P, Garcia JL** (1997) *Haloanaerobium congolense* sp. nov., an anaerobic, moderately halophilic, thiosulfate- and sulfur-reducing bacterium from an African oil field. *FEMS Microbiol Lett* 147(1):81–88
- Röling WFM, Head IM, Larter SR.** (2003) The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. *Res. Microbiol.* 154(5):321-328.
- Röling WFM, Brito IRC, Swanneli RPJ, Head IM.** (2004) Response of Archaeal Communities in Beach Sediments to Spilled Oil and Bioremediation. *Applied And Environmental Microbiology*, p. 2614–2620.
- Rosado AS & Seldin L.** (1993) Production of a potentially novel anti-microbial substance by *Bacillus polymyxa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9, 521–528.
- Rouvière PE, Chen MW.** (2003) Isolation of *Brachymonas petroleovorans* CHX, a novel cyclohexane-degrading beta-proteobacterium *FEMS Microbiol Lett.*10;227(1):101-6.
- Saadoun I** (2002) Isolation and characterization of bacteria from crude petroleum oil contaminated soil and their potential to degrade diesel fuel. *J Basic Microbiol* 42:420–428.
- Salinas M B, Fardeau M, Cayol J, Casalot L, Patel B K C, Thomas P, Garcia J. and 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.
- Saitou N, Nei M.** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Schink B.** (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:262–280.
- Schloss PD, Handelsman J.** (2005) Introducing DOTUR, a Computer Program for Defining Operational Taxonomic Units and Estimating Species Richness. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1501-1506.
- Sennett SH, Pomponi SA and Wright AEJ.** (1992) Diterpene Metabolites from Two Chemotypes of the Marine Sponge *Myrmekioderma styx* *Nat. Prod.*, 55, 1421–1429.
- Sette LD, Simioni K C M, Vasconcelos SP, Dussán LJ, Marsaioli AJ, Santos Neto EV, Oliveira VM.** (2007) Analysis of composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91: 253-266.
- Shibata H, Tokunaga T, Karaswa D, Hirota A, Nakayama M, Nozaki H and Tada T** (1989): Isolation and characterization of new bitter diterpenoids from the fungus *Sarcodon scabrosus*. *Agric Biol Chem* 53: 3373-3375.
- Shiono Y, Hiramatsu F, Murayama T, Koseki T, Funakoshi T.** (2008) Two cyathane-type diterpenoids from the liquid culture of *Strobilurus tenacellus*. *Chemistry e Biodiversity* vol. 5.
- Shoemaker RH.** (2006) The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer.* 6:813-823.
- Singleton DR, Furlong MA, Rathbun SL, Whitman WB.** (2001) Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 67: 4374-4376.

- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR.** (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 82, n. 13, 1107-1112.
- Slobodkin AI, Jeanthon C, L'Haridon S, Nazina T, Miroshnichenko M, Bonch-Osmolovskaya E.** (1999) Dissimilatory reduction of Fe(III) by thermophilic bacteria and archaea in deep subsurface petroleum reservoirs of western siberia *Curr Microbiol.* Aug;39(2):99-102.
- Slusarenko AJ, Longland AC and Whitehead IM.** (1989) A convenient, sensitive and rapid assay for antibacterial activity of phytoalexins. *Botanica Helv.* 99: 203-207.
- Smith D, Alvey S and Crowley DE.** (2005) Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53: 265-273.
- Sood N, Lal B.** (2008) Isolation and characterization of a potential paraffin-wax degrading thermophilic bacterial strain *Geobacillus kaustophilus* TERI NSM for application in oil wells with paraffin deposition problems *Chemosphere.* 70(8):1445-51.
- Stahl DA, and Amann R.** (1991) Development and application of nucleic acid probes, In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, United Kingdom. p. 205–248.
- Stams AJ.** (1994) Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Anton. Leeuw.* 66, 271– 294.
- Stams AJM.** (2006). Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. *Environ. Microbiol.* 8, 371–382.
- Stapleton RD, Bright NG, Sayler GS** (2000) Catabolic and genetic diversity of degradative bacteria from fuel-hydrocarbon contaminated aquifers. *Microb Ecol* 39(3):211–221.
- Stephen JR, McCaig AE, Smith Z, Prosser JI, Embley TM** (1996) Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 62:4147–4154.
- Stevens T.**(2006) Lithoautotrophy in the subsurface *FEMS Microbiology Reviews* Volume 20 Issue 3-4, Pages 327–337
- Tagg JR, Dajani AS and Wannanaker LW.** (1976) Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiology Reviews* 59, 171–200.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* Aug;24(8):1596-9.
- Tanaka Y, Sogabe M, Okumura K, Kurane R.A** (2002) Highly selective direct method of detecting sulphate-reducing bacteria in crude oil. *Lett Appl Microbiol.*;35(3):242-6.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG.** (1997) The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 4876-4882.
- Urzúa A, Rezende MC, Mascayano C, Vásquez L.** (2008) A structure-activity study of antibacterial diterpenoids. *Molecules*, 13, 882-891.

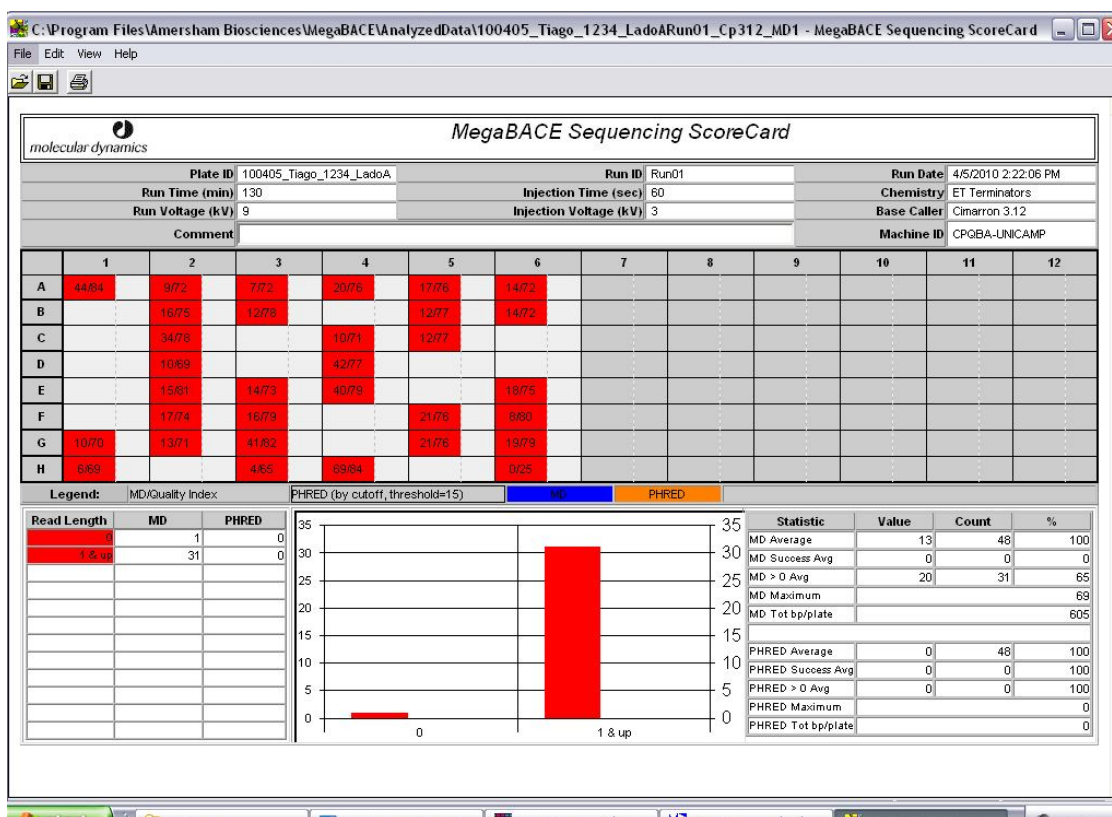
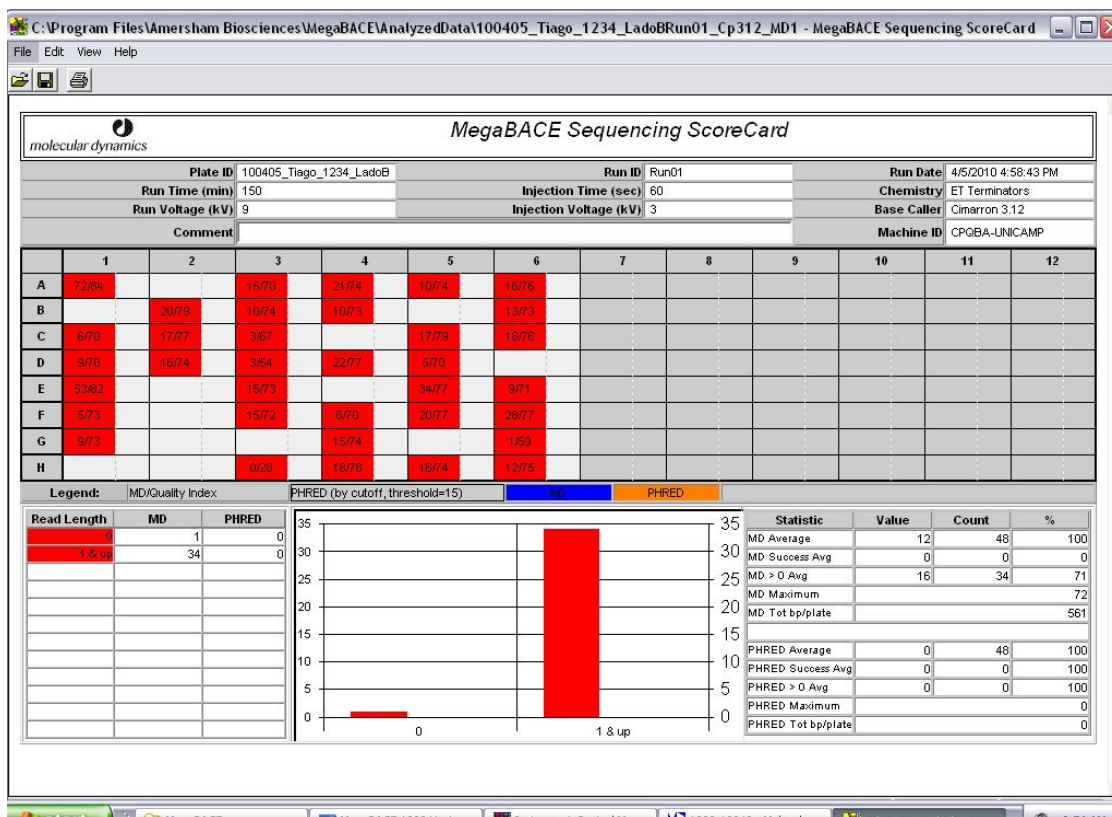
- van Beilen JB, Wubbolts MG, Witholt B.** (1994). Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation* 5: 161-174.
- van Hamme JD, Singh A, Ward OP.** (2003) Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, p.503–549.
- van t'Hof W, Veerman ECI, Helmerhous EJ and Amerongen AVN.** (2001) Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biological Chemistry* 382, 597–619.
- Vasconcellos, SP.** (2006). Atividades Enzimáticas e de Biodegradação de Microrganismos do Petróleo da Bacia de Campos (Pampo Sul). Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas.
- Vasconcellos SP, Angolini CFF, García INS, Dellagnezze BM, Silva CC, Marsaioli AJ, Santos Neto EV, Oliveira VM.** (2010) Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs *Organic Geochemistry* 41 (2010) 675–681.
- Vasconcellos SP, Crespim E, Cruz GF, Simioni KCM, Santos Neto EV, Marsaioli AJ, Oliveira VM.** (2009). Isolation, biodegradation ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. *Organic Geochemistry* 40: 574-588.
- Vieth A, Wilkes H.** (2005) Deciphering biodegradation effects on light hydrocarbons in crude oils using their stable carbon isotopic composition: A case study from the Gullfaks oil field, offshore Norway. *Geochimica* 70, 651-665.
- Voordouw G, Armstrong SM, Reimer MF, Fouts B, Telang AJ, Shen Y, Gevertz D.** (1996) Characterization of 16S rRNA genes from oil field microbial communities indicates the presence of a variety of Sulfate-Reducing, Fermentative, and Sulfide-Oxidizing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1623-1629
- Von der Weid, I., Korenblum, E., Jurelevicius, D., Rosado, A.S., Dino, R., Sebastián, G.V., Seldin, L.** (2008). Molecular diversity of bacterial communities from seafloor rock samples in a deep-water production basin in Brazil. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, 5-14.
- Wachter GA, Matooq G, Hoffmann JJ, Maiese WM, Singh MP, Montenegro G, Timmermann BN.** (1999). Antibacterial diterpenoid acids from *Azorella compacta*. *J Nat. Prod.*, 62, 1319-1321.
- Waller AS, Cox EE, Edwards EA.** (2004) Perchlorate-reducing microorganisms isolated from contaminated sites. *Environ Microbiol.* May;6(5):517-27.
- Ward DE.** (1987) Synthetic Studies on Cyathins. Synthesis of the Ring System. *Can. J. Chem*, 65, 2380–2384;
- Watanabe K, Watanabe K, Kodama Y, Syutsubo K, Harayama S.** (2000) Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities. *Appl Environ Microbiol* 66:4803–4809
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA and Lane DJ.** (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.
- Widdel F and Rabus R.** (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons *Current Opinion in Biotechnology*, 12:259–276.
- Woese CR.** (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221–71.

- Wrighton KC.** (2005) The search for bacteria involved in anaerobic petroleum degradation Master thesis. California Polytechnic State University.
- Yamane K, Maki H, Nakayama T, Nakajima T, Nomura N, Uchiyama H, Kitaoka M.** (2008). Diversity and similarity of microbial communities in petroleum crude oils produced in Asia. *Bios. Biotechnol Biochem.*, 72(11) 2831-2839.
- Yoshida N, Yagi K, Sato D, Watanabe N, Kuroishi T, Nishimoto K, Yanagida A, Katsuragi T, Kanagawa T, Kurane R, Tani Y** (2005) Bacterial communities in petroleum oil in stockpiles. *J Biosci Bioeng* 99:143–149.
- Zellner G, Boone DR, Keswani J, Whitman WB, Woese CR, Hagelstein A, Tindal BJ and Stackebrandt E.** (1999). Reclassification of *Methanogenium tationis* and *Methanogenium liminatans* as *Methanofollis tationis* gen. nov., comb. Nov. and *Methanofollis liminatans* comb. nov. and description of a new strain of *Methanofollis liminatans* *International Journal of Systematic Bacteriology* , 49, 247-255.
- Zengler, K., Richnow, H.H., Rossello-Mora, R., Michaelis, W. and Widdel, F.** (1999) Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature* 401, 266–269.
- Zhang H, Kallimanis A, Koukkou AI, Drainas C.** (2004) Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils *Appl Microbiol Biotechnol* 65: 124–131.
- Zinder, S. H., and M. Koch.** (1984). Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Arch.Microbiol.* 138:263–272.
- Zrafi-Nouira I, Guermazi S, Chouari R, Safi NM, Pelletier E, Bakhrouf A, Saidane-Mosbahi D, Sghir A.** (2009) Molecular diversity analysis and bacterial population dynamics of an adapted seawater microbiota during the degradation of Tunisian zarzatine oil. *Biodegradation.* Jul;20(4):467-86.

Anexo 1. Resultados da busca Blastn dos clones de arqueias encontrados no poço GMR 75.

Clone	Acesso	Linhagem afiliada mais próxima	Max score	Query coverage	E value	Max ident
ga01	NR_028254.1	Methanofollis liminatans GKZPZ 16S ribosomal RNA,	1262	97%	0.0	98%
ga04	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	1051	100%	0.0	100%
ga05	NR_028254.1	Methanofollis liminatans GKZPZ 16S ribosomal RNA, parti	1267	99%	0.0	99%
	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	1258	97%	0.0	99%
ga06	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	1206	100%	0.0	99%
	NR_028254.1	Methanofollis liminatans GKZPZ 16S ribosomal RNA, parti	1184	100%	0.0	99%
ga10	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	1262	98%	0.0	99%
	NR_028254.1	Methanofollis liminatans GKZPZ 16S ribosomal RNA, parti	1253	100%	0.0	99%
ga11	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	1177	100%	0.0	100%
	NR_028254.1	Methanofollis liminatans GKZPZ 16S ribosomal RNA, parti	1155	100%	0.0	99%
ga12	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	1140	100%	0.0	99%
ga13	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	1219	99%	0.0	99%
ga15	NR_028254.1	Methanofollis liminatans GKZPZ 16S ribosomal RNA, parti	1256	100%	0.0	99%
ga16	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	1168	100%	0.0	98%
ga21	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	1151	100%	0.0	98%
ga22	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	1219	100%	0.0	99%
ga25	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	1256	99%	0.0	99%
ga30	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	985	100%	0.0	99%
ga31	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	942	99%	0.0	99%
ga32	NR_028254.1	Methanofollis liminatans GKZPZ 16S ribosomal RNA, parti	1254	100%	0.0	98%
ga36	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	885	100%	0.0	100%
ga39	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	896	100%	0.0	99%
ga40	NR_028254.1	Methanofollis liminatans GKZPZ 16S ribosomal RNA, parti	1258	99%	0.0	98%
ga41	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	941	100%	0.0	99%
ga46	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	1203	100%	0.0	99%
ga49	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	935	100%	0.0	99%
ga61	NR_028254.1	Methanofollis liminatans GKZPZ 16S ribosomal RNA, parti	1247	100%	0.0	99%
ga73	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	1064	100%	0.0	98%
ga76	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	944	100%	0.0	99%
ga83	NR_028254.1	Methanofollis liminatans GKZPZ 16S ribosomal RNA, parti	1223	99%	0.0	98%
ga84	NR_028254.1	Methanofollis liminatans GKZPZ 16S ribosomal RNA, parti	1271	98%	0.0	99%
ga85	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	889	100%	0.0	99%
ga88	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	976	97%	0.0	99%
ga89	NR_028254.1	Methanofollis liminatans GKZPZ 16S ribosomal RNA, parti	1264	99%	0.0	98%
	AF095272.1	Methanofollis tationis 16S small subunit ribosomal RNA ge	1201	99%	0.0	96%
ga92	NR_028254.1	Methanofollis liminatans GKZPZ 16S ribosomal RNA, parti	1249	97%	0.0	98%
ga94	NR_028254.1	Methanofollis liminatans GKZPZ 16S ribosomal RNA, parti	1179	94%	0.0	97%
ga95	NR_028254.1	Methanofollis liminatans GKZPZ 16S ribosomal RNA, parti	1238	97%	0.0	98%
ga96	GU129125.1	Methanomicrobiaceae archaeon 34aM 16S ribosomal RN	1072	98%	0.0	99%

Anexo 2. Score cards exemplificando os resultados obtidos a partir do sequenciamento dos clones de arqueias do poço PTS1, utilizando os primers M13r e M13f ou primers específicos para o Dominio Archaea, 46f e 915r, e sequenciador automatizado MEGA Bace.

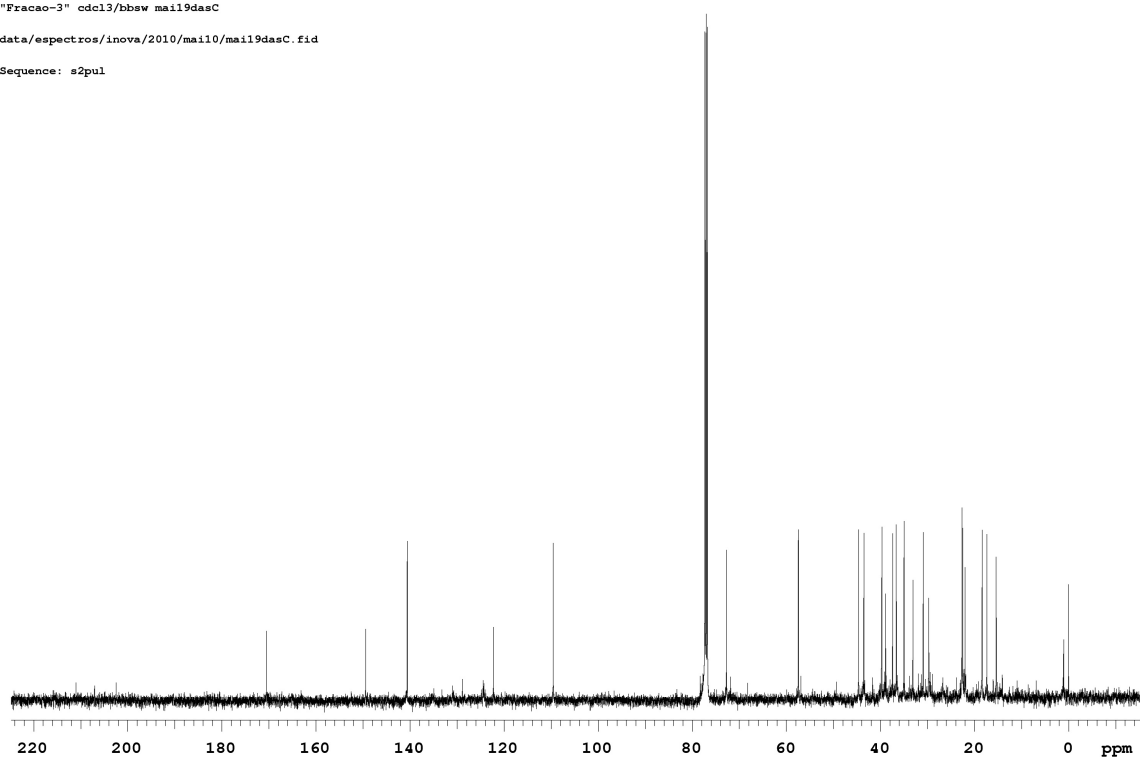


Anexo 3: Espectro observado por RMN¹³C (125,6MHz) do componente majoritário da fração 3

Diana "Fracao-3" cdcl3/bbsw mai19dasC

File: data/espectros/inova/2010/mai10/mai19dasC.fid

Pulse Sequence: s2pul

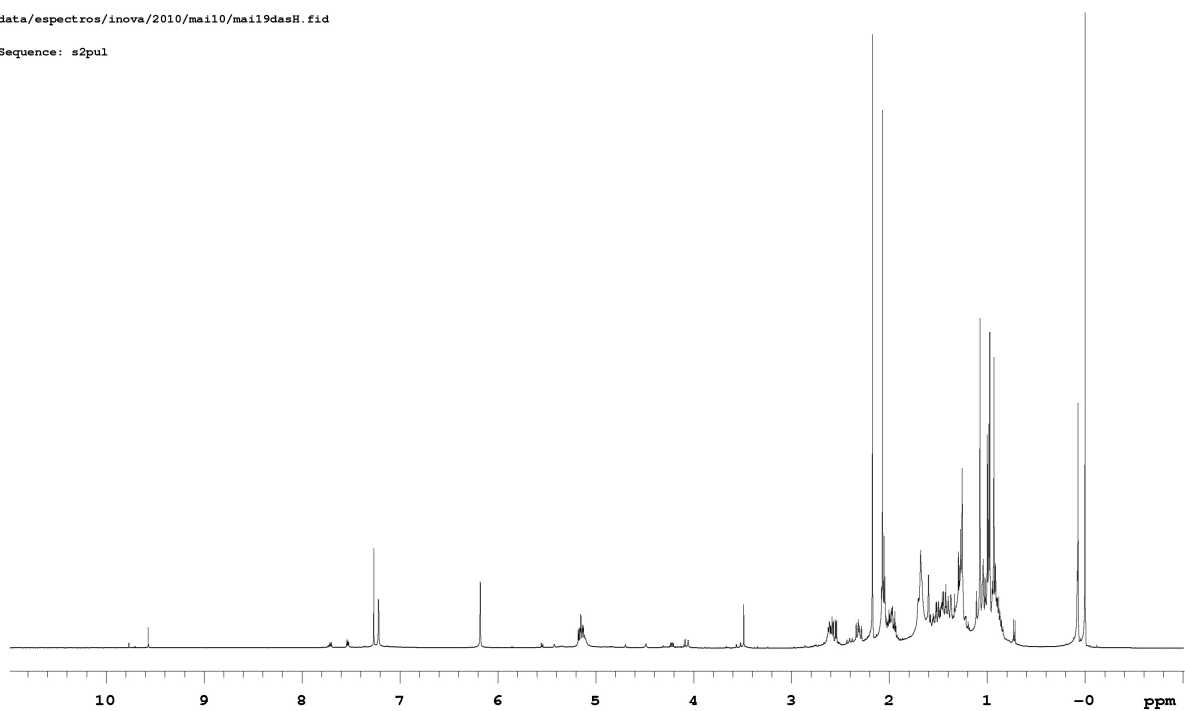


Anexo 4: Espectro de RMN¹H(499,88 MHz) em CDCl₃ para o composto majoritário da fração 3

Diana "Fracao-3" cdcl3/bbsw mai19dasH

File: data/espectros/inova/2010/mai10/mai19dasH.fid

Pulse Sequence: s2pul

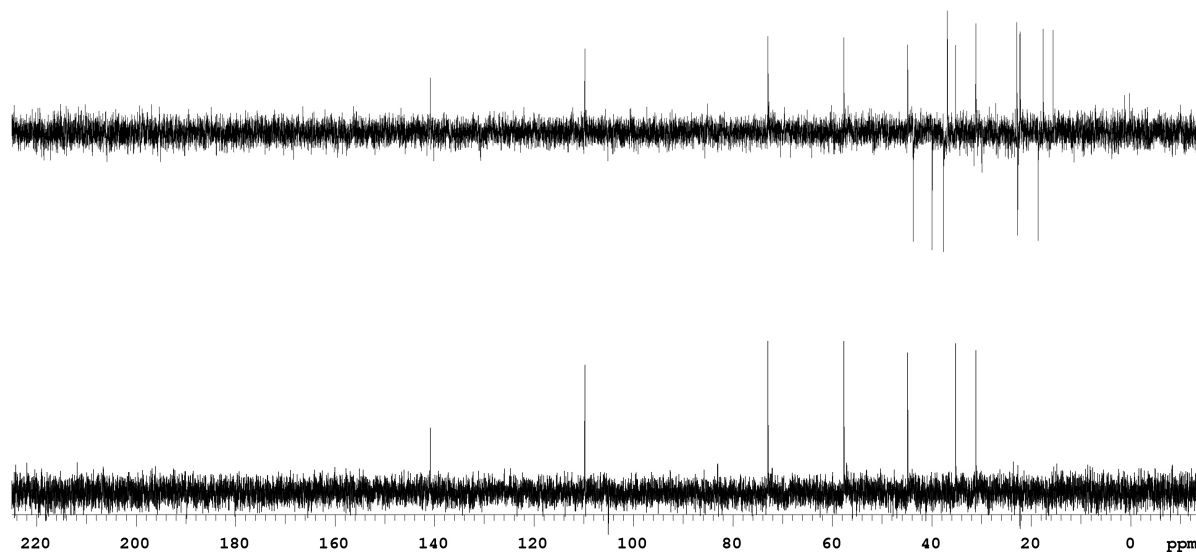


Anexo 5: Espectro de RMN¹³C (125,69 MHz) em CDCl₃ obtido na sequência de pulso DEPT para o composto majoritário da fração 3

Diana "Fracao-3" cdcl3/bbsw mai19dasD

File: data/espectros/inova/2010/mai10/mai19dasD.fid

Pulse Sequence: dept

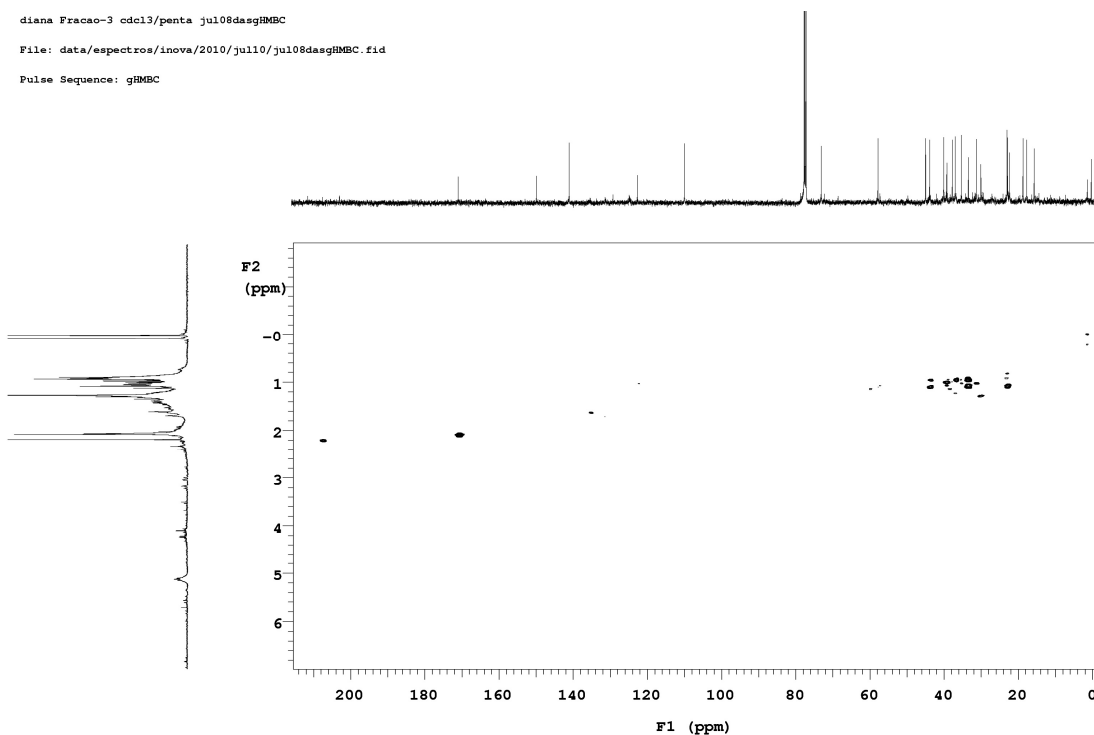


Anexo 6: Espectro de RMN¹H (499,88 MHz) x ¹³C (125,69 MHz) em CDCl₃ obtido na sequência de pulso HMBC para o composto majoritário da fração 3..

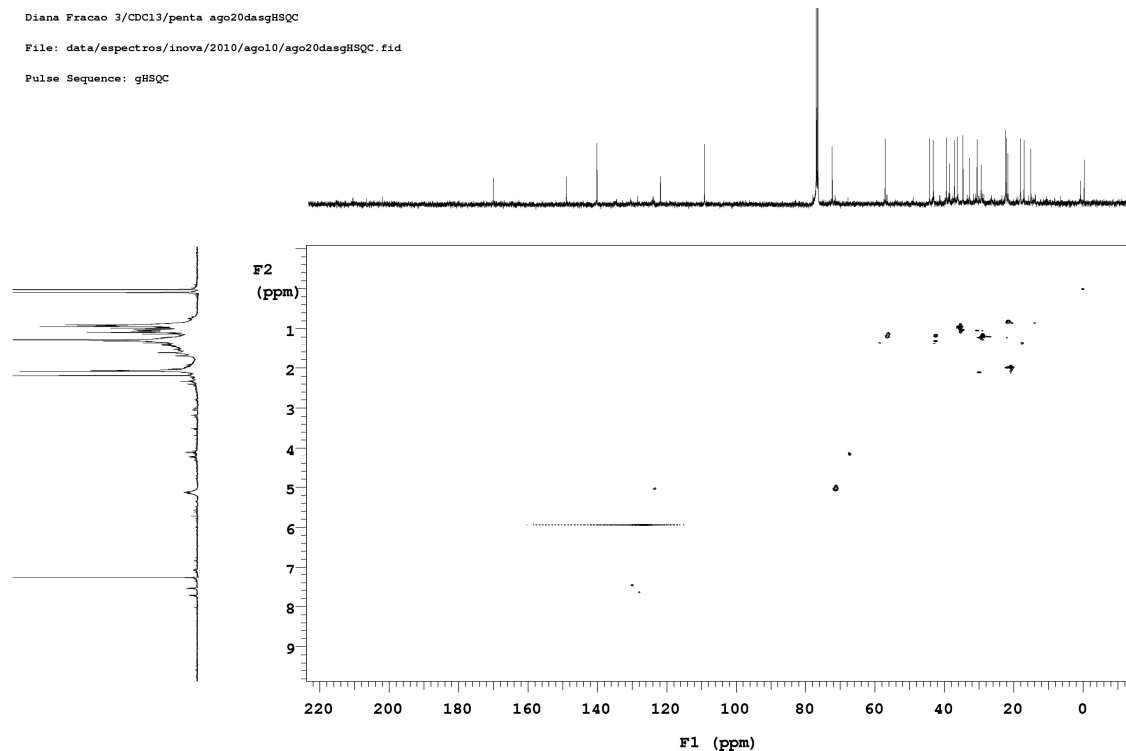
diana Fracao-3 cdcl3/penta jul08dasgHMBC

File: data/espectros/inova/2010/jul10/jul08dasgHMBC.fid

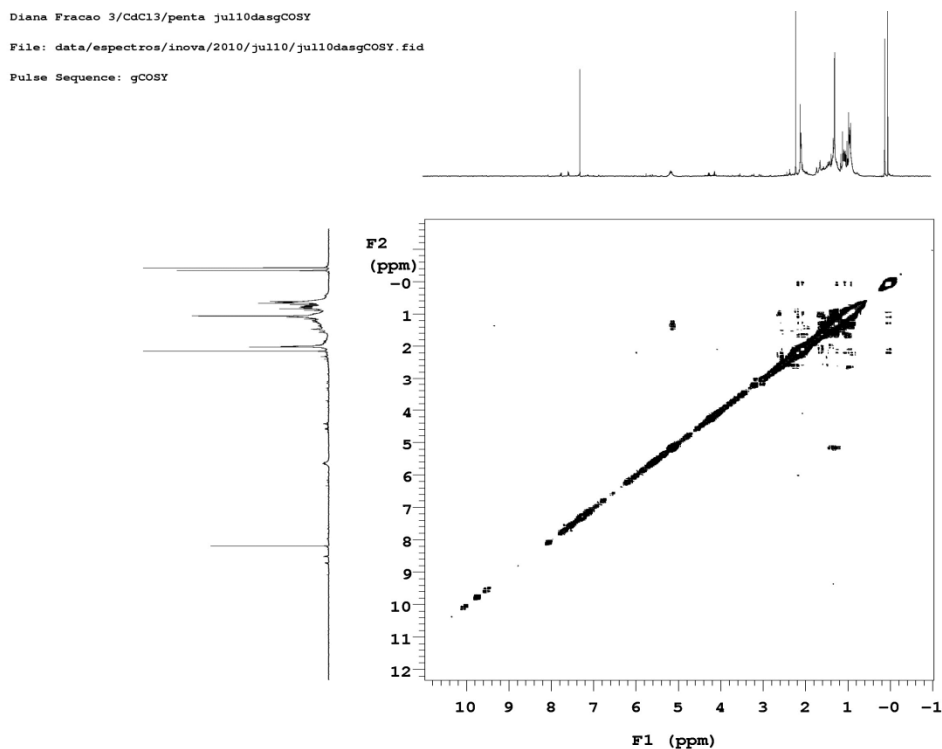
Pulse Sequence: gHMBC



Anexo 7: Espectro de RMN ^1H (499,88 MHz) x ^{13}C (125,69 MHz) em CDCl_3 obtido na sequência de pulso HSQC para o composto majoritário da fração 3..



Anexo 8: Espectro de RMN ^1H x ^1H (499,88 MHz) em CDCl_3 obtido na sequência de pulso para o composto majoritário da fração 3.

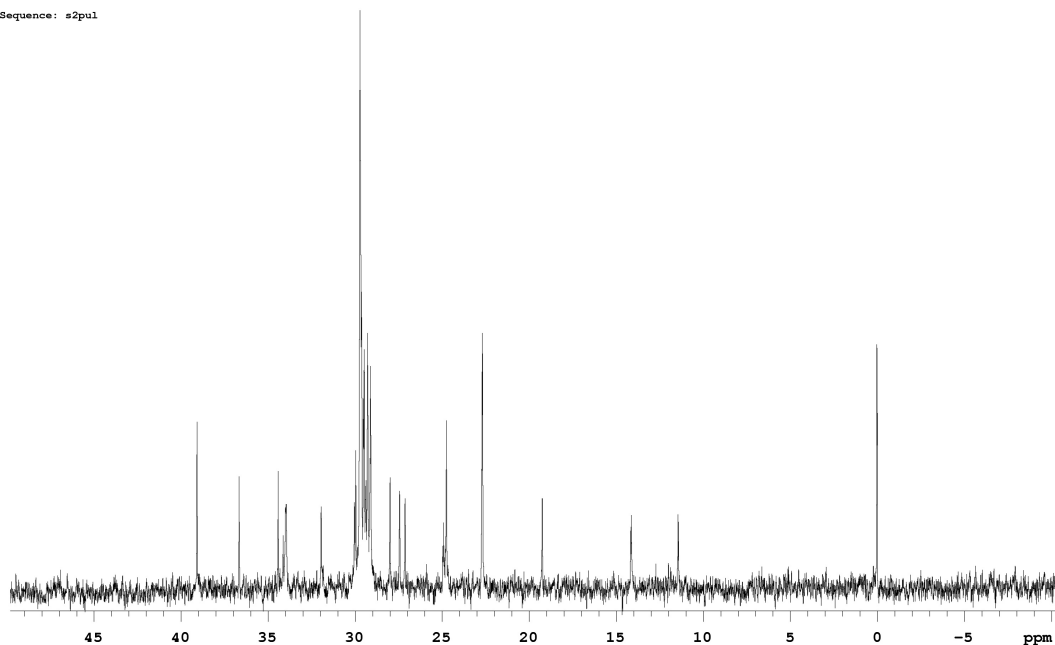


Anexo 9: Espectro observado por RMN¹³C (125,6MHz) do componente majoritário da fração 5.

Diana "fracao-X" cdcl3/bbsw mai20dasC

File: data/espectros/inova/2010/mai10/mai20dasC.fid

Pulse Sequence: s2pul

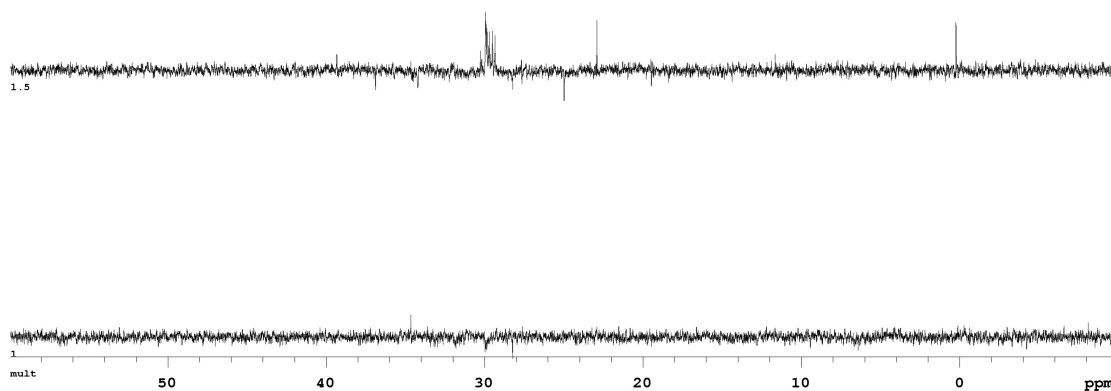


Anexo 10: Espectro de RMN¹³C (125,69 MHz) em CDCl₃ obtido na sequência de pulso DEPT para o composto majoritário da fração 5

Diana "fracao-X" cdcl3/bbsw mai20dasD

File: data/espectros/inova/2010/mai10/mai20dasD.fid

Pulse Sequence: dept



Anexo 11. Declaração da Comissão Interna de Biossegurança



CPQBA

Comissão Interna de Biossegurança - CIBio

Formulário de Proposta de Projeto



CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

A ser preenchido pela CIBio		Formulário CIBio-FPP- Rev. 00	
Analizado em: <u>8 / 5 / 08</u>		Número do Projeto: <u>15/08</u>	
Por: <u>MARIA DA GRACA S. ANDRIOTA</u>		Data de entrada: <u>14 / 04 / 08</u>	
Assinatura: <u>[assinatura]</u>		Situação: ☒ Aprovado ☐ Reprovado	

Projeto de Pesquisa

Título: Caracterização polifásica da microbiota presente em amostras de petróleo de reservatórios brasileiros	
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 Cazelato, 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> JM109	Parental: bactérias e arqueas de amostras de reservatórios de petróleo
---	--

Material Genético Incluído no OGM:

- Diversos fragmentos de genes ribossomais 16S de bactérias e arqueias amplificados diretamente de DNA isolado de amostras de água de formação e petróleo, clonados em *E. coli* e organizados em bibliotecas genômicas em microplacas de 96 orifícios.

Vetor: plasmídeo pGEM-T (gene de resistência à ampicilina e degradação da lactose)
--

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 do presente estudo é investigar a microbiota existente em amostras de petróleo provenientes de reservatórios brasileiros através da construção de bibliotecas do gene RNAr 16S, seguida de sequenciamento e análise filogenética. Será analisada também a produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, os quais possam atuar como inibidores de crescimento de determinados grupos de bactérias nos reservatórios, o que poderá contribuir para o melhor conhecimento dos processos ecológicos que regulam a biodegradação do óleo nos reservatórios e representar uma aplicação biotecnológica potencial no futuro.

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.

Equipe (Nome e função)

- Dra. Valéria Maia Merzel, pesquisadora responsável pelo desenvolvimento do projeto
- Tiago Rodrigues e Silva, aluno de mestrado responsável pela execução dos ensaios.
- Dr. Eugênio Vaz dos Santos Neto, responsável pelo projeto na Petrobras.

Equipamentos utilizados durante o trabalho com contenção do OGMs

- Sequenciador automático Mega Bace, sequenciador ALF Express (Amersham Biotech)
- Microcentrifuga de placas Eppendorf
- Microcentrifuga para tubos de 1,5 mL Eppendorf
- Freezer -80C, freezer -20C
- Geladeiras
- Autoclave (Divisão de Microbiologia)
- Shaker de bancada
- Fluxos laminares
- Incubadora BOD 37C



CPQBA

Comissão Interna de Biossegurança - CIBio

Formulário de Proposta de Projeto



- Micropipetadores automáticos (diferentes volumes)
- Termociclador automático (PCR)
- Sistemas de eletroforese de DNA
- Transiluminador UV

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

- Antes da manipulação de OGMs, o fluxo laminar é descontaminado com álcool 70% e a luz UV permanece ligada por 15 min. Após o uso a descontaminação é feita com álcool 70% e luz UV por 15 min.
- Todos os materiais (meios, placas, tubos, ponteiros) 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: Caracterização de processos biogeoquímicos em acumulações de petróleo

*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:

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada
**"CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DA MICROBIOTA PRESENTE EM AMOSTRAS DE
PETRÓLEO DE RESERVATÓRIOS BRASILEIROS"**

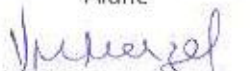
() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(X) tem autorização da seguinte Comissão de Bioética ou Biossegurança*: Comissão Interna de biossegurança (CIBio/CPQBA- UNICAMP), sob Protocolo nº 15/08.

** Caso a Comissão seja externa à UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



Tiago Rodrigues e Silva
Aluno


Valéria Maia Merzel
Orientadora

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

☒ Deferido () Indeferido

Nome:
Função:



Profa. Dra. HELENA COUTINHO F. DE OLIVEIRA
Presidente
Comissão Interna de Biossegurança
CIBio/IB - UNICAMP