

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ELAINE CRESPIM

**“DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS
DEGRADADORAS DE HIDROCARBONETOS EM
AMOSTRAS DE PETRÓLEO UTILIZANDO *PRIMERS*
GRUPO-ESPECÍFICOS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

Elaine Crespim

Valéria Maia de Oliveira

e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Prof^a Dra. Valéria Maia de Oliveira

Campinas, 2008

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

C864d

Crespim, Elaine

Detecção e quantificação de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos em amostras de petróleo utilizando *primers* grupo-específicos / Elaine Crespim. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadora: Valéria Maia de Oliveira.

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

1. Reação em cadeia de polimerase. 2. Petróleo – Biodegradação. 3. Bacillus (Bactéria). I. Oliveira, Valéria Maia de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Detection and quantification of hydrocarbon-degrading bacteria in petroleum samples using group-specific primer sets.

Palavras-chave em inglês: Polymerase chain reaction; Petroleum - Biodegradation; Bacillus (Bacteria).

Área de concentração: Genética de Microorganismos.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Valéria Maia de Oliveira, Suzete Aparecida Lanza Destéfano, Wellington Luiz de Araújo.

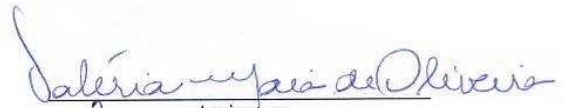
Data da defesa: 29/02/2008.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

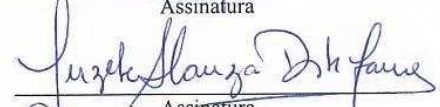
Campinas, 29 de fevereiro de 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Valéria Maia de Oliveira (Orientadora)


Assinatura

Prof^a Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano


Assinatura

Prof. Dr. Wellington Luiz de Araújo


Assinatura

Prof^a Dra. Lara Durães Sette

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Assinatura

Dedico esta dissertação aos meus pais e
irmão, que me acompanham em todos os
momentos importantes

“Quando a gente pensa que sabe todas as respostas,
vem a vida e muda todas as perguntas”

Emily Paul, colaboração de Marcello Holland Neto

Agradecimentos

À Valéria, minha orientadora, pelo companheirismo e troca de idéias nos momentos mais desafiadores deste projeto, pela amizade e torcida pelo meu desenvolvimento profissional e pessoal. Pela conquista de um Prêmio.

A toda a equipe DRM, pela grande ajuda, paciência, idéias, companheirismo, atenção, risadas e eterna amizade. Por não mexerem nos meus PCRs especiais! Por tornarem mais prazerosa essa nossa Vida de Laboratório.

A toda a equipe do CPQBA, pela ajuda e amizade durante esses três anos de convivência. Especialmente, aos colegas das Divisões: Microbiologia; Química Orgânica e Farmacêutica; e Farmacologia e Toxicologia. Por compartilharem equipamentos e momentos de trabalho.

Ao Professor Francisco G. Nóbrega e à Marina Nóbrega, pela grande ajuda, amizade e confiança, possibilitando a realização de uma etapa importante do meu projeto em seu laboratório.

Aos colegas Mota, Simone e Carol (chucrute!), pela amizade e grande ajuda nos experimentos de PCR em tempo real.

Ao Eugênio e à Petrobras, por toda a ajuda com relação às amostras de petróleo e água de formação, viabilizando a coleta, esclarecendo dúvidas técnicas e fazendo revisões de dados publicados.

A Petrobras, Finep e CNPq, pelo suporte financeiro.

Aos grandes amigos de Campinas, especialmente Caroline, Melissa, Karen, Roberta e Alessandra (irmãzinhas), Kátia, Rosi, Dani-Dani, Kívia, Aline Coelho e Aline Maria, por estarem presentes nos momentos importantes e me apoiarem em todas as conquistas e dificuldades. Por contribuírem muito para o meu crescimento pessoal.

Às eternas amigas de São José, especialmente Karina, Adriana, Fernanda, Josi, Carol (chucrute!), Clara, Janine, Paty, Harumi, Sabrina e Alcione, pela amizade e companheirismo, independente da distância.

Ao meu irmão, pela companhia durante estes 3 anos em Campinas e pelas várias vezes em que precisei de ajuda.

Aos meus queridos pais, por me apoiarem sempre e torcerem para o meu sucesso profissional e pessoal. Por se manterem sempre presentes, apesar da distância.

Resumo

A abordagem tradicional empregada em estudos de Microbiologia Ambiental, baseada em métodos de isolamento seletivo e cultivo de microrganismos em laboratório, embora seja útil para a determinação do potencial fisiológico dos organismos isolados, é inadequada para a realização de uma caracterização abrangente da comunidade microbiana destes ambientes ou para detectar microrganismos de difícil cultivo ou que vivem em consórcios. O emprego de técnicas moleculares em estudos de comunidades microbianas, as quais envolvem o isolamento direto de DNA a partir de amostras ambientais, a amplificação de genes conservados pela técnica de PCR e a análise de seqüências de rDNA 16S, tem demonstrado resultados promissores em Ecologia Microbiana, uma vez que permite identificar organismos de ambientes naturais sem a necessidade de cultivo dos mesmos. A detecção de microrganismos com potencial para biodeterioração, biodegradação e biocorrosão encontrados em depósitos petrolíferos é de grande importância na medida em que estes organismos podem estar relacionados com a perda da qualidade do petróleo nos reservatórios e etapas subsequentes de exploração (extração, armazenamento e refino). O presente trabalho teve como objetivos desenvolver um método molecular para a detecção rápida de grupos específicos de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos e avaliar a sua distribuição e abundância em diferentes amostras de óleo e água de formação provenientes de depósitos petrolíferos da bacia de Campos (RJ). Nossos resultados revelaram a presença dos grupos *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Achromobacter xylosoxidans*, *Bacillus pumilus*, *Micrococcus* spp. e *Dietzia* spp. nas amostras de petróleo estudadas. Alguns destes microrganismos apresentaram ampla ocorrência, embora em baixa abundância, nas amostras dos cinco poços avaliados, independentemente do grau de biodegradação dos óleos e condições de profundidade e temperatura dos reservatórios. O desenvolvimento de um método molecular para a rápida detecção de grupos de microrganismos potencialmente biodegradadores em amostras ambientais seria extremamente útil como uma ferramenta de apoio para a avaliação da qualidade do óleo em reservatórios de produção.

Abstract

The traditional approach used in Environmental Microbiology studies, based on selective isolation and cultivation methods, although very useful for determination of the physiological potential of the isolated organisms, is inadequate for a broad characterization of the microbial community in these environments, since it does not allow the recovery of fastidious microorganisms or the ones that live in consortia. The use of molecular techniques in microbial community studies, which involve the direct DNA isolation from environmental samples, amplification of conserved genes by PCR and sequence analysis, has shown promising results in Microbial Ecology, as it allows the identification of organisms from natural environments without the need of cultivation. The detection of microorganisms with potential for biodeterioration, biodegradation and biocorrosion in petroleum deposits is of great importance, as these organisms may be related to a decrease in petroleum quality in the reservoirs and subsequent exploration steps (extraction, storage and refining). The present work aimed at developing a molecular method for the rapid detection of specific groups of hydrocarbon-degrading microorganisms and evaluating their distribution and abundance in different oil and formation water samples originated from petroleum reservoirs in the Campos basin (RJ). Our results revealed the presence of the target groups *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Achromobacter xylosoxidans*, *Bacillus pumilus*, *Micrococcus* spp. and *Dietzia* spp. in the environmental samples under study. Some of these microorganisms were of broad occurrence, although in low abundance, in all the five samples from the petroleum wells analyzed, in spite of the oil biodegradation level and depth and temperature conditions. The development of a molecular method for the rapid detection of specific groups of biodegrading microorganisms in environmental samples would be extremely useful as a supporting tool for the evaluation of oil quality in the production reservoirs.

ÍNDICE

1. Introdução.....	11
2. Revisão bibliográfica	14
2.1. BIODEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO	14
2.2. MICROBIOLOGIA DO PETRÓLEO	15
2.2.1. Microrganismos em ambientes de reservatório de petróleo	15
2.2.2. Microrganismos degradadores de hidrocarbonetos	16
2.3. DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS EM AMBIENTES EXTREMOS.....	18
3. Objetivos Gerais	21
4. Objetivos Específicos	21
 Artigo 1: "Cultivation-independent detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin"	22
Abstract	23
Introduction	23
Material and Methods	24
Results	28
Discussion.....	30
Acknowledgements.....	31
References.....	31
Figures	36
Tables	42
 Artigo 2: "Molecular analysis of <i>Bacillus</i> diversity in a highly biodegraded oil sample from a Brazilian reservoir"	45
INTRODUCTION	46
MATERIALS AND METHODS.....	47
RESULTS AND DISCUSSION	51
ACKNOWLEDGEMENTS.....	53
REFERENCES	54
Figures	56

Capítulo 3: Quantificação de *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Dietzia* spp. e *Streptomyces* spp. em amostras de petróleo por PCR em tempo real (*real-time* PCR)..... 58

1. Introdução	58
2. Material e Métodos:	60
2.1. Amostragem	60
2.2. Extração de DNA.....	60
2.3. <i>Primers</i> e sondas.....	61
2.4. Controles de reação	63
2.5. Condições de reação.....	64
3. Resultados e Discussão	65
4. Referências Bibliográficas	82

Capítulo 4: Desenvolvimento de protocolos para a detecção das bactérias *Brevibacillus* spp., *Rhodococcus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. em amostras de petróleo da Bacia de Campos (RJ) por PCR grupo-específico 84

1. Introdução	84
2. Material e Métodos	85
2.1. Coleta das amostras de petróleo e água de formação.....	85
2.2. Aquisição, cultivo e extração do DNA das linhagens bacterianas	86
2.3. Teste de especificidade dos <i>primers in silico</i> (<i>Probe Match</i>)	88
2.4. Extração de DNA das amostras ambientais	88
2.5. Testes de especificidade dos <i>primers</i> em reações de PCR.....	90
2.6. Detecção de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos nas amostras ambientais através de PCR gênero-específico	92
3. Resultados e Discussão	92
3.1. Definição dos <i>primers</i> grupo-específicos.....	92
3.2. Testes de especificidade dos <i>primers in silico</i>	93
3.3. Extração de DNA das linhagens referência bacterianas	94
3.4. Extração de DNA das amostras ambientais	94
3.5. Testes de especificidade dos <i>primers</i> em reações de PCR.....	96
3.6. Detecção de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos nas amostras ambientais através de PCR gênero-específico	99
4. Conclusões	102
5. Referências bibliográficas.....	102

Conclusões Gerais:	104
Referências Gerais:.....	106
Anexos	109
Anexo 1: Extração de DNA genômico de bactérias em pequena escala.....	110
Anexo 2: Extração do DNA genômico de bactérias através de lise com proteínase K	112
Anexo 3: Extração de DNA genômico de bactérias Gram-positivas	113

1. Introdução

Desde o início da produção comercial de petróleo, cerca de 140 anos atrás, os engenheiros da indústria petrolífera têm enfrentado problemas causados por microrganismos presentes neste ambiente (Magot *et al.*, 2000). Do ponto de vista econômico, os agentes microbianos podem causar: biodeterioração dos óleos; biocorrosão de equipamentos e tubulações; e produção de compostos indesejados (polímeros, gomas, ácidos orgânicos e H_2S), os quais alteram características do petróleo relevantes para os processos de extração e refino (Cord-Ruwich *et al.*, 1987).

Uma grande variedade de bactérias tem sido isolada a partir de amostras de óleo ou detectada nessas amostras (Magot *et al.*, 2000). Microrganismos aeróbicos, anaeróbicos facultativos e microaerofílicos têm sido detectados em amostras de água/óleo, sendo sugeridos como organismos introduzidos nos reservatórios através da penetração de águas superficiais (injeção de água ou características geológicas locais) (Matz *et al.*, 1992).

Dentre os microrganismos anaeróbicos estritos presentes nos reservatórios de óleo reportados na literatura, os principais grupos pertencem ao das arqueias (hipertermofílicas) e bactérias redutoras de sulfato (SRB), dentre as quais as mesofílicas estão envolvidas com os processos de corrosão de equipamentos e as termofílicas, com a produção *in situ* de H_2S . Outras importantes comunidades microbianas destes ambientes são representadas pelas arqueias metanogênicas (principalmente as mesofílicas), bactérias e arqueias fermentativas (as primeiras, mesofílicas e termofílicas; e as últimas, hipertermofílicas) e bactérias redutoras de ferro e manganês (principalmente as mesofílicas) (Magot *et al.*, 2000).

Os estudos tradicionais de Microbiologia Ambiental baseiam-se principalmente em técnicas de isolamento seletivo e cultivo. No entanto, muitos dos microrganismos encontrados em ambientes naturais não são cultiváveis em laboratório, havendo uma disparidade entre o que está presente no ambiente e o que pode ser recuperado por meio de técnicas baseadas em cultivo (Staley, 1998). Estudos realizados por vários autores concluíram que as bactérias cultivadas representam apenas 0,1 a 10% da comunidade bacteriana total do ambiente (Amann *et al.*, 1995; Hugenholtz *et al.*, 1998). O uso de técnicas recentes de Biologia Molecular em estudos de comunidades microbianas, as quais envolvem a extração direta de DNA de amostras ambientais, associada à amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de genes conservados e análise de seqüência, tem revelado uma diversidade microbiana surpreendente, uma vez que os organismos podem ser detectados diretamente a partir do ambiente, sem a necessidade de seu cultivo (Pace, 1996; Hugenholtz *et al.*, 1998).

Em Microbiologia do Petróleo, a aplicação de técnicas moleculares ainda é recente e pouco difundida. Existem poucos estudos envolvendo a abordagem molecular para a caracterização da diversidade microbiana em poços de petróleo. Estes revelaram a presença de comunidades de bactérias e arqueias fisiologicamente distintas, incluindo microrganismos estritamente anaeróbicos termofílicos e hipertermofílicos, bem como anaeróbicos facultativos e termotolerantes (Voordouw *et al.*, 1996; Magot *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2000; Bonch-Osmolovskaya *et al.*, 2003).

Em um estudo recente de caracterização de comunidades de bactérias associadas a reservatórios de petróleo utilizando métodos moleculares independentes de cultivo (Projeto CTPETRO “**Caracterização de Processos Biogeoquímicos em Acumulações de Petróleo**”, Sub-projeto “*Caracterização de comunidades microbianas associadas a depósitos petrolíferos brasileiros*”, desenvolvido pela equipe da Divisão de Recursos Microbianos, CPQBA/UNICAMP), foram encontrados nove diferentes grupos de bactérias em amostras de óleo provenientes de poços não biodegradado e altamente biodegradado. Estes microrganismos mostraram-se relacionados a *Acinetobacter*, *Arcobacter*, *Bacillus*, *Halanaerobium*, *Leuconostoc*, *Marinobacter*, *Streptomyces*, *Propionibacterium* e *Streptococcus*, pertencendo a quatro classes dentro do Domínio Bacteria: Firmicutes (Gram-positivas de baixo conteúdo de GC); Actinobacteria (Gram-positivas de alto conteúdo de GC); γ -Proteobacteria e ϵ -Proteobacteria (Sette *et al.*, 2007). Foi verificado que alguns destes grupos de microrganismos 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; Lu *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 da Bacia de Campos (Macaé, RJ) (Sette *et al.*, 2007). Além disso, estudos de degradação realizados com bactérias isoladas das amostras de água de formação e óleo (conduzidos pelo grupo de pesquisa liderado pela Dra. Anita Marsaioli, Instituto de Química/UNICAMP, colaborador do projeto) revelaram a presença de microrganismos com capacidade de degradar, em taxas distintas, diferentes classes de biomarcadores.

Os resultados do Projeto citado acima representaram uma contribuição inovadora com relação à caracterização de comunidades microbianas em petróleo, biomarcadores e biodegradação, e serviram de base para direcionar os objetivos do presente trabalho. Este envolveu o desenho e teste de especificidade de oligonucleotídeos (utilizados como iniciadores

ou “*primers*” em reações de PCR) direcionados para a região do DNA ribossomal 16S bacteriano, visando à detecção e quantificação de grupos específicos de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos em amostras de petróleo e água de formação coletadas na Bacia de Campos (RJ, Brasil).

O desenvolvimento de um método molecular para a detecção rápida de grupos específicos de microrganismos degradadores nas amostras ambientais oferece uma ferramenta para a avaliação da qualidade do óleo nos reservatórios de produção, auxiliando a detecção de microrganismos “indesejáveis” nas amostras e a caracterização de grupos bioindicadores potencialmente associados à qualidade do óleo.

2. Revisão bibliográfica

2.1. BIODEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO

O petróleo é uma mistura complexa e heterogênea de compostos orgânicos. Já foram identificados mais de 17000 componentes químicos distintos no óleo (Head *et al.*, 2006). 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 (Corrêa, 2003; van Hamme *et al.*, 2003). O óleo com estas características é considerado “óleo leve” e tem maior valor econômico. Os óleos pesados, que resultam de biodegradação do óleo bruto sob condições anóxicas *in situ* 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, 1984).

De acordo com o *American Petroleum Institute* (API), os óleos são classificados em vários graus em função da sua densidade, sendo que os com maior graduação são os melhores (mais leves). Fatores como a idade geológica da rocha-geradora, a profundidade do reservatório, tectonismo, salinidade e teor de enxofre interferem no grau API dos óleos (Corrêa, 2003).

Os óleos biodegradados constituem uma parte bastante significativa do inventário mundial de petróleo, sendo as maiores reservas de óleo encontradas nas bacias das Américas (Head *et al.*, 2003). Durante a biodegradação, a oxidação do óleo leva a uma diminuição no conteúdo de hidrocarbonetos saturados (e uma diminuição mais discreta do conteúdo de hidrocarbonetos aromáticos) e no grau API; e, por outro lado, aumenta a densidade do óleo, seu conteúdo de enxofre e metal, acidez e viscosidade. Ácidos heterocíclicos são normalmente gerados, apresentando múltiplos e diferentes heteroátomos, o que constitui a principal causa dos problemas de corrosão durante o processamento de óleos pesados e degradados (Head *et al.*, 2003).

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) descrevem 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 ,25-norhopanos.

2.2. MICROBIOLOGIA DO PETRÓLEO

2.2.1. Microrganismos em ambientes de reservatório de petróleo

Apesar do ambiente de reservatório de petróleo ser hostil, com valores elevados de temperatura e pressão, ele abriga uma grande diversidade de microrganismos, conforme observado em estudos de diversidade em amostras de óleo e água de formação (Voordouw *et al.*, 1996; Magot *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2000; Sette *et al.*, 2007). Muitos destes microrganismos são extremófilos, ou seja, vivem em condições ambientais caracterizadas como fora da faixa considerada normal, que seria pH próximo ao neutro, temperatura entre 20 e 40°C, pressão de 1 atm e níveis adequados de água disponível, nutrientes e sais (Satyanarayana *et al.*, 2005).

Os dados disponíveis relacionados aos reservatórios de petróleo sugerem que apenas os microrganismos anaeróbicos estritos podem ser considerados como verdadeiramente autóctones nesses ecossistemas (Bernard *et al.*, 1992; Grassia *et al.*, 1996; Magot, 1996). Entretanto, microrganismos aeróbicos (Orphan *et al.*, 2000; Nazina *et al.*, 2001; Bonch-Osmolovskaya *et al.*, 2003; Borzenkov *et al.*, 2006), anaeróbios facultativos (Adkins *et al.*, 1992; Nazina *et al.*, 1993; Zvyagintseva *et al.*, 1995; Voordouw *et al.*, 1996; Telang *et al.*, 1997) e microaerófilos pertencentes aos gêneros *Campylobacter*, *Oceanospirillum* e *Thiomicrospira* (Voordouw *et al.*, 1996; Telang *et al.*, 1997) já foram detectados em amostras obtidas de reservatórios de petróleo. Geralmente, a falta de detalhes relacionados à coleta das amostras, e possivelmente a entrada de água da superfície como consequência de injeção de água ou características geológicas locais, dificultam a interpretação com relação à presença de bactérias aeróbicas em ambientes de subsuperfície profundos.

Uma grande parte dos microrganismos que habitam reservatórios de petróleo representa um problema para a indústria petrolífera. Como exemplo, existem aqueles que utilizam como parte da sua cadeia de energia compostos com enxofre presentes na água do mar – e algumas vezes na água de formação ou de aquíferos, além dos compostos de carbono simples presentes em formações petrolíferas. Os metabólitos resultantes do crescimento desses

microrganismos incluem H_2S , que é tóxico aos seres humanos e corrosivo a tanques e tubulações. Além disso, alguns microrganismos crescem continuamente, bloqueando os poros das rochas-reservatórios e, conseqüentemente, reduzindo sua permeabilidade. Há ainda os que inativam produtos químicos que são utilizados para facilitar as operações de produção e aumentar a vida dos reservatórios (Bass e Lappin-Scott, 1997).

Por outro lado, existem microrganismos cuja atuação é benéfica para a indústria do petróleo. São bactérias que produzem, durante seu crescimento, compostos úteis para aumentar a recuperação do óleo – por exemplo, solventes, ácidos, gases, surfactantes e biopolímeros. Estas bactérias e o produto de seu metabolismo podem ser usados de forma positiva nos reservatórios (Bass e Lappin-Scott, 1997). Além disso, novas linhagens microbianas podem ser isoladas destes ambientes, possibilitando a identificação de novos compostos e rotas bioquímicas, além da caracterização molecular e bioquímica de componentes celulares (Satyanarayana *et al.*, 2005).

Portanto, os microbiologistas do petróleo tentam encontrar maneiras de suprimir ou controlar as bactérias prejudiciais, e ao mesmo tempo induzir o crescimento das bactérias de atuação benéfica.

2.2.2. Microrganismos degradadores de hidrocarbonetos

Devido ao grande impacto econômico decorrente da degradação do petróleo, existem atualmente diversos trabalhos caracterizando os principais microrganismos encontrados em reservatórios (Magot *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2005; Sette *et al.*, 2007). Além disso, muitos estudos envolvem a recuperação de microrganismos extremófilos habitando reservatórios de petróleo que possam ter aplicação econômica tanto para a biorremediação, recuperando ambientes que sofreram derramamento de petróleo, quanto para a produção de compostos ou enzimas de aplicação biotecnológica.

Um estudo interessante de recuperação de ambientes contaminados com petróleo foi realizado por Radwan *et al.* (1995). Estes autores retiraram amostras de um deserto no Kwait, contaminadas com óleo e expostas ao ar livre. Após um ano testando a aplicação de diferentes produtos com o objetivo de descontaminação das amostras, observaram que os controles (que não foram tratados com nenhuma substância) mantiveram constante a taxa de alcanos medida durante os meses secos e quentes, porém apresentaram diminuição dos mesmos nos períodos chuvosos. Comparando com os outros testes, concluíram que a própria comunidade microbiana presente nas amostras - composta principalmente por *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* e, em menor quantidade, por fungos como *Aspergillus* e *Penicillium* - era capaz

de degradar os alcanos, sem a necessidade de tratamento com qualquer produto. O único fator necessário para a atuação destes organismos era a umidade.

Em outro estudo, Rapp e Gabriel-Jürgens (2003) verificaram que uma linhagem de *Rhodococcus* sp. degradava di-, tri- e tetraclorobenzenos e produzia biossurfactantes durante o crescimento em uma grande variedade de alcanos. Observaram que esta linhagem degradava *n*-alcanos com cadeia de C₁₀-C₁₇ tão prontamente ou até melhor do que aqueles de cadeias menores, mostrando potencial para a biorremediação de solos e sedimentos contaminados por anos ou décadas com compostos recalcitrantes.

Já Grabowski *et al.* (2005) trabalharam com enriquecimento de amostras de água de produção, obtidas de um poço de petróleo localizado em uma Bacia Sedimentar no Oeste do Canadá. Através de técnicas moleculares baseadas em clonagem de genes RNAr 16S e hibridização *in situ*, detectaram populações de microrganismos acetogênicos afiliados ao grupo das δ -proteobactérias formando associações com duas populações diferentes compostas por organismos metanogênicos altamente relacionados a *Methanocalculus* e *Methanosaeta*. Segundo os autores, na maioria dos ambientes anaeróbicos é necessária uma cooperação metabólica entre os microrganismos para que ocorra uma degradação completa da matéria orgânica. Neste sentido, a presença de ácidos graxos como estearato e palmitato em algumas amostras de óleo bruto pode ser correlacionada com o processo de biodegradação, uma vez que os ácidos graxos são intermediários importantes para a degradação de matéria orgânica complexa.

As bactérias sulfato-redutoras, como as da Família Desulfovibrionaceae, são muito freqüentemente recuperadas a partir de reservatórios de petróleo (Tanaka *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2005). São bactérias que utilizam anaerobicamente hidrogênio, ácidos orgânicos simples, álcoois e hidrocarbonetos como doadores de elétrons para a redução de sulfato. Apresentam uma atuação importante no ciclo global de carbono e enxofre, especialmente em condições anaeróbicas. No entanto, sua presença é vista como fator negativo para o refino do petróleo, uma vez que produzem H₂S e HS⁻. Estes compostos são tóxicos, corrosivos e formam sulfetos metálicos insolúveis, que levam a uma perda da permeabilidade do reservatório (Tanaka *et al.*, 2002).

Microrganismos metanogênicos, inclusive arqueias, são também comuns em ambientes de reservatórios de petróleo (Magot *et al.*, 2000).

2.3. DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS EM AMBIENTES EXTREMOS

A Microbiologia Ambiental teve um grande avanço nas últimas décadas, com a implementação de técnicas independentes de cultivo. Este avanço foi especialmente observado em estudos de diversidade relacionados a ambientes extremos, como é o caso de reservatórios de petróleo, que apresentam geralmente altos valores de temperatura, pressão e salinidade (Satyanarayana *et al.*, 2005; Orphan *et al.*, 2000).

Por um lado, as técnicas microbiológicas tradicionais, baseadas em isolamento e cultivo, possibilitaram a recuperação de microrganismos com metabolismos diversos a partir de ambientes de reservatórios de petróleo ou contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Estes incluem microrganismos aeróbicos, anaeróbicos facultativos e microaerofílicos; termofílicos e hipertermofílicos; redutores de sulfato, enxofre, ferro e manganês; bactérias fermentativas, metanogênicas e acetogênicas (Magot *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2002). O estudo da fisiologia destes microrganismos revelou informações importantes com relação às condições nas quais ocorre a biodegradação do petróleo (Röling *et al.*, 2003).

No entanto, existem populações difíceis de serem recuperadas por cultivo. Estima-se que cerca de 90 a 99% dos microrganismos presentes no ambiente não sejam cultivados em laboratório (Macnaughton *et al.*, 1999; Staley, 1998). Alguns destes crescem em biofilmes, dependendo de outros microrganismos e de condições específicas para sobreviverem. Além do mais, características importantes dos reservatórios devem ser levadas em consideração, tais como: pH, salinidade, pressão, condições de *redox* e temperatura, as quais dificultam a recuperação dos microrganismos em cultivo (Röling *et al.*, 2003). Portanto, a realização de um estudo mais abrangente sobre a estrutura e função de determinadas populações microbianas em ambientes como este requer a aplicação de outro tipo de abordagem, capaz de detectar, comparar e quantificar microrganismos em nível genético, como é o caso das técnicas moleculares que independem do isolamento e cultivo.

Existem várias abordagens moleculares independentes de cultivo, que possibilitam a caracterização de comunidades microbianas complexas em amostras ambientais, além da identificação de uma grande quantidade de microrganismos nunca antes cultivados. O emprego disseminado destas metodologias na última década abriu novas perspectivas sobre a diversidade microbiana no ambiente, resultando em um aumento drástico no número de grupos taxonômicos conhecidos. O número de divisões conhecidas dentro do Domínio Bacteria passou de 12 divisões em 1987, todas com representantes cultivados, para 36 divisões em 1998, sendo que destas últimas, 12 não possuíam representantes cultivados (Hugenholtz *et al.*, 1998). Isto

se deveu, em grande parte, aos estudos filogenéticos envolvendo extração direta de DNA a partir de amostras ambientais associada à amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de genes conservados e construção de bibliotecas genômicas. Este número vem aumentando consideravelmente, sendo que o último inventário realizado revelou que apenas 26 divisões (ou filos) dentre as cerca de 52 Divisões conhecidas dentro do Domínio Bactéria possuem representantes cultivados (Rappé e Giovannoni, 2003).

Em Microbiologia do Petróleo, as técnicas moleculares são relativamente recentes. No entanto, os estudos realizados já revelaram uma grande diversidade de microrganismos, complementando os dados obtidos através dos estudos envolvendo isolamento e cultivo (Yoshida *et al.*, 2005; Cunha *et al.*, 2006; Sette, *et al.*, 2007).

Entre as técnicas independentes de cultivo mais comumente utilizadas está a amplificação do gene que codifica para o RNAr da subunidade menor do ribossomo, seguida de clonagem e seqüenciamento, a partir de amostras ambientais, que tem revelado uma vasta diversidade microbiana em diversos ambientes, incluindo oceanos, solos e sedimentos, fontes termais e ambientes de sub-superfície (Orphan *et al.*, 2000). Este gene está presente em todos os organismos, contendo regiões com diferentes graus de conservação, o que possibilita seu uso como molécula-alvo tanto para o estudo de grupos microbianos mais diversificados quanto para a detecção de grupos específicos. A técnica de PCR, tendo como alvo um gene específico, é também extensivamente utilizada em conjunto com outras técnicas, como as técnicas de *fingerprinting* (DGGE, TGGE, ARDRA).

Recentemente, variações na técnica de PCR permitiram seu uso para a quantificação de populações de microrganismos em amostras ambientais. É o caso das metodologias de PCR competitivo e PCR em tempo real (*Real Time PCR*), as quais foram recentemente aplicadas em estudos de diversidade relacionados a ambientes de reservatórios de petróleo. Como exemplo, Watanabe *et al.* (2002) verificaram uma alta abundância de ϵ -Proteobacterias do subgrupo *Thiovulum* em uma cavidade subterrânea em Kuji (Iwate, Japão). Já Nyysönen *et al.* (2006) avaliaram a abundância de um grupo de bactérias degradadoras de naftaleno em amostras de solo contaminado com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.

As técnicas de PCR quantitativo são utilizadas em diversos tipos de ambientes. Ben-Dov *et al.* (2007) utilizaram esta estratégia para a quantificação de bactérias redutoras de sulfato em esgoto industrial. Até mesmo em Biologia Molecular oral esta técnica está sendo aplicada (Nadkarni *et al.*, 2002).

É importante lembrar que todo método possui suas limitações, e não é diferente com as técnicas moleculares. Muyzer e Smalla (1998) discutem que estas técnicas estão sujeitas a

erros e influências derivadas da manipulação das amostras, tais como armazenamento sob condições aeróbicas ou anaeróbicas, entre outros. Outro fator que pode mascarar estimativas de diversidade em amostras ambientais é o protocolo de extração de ácidos nucleicos escolhido. Podem ocorrer problemas de lise celular diferencial, em função das características bioquímicas ou fisiológicas distintas dos microrganismos, ou então impurezas residuais nas preparações de DNA, tais como a presença de ácidos húmicos, os quais podem inibir a ação de enzimas de restrição ou a reação de amplificação por PCR subsequente. A própria técnica de PCR possui as suas limitações para os estudos de diversidade ambiental. Uma limitação importante é que pode ocorrer amplificação preferencial, sendo que certos grupos bacterianos simplesmente não são detectados pelos *primers* utilizados, mesmo estes sendo considerados como universais (Suzuki e Giovannoni, 1996; Abulencia *et al.*, 2006).

Neste sentido, os resultados obtidos a partir de uma análise de diversidade microbiana devem ser interpretados com cautela, e diferentes metodologias devem ser empregadas de maneira a se obter uma perspectiva integrada dos componentes da comunidade microbiana entre si e entre estes e as variáveis ambientais.

3. Objetivos Gerais

- Desenvolvimento de um método rápido e independente de cultivo, baseado na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), para a detecção de grupos bacterianos com capacidade de degradação de hidrocarbonetos em amostras provenientes de reservatórios de petróleo em produção;
- Avaliação da distribuição e abundância das populações degradadoras nas amostras de petróleo e água de formação por nested PCR grupo específico e PCR quantitativo (*Real-time PCR*), a fim de se determinar, juntamente com ensaios de degradação conduzidos pela equipe da Dra. Anita Marsaioli (IQ/UNICAMP), a relevância dos grupos microbianos na deterioração do petróleo em poços da Bacia de Campos.

4. Objetivos Específicos

- Definição, a partir de dados de literatura ou de recuperação e alinhamento de seqüências de RNAr 16S contidas em bases de dados, de *primers* específicos para a detecção de *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Dietzia* spp., *Micrococcus* spp., *Bacillus pumilus*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Rhodococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Brevibacillus* spp. e *Acinetobacter* spp.;
- Confirmação da especificidade dos *primers* através de testes *in silico* e de experimentos de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando linhagens referência como controles positivos e negativos;
- Detecção dos grupos-alvo de bactérias em cada amostra ambiental através de extração direta de DNA da comunidade bacteriana total, aliada à amplificação de seqüências do gene RNAr 16S com os *primers* e protocolos de PCR específicos determinados neste projeto;
- Avaliação da abundância de *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Dietzia* spp. e *Streptomyces* spp. nas amostras de petróleo e água de formação através de quantificação por *Real Time PCR*, a fim de inferir os grupos bacterianos que desempenham papel relevante nos processos relacionados à biodegradação dos óleos amostrados.

To be submitted to the Journal: *International Biodeterioration and Biodegradation*
(impact: 1.619, dez/07).

Cultivation-independent detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin

Elaine Crespim¹, Eugênio Vaz dos Santos Neto² and Valéria Maia de Oliveira^{1*}

¹Center of Chemical, Biological and Agricultural Research, CPQBA/UNICAMP, CP 6171, CEP 13081-970, Campinas, SP, Brazil; ²Petrobras R&D Center, Cidade Universitária, Quadra 7, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 21949-900, Brazil.

*Corresponding author: Valéria Maia de Oliveira. Mailing address: Center of Chemical, Biological and Agricultural Research, CPQBA/UNICAMP, CP 6171, CEP 13081-970, Campinas, SP, Brazil. Phone: +55 (19) 3884-7500 ext. 263 / Fax: +55 (19) 3884-7811 / e-mail: vmaia@cpqba.unicamp.br

Scientific relevance

So far, many microorganisms have been isolated from petroleum reservoirs and related to petroleum deterioration. Many of them transform light oils into heavier ones, thus lowering their economic value and presenting a threat to petroleum industries. This work aimed at the development of a molecular method, based on the PCR strategy, for the rapid detection of specific groups of biodegrading bacteria in petroleum samples from Campos Basin (RJ), offering an useful tool to aid the evaluation of oil quality in production reservoirs. This method can also allow the mapping of production reservoirs in relation to the presence of specific bacterial groups, in order to evaluate the risk of occurrence of problems related to biocorrosion of petroleum production equipment and oil biodeterioration, thus representing an important technological innovation for Brazilian petroleum industry.

Abstract

The use of cultivation-independent molecular techniques, based on the direct isolation of DNA from environmental samples, PCR-amplification of genes, genetic fingerprint analysis and/or 16S rRNA gene library assembly, has shown promising results in the microbial ecology field, allowing the identification of organisms from natural environments without the need of isolation. The detection of microorganisms with potential for biodeterioration, biodegradation and biocorrosion in petroleum fields is of great importance, since these organisms may be related to a decrease in petroleum quality in the reservoirs or damages in the production facilities. This work aimed the selective direct detection of bacteria related to hydrocarbon degradation, namely *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Micrococcus* spp., *Achromobacter xylosoxidans*, *Dietzia* spp. and *Bacillus pumilus* in petroleum samples collected from different reservoirs from the Campos Basin (RJ, Brazil). Primer sets targeting 16S rRNA genes were designed and their specificity was confirmed *in silico* and in PCR amplification experiments using DNA from reference strains as positive and negative controls. Total bacterial DNA from oil samples was purified and the amplification tests revealed the presence of the target bacteria in the environmental samples, unraveling a significant potential for petroleum biodegradation in the reservoirs sampled. The development of a molecular method for rapid detection of specific groups of biodegrading microorganisms in environmental samples would be extremely useful as a supporting tool for the evaluation of oil quality in the production reservoirs.

Key words: biodegradation, petroleum-associated bacteria, group-specific PCR, 16S rRNA genes.

Introduction

Since the beginning of petroleum production for commercial purposes, petroleum engineers have been facing problems related to the presence of microorganisms in reservoir environments (Magot et al., 2000). Microorganisms are greatly responsible for petroleum deterioration, being related not only to hydrocarbon degradation, but also to equipment and pipeline corrosion, as well as production of undesired compounds, such as polymers, gums, organic acids and H₂S (Cord-Ruwich et al., 1987), which may alter petroleum characteristics. During biodegradation, the hydrocarbon content is biologically transformed, with consequent increase in oil density, sulphur content, acidity and viscosity. All these factors interfere in extraction and refining operations, thus resulting in great economical losses for the petroleum industry (Connan, 1984). This scenario is reflected as a major problem for the global economy, once the majority of the Earth's oil reserves are biodegraded to some extent (Head et al., 2003).

Microbial isolation and cultivation from oil and formation water samples have revealed a great variety of organisms in these environments (Magot et al., 2000). However, several studies on the microbiology of petroleum reservoirs suggest that only the strictly anaerobic microorganisms can be considered as truly endogenous in these ecosystems (Bernard et al., 1992; Grassia et al., 1996; Magot, 1996). Nonetheless, aerobic (Orphan et al., 2000; Nazina et al., 2001; Bonch-Osmolovskaya et al., 2003; Borzenkov et al., 2006), facultatively anaerobic (Adkins et al., 1992; Nazina et al., 1993; Zvyagintseva et al., 1995; Voordouw et al., 1996; Telang et al., 1997) and microaerophilic microorganisms belonging to the genera *Campylobacter*, *Oceanospirillum* and *Thiomicrospira* (Voordouw et al., 1996; Telang et al., 1997) have been detected in oil field samples. Generally, the lack of details on sample recovery, and possible entry of surface water resulting from water injection or local geological characteristics, often make the interpretation of the presence of aerobic bacteria in such anaerobic ecosystems quite difficult.

Even though a wide metabolic range of bacteria have been successfully isolated from petroleum samples, it is of common knowledge that many microorganisms found in natural

environments are not yet cultivated in laboratory, there being a significant difference between what is present in the environment and what can be recovered through cultivation-based techniques (Rappé and Giovannoni, 2003). The use and optimization of molecular biology techniques for microbial community studies, which involve the direct DNA extraction from the environmental samples, associated to the PCR (Polymerase Chain Reaction) amplification of conserved genes and sequence analyses, have revealed an astonishing microbial diversity, as the organisms can be detected directly from the environment, without the need of cultivation (Pace, 1996; Hugenholtz et al., 1998).

Only a few studies of microbial diversity characterization in oil fields were conducted using molecular approaches, unraveling physiologically diverse communities of bacteria and archaea (Voordouw et al., 1996; Magot et al., 2000; Orphan et al., 2000).

The use of cultivation-independent techniques may offer a valuable tool in the microbial evaluation of petroleum samples, helping to detect “undesirable” microorganisms in the samples and to characterize bioindicator groups potentially associated to the oil quality. In this sense, and based on previous work from our research group (Sette et al., 2007), this study aimed the development of group-specific primer sets for the selective and direct detection of *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Achromobacter xylosoxidans*, *Bacillus pumilus*, *Dietzia* spp. and *Micrococcus* spp. in petroleum and formation water samples from the Campos Basin.

Material and Methods

Study area, geological and geochemical background

The Campos Basin is currently the most prolific basin in Brazil. It covers an area of about 100,000 km² alongside the Brazilian passive margin up to the 3400 m-isobath (Figure 1). Oil fields are localized in a large water depth range, however the exploration pace has pushed up drilling operations to increasingly deeper reservoirs under higher water depths.

The establishment of the Campos Basin is related to the breakup of the Gondwanaland and its development is linked to the open-up of the Southern Atlantic Ocean. The tectonic and stratigraphic evolution of the basin can be divided in three main phases: a) nonmarine megasequence (rift), b) transitional, during the Aptian tectonic quiescence (early drift), and c) marine megasequence (late drift), that is represented by Albian shallow-water carbonates and fine siliciclastics that grades upward into an Upper Cretaceous-Paleocene bathial siliciclastic lithology (Figures 1 and 2, Guardado et al., 2000).

Source rocks in the Campos Basin are represented mainly by calcareous black shales deposited under lacustrine saline conditions during the Lower Cretaceous (Trindade et al., 1994; Mello et al., 1988). Hydrocarbon source potential of these source rocks is very high, as indicated by carbon contents that average 2-6%, but having intervals reaching values as high as 9-12%. The kerogen is, predominantly, type I as indicated by organic petrography and Rock-Eval pyrolysis (Hydrogen index > 750 mg HC/g TOC; Guardado et al., 2000). Thermal modeling suggests that in depocenters the onset of oil window occurred as early as late Albian and the peak of oil generation was reached during Miocene. Nevertheless, significant petroleum generation is still going on in many areas of the basin (Jahnert et al., 1998).

The relatively late secondary migration has allowed the petroleum to be trapped in a wide age range of reservoirs in different depths and temperatures. Such temperature variation has been interpreted as the most important control on the oil preservation. Most of the petroleum is produced from turbiditic sandstones deposited during Upper Cretaceous to Paleogene (Figure 2). But other significant reservoirs are represented by calcarenites (Albian), bioclastic lacustrine limestone (Barremian), and fractured basalts (Neocomian). In some cases, it may occur mixing of late, non-biodegraded oils with reservoir oils already biodegraded, in a process known as

“oil refreshing”. Therefore, these mixed oils will have geochemical characteristics of both biodegraded and non-biodegraded end-members.

Bulk, carbon isotopic ($\delta^{13}\text{C}$) and molecular analyses, medium pressure liquid chromatography (MPLC), gas chromatography (GC), biomarkers (GC/MS) of the studied oils have confirmed one common source and similar levels of thermal maturity, but have shown distinct degrees of biodegradation, indicating that these samples are appropriate for investigating biodegradation (Table 1).

Gas chromatograms (GC) of the oils from the reservoirs 4 (highly-biodegraded) and 5 (non-biodegraded) are shown as examples of the extreme biodegradation levels (Figure 3).

The lacustrine saline sediments of the Lagoa Feia Formation were interpreted as the source for the typical “Campos oils”, including the studied samples (Mello et al., 1988; Mohriak et al., 1989). Among the diagnostic features for this oil type are $\delta^{13}\text{C}$ varying between -25.6‰ and -23.0‰, high hopane/sterane ratio (H/S >5), and predominance of C_{27} steranes. In non-biodegraded oils, it is conspicuous the bimodal distribution of *n*-alkanes with predominance of the low molecular fraction (> $n\text{C}_{15}$) and pristane/phytane > 1 (Figure 3). The biodegraded oils still preserve most of the diagnostic biomarkers of source but *n*- and isoalkanes are severely affected or are absent in GC traces. In this case, a common feature is the prominent UCM (unresolved complex mixture) hump (Figure 3).

Sampling

Oil samples were obtained in July 2005, from five production wells at Pampo Platform, Campos Basin (Macaé, RJ, Brazil), with logistic support of CENPES/Petrobras. Reservoirs from these wells differed in temperature and depth, allowing variable levels of oil degradation (Table 1). One sample of formation water was also obtained from a separation tank. Special operations made before the sample collection assured the origin of the oil from a specific production interval. Purge of the production line was long enough to avoid mixing of produced oils coming from different reservoirs. Strict procedures were followed during sampling in order to avoid contaminations.

Samples were collected in triplicate using 500 mL sterilized Schott bottles, which were completely filled with the samples in order to prevent oxygen influx. The samples were kept on ice during transportation to the laboratory, and stored at room temperature for further DNA extraction.

Bacterial reference strains

Positive controls used in amplification reactions consisted of bacteria belonging to the specific PCR-targeted genera or species. Reference strains belonging to distinct classes of Domain Bacteria, as well as strains closely related to each PCR target group, were used as negative controls. The strains used as positive and negative controls are listed in the correspondent figure.

The strains were obtained from the German Collection DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*) and from the Brazilian culture collections CBMAI (Brazilian Collection of Environmental and Industrial Microorganisms, Campinas, SP), INCQS (Oswaldo Cruz Culture Collection, National Institute of Health Quality Control) and CCGB (*Bacillus* and Correlated Genera Culture Collection) from Fiocruz (Rio de Janeiro, RJ), IBSBF (Phylobacteria Culture Collection of the Plant Bacteriology Laboratory, Biological Institute, Campinas, SP), and UFPEDA (Actinomycetes Culture Collection, Antibiotics Department from Federal University of Pernambuco, PE).

DNA extraction

For the samples of reservoirs 1, 4 and 5, DNA extraction was performed from an initial volume of 100 mL of crude oil. In the cases of reservoirs 2 and 3, due to the large amount of pellet obtained after initial centrifugation with isooctane (procedure described below), the initial volume was 25 mL.

Oil aliquots for DNA extraction were taken from the bottles under constant nitrogen flow, in order to avoid profound changes in the total bacterial community due to any oxygen influx. The crude oil was washed twice with isooctane (Vetec), following centrifugation at 8000 *g*, for 20 minutes at 4°C, based on the sample pre-treatment suggested by Yoshida et al. (2005). The resulting precipitate was dissolved in isooctane, yielding a final volume of 5 mL. This solution was used for the DNA extraction, using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), according to the protocol described by Tanaka et al., (2002) with minor modifications, which included the addition of 1 volume of glass beads (0.1 mm, Sigma) to this initial solution, as well as the first Buffer (ASL) of the kit, to a final volume of 20-22 mL. The entire mixture was heated at 70°C for 5 minutes and 2 mL-aliquots were distributed into appropriate microtubes, followed by homogenization in a mini bead-beater (Biospec Products) at 3800 rpm for 1 min. The tubes were incubated again at 70°C for 5 min, vortexed for 15 s and centrifuged at 17000 *g* for 1 min. Finally, 1.2 mL of the supernatant was transferred to a clean tube and purified with the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Before use in the PCR reactions, the DNA was purified in mini-columns (*GFX PCR DNA and gel band purification kit*, GE Healthcare) and eluted in a final volume of 40 µL.

For the formation water sample, DNA extraction was based on a modified protocol described by Dr. Bahrat Patel (personal communication) described as follows. An initial volume of 20 mL of formation water was centrifuged at 12900 *g* for 10 min and suspended in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) to a final volume of 450 µL. Lysozyme was added to a final concentration of 1.6 mg mL⁻¹ and the tube was incubated at 37°C for 1 h 30 min. SDS and proteinase K were added to a final concentration of 0.5%, and 0.4 µg µL⁻¹, respectively, and the solution was incubated at 50°C for 1 h 30 min, followed by addition of NaCl (1 M final concentration) and CTAB 1.3%. The mixture was homogenized and incubated at 65°C for 10 min, followed by a two-step purification with 1 volume phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) and 1 volume chloroform:isoamyl alcohol (24:1). The DNA was then precipitated with 450 µL isopropanol and centrifuged for 15 min at 12900 *g*. After washing with 70% ethanol, the DNA was dried at room temperature and suspended in 30 µL of TE buffer. The DNA solution was finally treated with RNase and incubated for 1 hour at 37°C.

DNA extraction of reference strains was carried out according to Pitcher et al. (1989), which usually results in relatively pure DNA for subsequent molecular analyses. In particular cases, when lysis was not efficient using this protocol, DNA isolation was performed following either the method described by Young and Blakesley (1991), which uses proteinase K for the lysis at 55°C, or the one used by Pospiech and Neumann (1995), which involves a long incubation time in lysozyme and proteinase K, resulting in a high efficiency of DNA recovery.

The yield and integrity of DNA obtained from environmental samples and pure cultures were confirmed through electrophoresis in 1% agarose gel stained with ethidium bromide and documented using the equipment UVP BioImaging System GDS-8000 (UVP, Upland, CA, USA). Additionally, a PCR reaction was performed using universal primer sets for the Domain Bacteria (p27f and pL1401r, Table 2), in order to check if the recovered DNA was amplifiable.

Primer design and specificity tests

The target bacterial groups consisted of *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Achromobacter xylosoxidans*, *Bacillus pumilus*, *Dietzia* spp. and *Micrococcus* spp. These taxonomic groups were chosen based on previous studies carried out by our research team which enabled their detection, by molecular or culturing methods, in oil samples and formation water collected from the same platform (Sette et al., 2007). In addition, parallel biodegradation assays conducted with

the isolates revealed their ability to degrade *ex situ* different classes of petroleum biomarkers, in distinct rates, confirming their potential to deteriorate oil (Vasconcellos, 2006).

Specific primer sets were found in the literature for *Bacillus* spp. (Garbeva et al. 2003), *Streptomyces* spp. (Roberts and Crawford, 2000) and *Achromobacter xylosoxidans* (Liu et al., 2002). For the remaining target bacteria, primer design was performed through the recovery and alignment of 16S rRNA sequences of bacteria belonging to the target groups, as well as non-targeted taxonomically related bacteria, considered as outgroups. The 16S rRNA sequences were recovered from Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) and RDP (Ribosomal Database Project - Release 9; <http://rdp.cme.msu.edu/>). The alignment and definition of 16S rRNA potential region for primer design were performed using the programs "Clustal X" (Thompson et al., 1997) and "Primer 3" (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Each primer sequence was defined in a way to match only the target group. *In silico* tests for primer specificity were performed using the *Probe Match* (RDP) and BLASTN (Genbank) routines. Primer specificity was then checked in PCR reactions using positive and negative controls. Thermal cycling programs and PCR reaction conditions established for each bacterial target group were as follows.

a) *Bacillus* spp.: PCR was carried out in a 25- μ L reaction volume, containing 50-100 ng of genomic DNA from pure culture, 2 U *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), 1X PCR Buffer (Invitrogen), 200 μ M dNTP mix, 1.5 mM $MgCl_2$ and 0.2 μ M each primer pBacF and pBacR (Table 2). In order to improve the primer stringency and to obtain the exclusive detection of the bacteria used as positive controls, we established a PCR program using a *touchdown* strategy (Muyzer et al., 1995). Touchdown PCR was performed as follows: an initial denaturation step at 94°C for five min, followed by nine cycles at 94°C for 1 min, 67°C for 1 min (lowering 0.5°C each cycle) and 72°C for 2 min; other 25 cycles of 94°C for 1 min, 63°C for 1 min and 72°C for 2 min; and a final extension step at 72°C for ten min.

b) *Streptomyces* spp.: PCR was carried out in a 25- μ L reaction volume containing 50-100 ng genomic DNA, 2 U *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), 1X PCR Buffer (Invitrogen), 50 μ M dNTP mix, 1.5 mM $MgCl_2$ and 50 μ M each primer pStrep and pCLF-4 (Table 2). In this case, only one of the primers – pStrep – was specific for the Genus *Streptomyces*, while pCLF-4 was homologous to a conserved region of the bacterial 16S rDNA. After stringency tests, the established thermal cycling program consisted of an initial denaturation at 95°C for 4 min; 10 touchdown cycles of 94°C for 40 s, 73°C for 45 s (lowering 0.5°C each cycle) and 72°C for 90 s; followed by other 25 cycles of 94°C for 40 s, 68°C for 45 s and 72°C for 90 s; and a final extension at 72°C for five min.

c) *Micrococcus* spp.: PCR was carried out in a 25- μ L reaction volume containing 50-100 ng genomic DNA, 2 U *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), 1X PCR Buffer (Invitrogen), 200 μ M dNTP mix, 1.5 mM $MgCl_2$ and 0.4 μ M each primer pMicfor and pMicrev (Table 2). Thermal cycling conditions were settled as: an initial step at 94°C for 10 min; 31 cycles of 94°C for 1 min, 62°C for 1 min and 72°C for 2 min; followed by a final step at 72°C for 10 min.

d) *Dietzia* spp.: PCR conditions were as described above for *Micrococcus* spp., except that the primer set used was pDz1for and pDzrev (Table 2). The specific amplification program established consisted of an initial denaturation step at 94°C for ten min; 30 cycles of 94°C for 1 min, 61°C for 1 min and 72°C for 2 min; and a final step at 72°C for 10 min.

e) *Achromobacter xylosoxidans*: PCR was carried out in a 25- μ L reaction volume containing 50-100 ng genomic DNA, 2 U *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), 1X PCR Buffer (Invitrogen), 200 μ M dNTP mix, 1.5 mM $MgCl_2$ and 1 μ M each primer pAX-F1 and pAX-B1 (Table 2). The thermal

cycling conditions were established as an initial denaturation at 94°C for 10 min; 30 cycles of 94°C for 1 min, 56°C for 45 s and 72°C for 1 min; and a final extension at 72°C for 10 min.

f) *Bacillus pumilus*: PCR conditions were as described above for *Micrococcus* spp., except that the primer set used was pBPfor and pBPrev (Table 2). After primer stringency tests, the amplification program was determined as: an initial step at 95°C for 10 min; 9 touchdown cycles of 95°C for 1 min, 56°C for 1 min (lowering 0.5°C each cycle) and 72°C for 2 min; followed by other 20 cycles of 95°C for 1 min, 52°C for 1 min and 72°C for 2 min; and a final extension step at 72°C for 10 min.

In all cases, PCR products were checked on 1% agarose gel stained with ethidium bromide and documented using the equipment UVP BioImaging System GDS-8000 (UVP, Upland, CA, USA).

Detection of hydrocarbon degrading bacteria in environmental samples

After establishing the PCR protocols, the specific primer sets were used for detection of the target groups in the environmental samples. A nested PCR approach was used with environmental DNA obtained from oil and formation water samples. Two sets of primers were used for the detection of each target group. In the first PCR reaction, bacterial 16S rRNA gene sequences were generically amplified using the conserved primers p27f and pL1401r (Table 2) when *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Micrococcus* spp. and *Dietzia* spp. were the target groups, and the conserved primers p10f and p1100r (Table 2) when *Achromobacter xylosoxidans* and *Bacillus pumilus* were the target bacteria. In both cases, PCR was performed in 25- μ L reactions containing 5 μ L of environmental DNA solution, 2 U *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), 1X *Taq* Buffer (Invitrogen), 200 μ M dNTP mix, 1.5 mM MgCl₂ and 0.5 μ M each primer. PCR amplifications were carried out in an Eppendorf thermocycler using an initial denaturation step at 95°C for 2 min; 30 cycles at 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 3 min; followed by a final extension step at 72°C for 3 min. In the second PCR, aliquots of 5 μ L from the first PCR products were used as templates in the subsequent independent reactions (25 μ L) with the group-specific primers and protocols described above. The results were documented after electrophoresis in 1% agarose gels, as previously described.

Results

DNA extraction of environmental samples

The DNA extraction from formation water was performed as described in "Material and Methods" and yielded 1.2 μ g of DNA from 20 mL initial sample volume (data not shown). DNA extraction from oil samples did not yield enough amount of DNA that could be detected using electrophoresis on agarose gels and staining with ethidium bromide. Positive results of DNA extraction were observed on agarose gels when pure cultures were used as positive controls. In spite of that, 5 μ L of the DNA solution obtained from oil samples were used in the first PCR reaction with generic bacterial primers, as described in the text. However, only after the second PCR reaction, 16S rDNA products of the expected size could be clearly visualized on agarose gels (data not shown), confirming the presence of bacterial groups in the environmental samples and the amplifiability of the DNA obtained. It is important to note that PCR reactions without DNA, used as negative controls, did not yield any positive signal of amplification after the second PCR round.

Primer specificity

The Probe Match routine has shown, in general, a good specificity of the primer sets used in this work. The primers pDz1for, pDzrev, pMicfor, pMicrev, pAX-F1, pAX-B1, pBPfor and pBPrev have shown an accurate homology for the target groups, matching a significant number of target

strains, without relevant match with other bacterial groups. In the case of primers pBacF, pBacR and pStrep, we observed that the great majority of matches belonged to the target or closely related groups. Nevertheless, these primers have also matched some “outgroups”, including even other bacterial Phyla. For these three primers, we have used a second specificity test (BLASTN tool), looking only for the full matches to the sequence of each primer. Only the sequences with 100% homology were taken into account, among the 100 sequences recovered from the NCBI database. In all the cases, almost all the sequences recovered belonged to the primer target group, suggesting a great possibility of excluding bacterial outgroups eventually present in the environmental samples by adjustments in the PCR thermal cycling protocol. Thus, in order to set highly reliable PCR conditions, many negative controls were employed in the PCR reactions (see figures for details).

In general, the PCR protocols established in this work were considered highly specific. Reference strains used as positive controls showed clear amplification signals of expected size for all the group-specific primer sets employed in PCR reactions (Figures 4 to 9). No PCR products were observed when genomic DNA from negative controls were used in the PCR specificity tests, except for the strain *Dietzia* sp. CBMAI 705, which exhibited a very faint band of the expected size when *Streptomyces* spp.-specific primers were used (Figure 5, lane 12), and for the strains *Burkholderia cepacia* INCQS 00400, *Bacillus pumilus* CBMAI 638 and *Streptomyces drosdowiczii* CBMAI 498, which showed weak amplification signals of unexpected size when *Achromobacter xylosoxidans*-specific primers were used (Figure 6, lanes 11, 16 and 17, respectively).

Direct detection of degrading bacteria in environmental samples

The group-specific PCR results using genomic DNA from reference strains allowed the subsequent experiments aiming at the investigation of the presence and distribution of potentially hydrocarbon degrading bacteria among the environmental samples. Due to the relatively low yield of DNA obtained with the protocol used, positive amplification results were only achieved with the nested PCR strategy. *Bacillus* spp. and *Streptomyces* spp. were found in all oil samples (Figures 4 and 5, respectively), in spite of the level of oil biodegradation, revealing a broad distribution in the reservoirs under study. *Bacillus* spp. were also found in the formation water sample (data not shown). Amplified products of the expected size were obtained in oil samples from reservoirs 3 and 5 (known as moderately biodegraded and non-biodegraded, respectively; Table 1) when *Achromobacter xylosoxidans*-specific primer set was used (Figure 6). Figure 7 shows the results of specific PCR targeting *Bacillus pumilus*, revealing the presence of these bacteria in non-biodegraded oil samples (reservoirs 1 and 5; Table 1), as well as in a highly biodegraded oil sample (reservoir 4; Table 1). *Micrococcus* spp.-specific PCR products of the expected size were detected in all oil samples under study, except the one derived from oil reservoir 2 (Figure 8). Additionally, these bacteria, together with *Bacillus* spp., were the only target-groups detected in the formation water sample. Specific PCR reactions for the detection of *Dietzia* spp. were carried out with oil samples from reservoirs 4 and 5 (highly biodegraded and non biodegraded, respectively; Table 1) and with the formation water sample. Positive amplification signals indicating the presence of this target group could be observed for both oil samples, but not for the formation water (Figure 9).

Table 4 summarizes the results obtained for each bacterial group, correlating them to the environmental samples where they were found using the protocols established in this work.

Discussion

The culture-independent methodology applied in this work was effective in evaluating the distribution of diverse bacterial groups belonging to the Phyla Actinobacteria, Firmicutes and Proteobacteria in the environmental samples under study.

The nested PCR results indicated that the target bacterial groups may be present in very low abundance in the reservoir environment. Parallel experiments of real time PCR are now being conducted to quantify these potentially degrading bacteria. Low abundance of microorganisms in deep subsurface environments has been reported previously (Parkes et al., 1994).

In this work, *Bacillus* spp. and *Streptomyces* spp. were detected in all crude oil samples collected from five different reservoirs from Pampo platform. These results corroborated previous reports of our research team, which demonstrated the presence of organisms related to *Streptomyces* in highly- and non-biodegraded oils from Campos Basin, and to *Bacillus* in one non-biodegraded oil sample, by using 16S rRNA gene library assembly. This last group was also recovered by culturing techniques from the same oil sample (Sette et al., 2007). These bacterial genera, especially *Bacillus* spp., have been extensively related to petroleum biodegradation in the literature and found in petroleum- and PAHs-contaminated environments (Radwan et al., 1995; Yoshida et al., 2005; Cunha et al., 2006), suggesting a great potential of these bacterial populations to degrade hydrocarbons in the reservoirs and, consequently, alter petroleum characteristics.

The specific detection of *Bacillus pumilus* in oil samples from reservoirs 1, 4 and 5, reinforces the wide distribution of bacteria belonging to *Bacillus* genus in oil fields, in spite of the petroleum biodegradation level. Current culturing experiments using petroleum enrichments in our lab have demonstrated a high frequency of *B. pumilus* isolation from the same environmental samples (unpublished data). Toledo et al. (2006) reported that several *B. pumilus* strains, isolated from solid waste crude oil samples, were able to use aromatic hydrocarbons as the sole carbon and energy source, and remove them at high rates from the culture media. *Bacillus pumilus*, as well as other *Bacillus* species, have been previously isolated from Brazilian reservoirs (Sebastião, 1999).

Achromobacter xylosoxidans were only detected in the petroleum samples from reservoirs 3 and 5, both located at great depths and with temperature between 62 and 85°C (Table 1). Previous work reported the isolation of this species from a highly-biodegraded oil collected from a production well presenting *in situ* temperature of 51°C (Sette et al., 2007). These data may reflect the tolerance of this bacterium to the varying pressure and temperature conditions found in the producing wells of the studied area. Parallel biodegradation assays of our research team revealed that *Achromobacter xylosoxidans* presented the highest degradation rate for cholestane (89%), in addition to the ability to degrade and transform phytane and nonadecanoic acid (Vasconcellos, 2006). This bacterial species has already been isolated from a great variety of petroleum-associated environments, such as refinery effluent treatment plants (Bieszkiewicz et al., 1998), petroleum reservoirs (Sette et al., 2007) and crude oil storage tanks (Yoshida et al., 2005), by using culturing techniques. Diverse literature data have demonstrated that *Achromobacter xylosoxidans* is able to degrade petroleum hydrocarbons, including the mono- and poli-aromatic ones (Andreoni et al., 2004; Viñas et al., 2005; Nielsen et al., 2006).

The target bacteria *Micrococcus* spp. were detected in the petroleum samples from reservoirs 1, 3, 4 and 5. They were also detected in the formation water sample, which corroborates previous reports on the isolation of this genus from formation water samples (Vasconcellos, 2006). Chromatographic analyses carried out by the author demonstrated that the isolated strain of *Micrococcus* sp. was able to degrade isoprenoid (phytane) as well as aromatic (dihydrophenanthrene) hydrocarbons. The detection of the genus *Micrococcus* in oil reservoirs, as well as its biodegradation potential, are reinforced by other literature reports, which have

described these bacteria as efficient hydrocarbon degraders (Torres et al., 2005) and components of microbial communities found in petroleum-associated environments (Brito et al., 2006).

Bacteria belonging to the genus *Dietzia* were detected in the production wells 4 and 5, but not in the formation water sample. On a further test performed in our laboratory, the oil sample from production well 1 has also yielded a positive amplification signal for *Dietzia* spp. (data not shown). The detection and quantification of this bacterial group in the petroleum samples may be of great relevance, since previous results have revealed their excellent ability to degrade petroleum biomarkers, namely phytane, dihydrophenanthrene, nonadecanoic acid and octane (Vasconcellos, 2006). *Dietzia* spp. had also been isolated from petroleum-polluted soils and mangrove sediments, presenting a high potential for hydrocarbon degradation (Chaillan et al., 2004; Brito et al., 2006).

Our results showed that all the PCR-targeted bacterial groups were detected in reservoirs with distinct characteristics, reflecting their ability to grow in diverse environments and tolerance to extreme conditions. The molecular detection of these potentially hydrocarbon degrading bacteria in non-biodegraded oil samples could be explained by the fact that they are present in low abundance in these reservoirs, probably due to the limiting effect of the high pressure and temperature. In this situation, no hydrocarbon catabolism, and consequently no change in oil characteristics, would be prone to occur. Real time PCR-based experiments are in progress in order to quantify the abundance of these microbial groups in such environments.

Nonetheless, all these data gathered together suggests that the bacterial groups detected in the petroleum samples may play an important role in biodegradation processes that take place in reservoirs.

The application of specific PCR-based protocols for the direct detection of hydrocarbon-degrading bacteria may offer a rapid and highly sensitive tool for prediction of oil quality in reservoirs and help to reduce economical losses in oil exploration operations.

Acknowledgements

This work was part of the multidisciplinary project BIOPETRO supported by FINEP (process number 01.04.0550.00) and PETROBRAS. E. Crespim was supported by grants from CNPq (*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*, Brazil). We thank PETROBRAS for the authorization to publish this work.

References

- Adkins, J.P., Cornell, L.A., Tanner, R.S., 1992. Microbial composition of carbonate petroleum reservoir fluids. *Geomicrobiology Journal* 10, 87-97.
- Andreoni, V., Cavalca, L., Rao, M.A., Nocerino, G., Bernasconi, S., Dell'Amico, E., Colombo, M., Gianfreda, L., 2004. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* 57, 401-412.
- Bernard, F.P., Connan, J., Magot, M., 1992. Indigenous microorganisms in cionnate water of many oil fields: a new tool in exploration and production techniques. In: Richardson, T.X. SPE 24811. *Proceedings of the Society of Petroleum Engineers* 2, pp. 467-475.
- Bieszkiewicz, E., Horoch., M., Boszczyk-Maleszak, H., Mycielski, R., 1998. An attempt to use selected strains of bacteria adapted to high concentrations of petroleum oil to increase the

effective removal of petroleum products in excess activated sludge in laboratory conditions. *Acta Microbiologica Polonica* 47, 305–312.

Bonch-Osmolovskaya, E.A., Miroshnichenko, M.L., Lebedinsky, A.V., Chernyh, N.A., Nazina, T.N., Ivoilov, V.S., Belyaev, S.S., Boulygina, E.S., Lysov, Y.P., Perov, A.N., Mirzabekov, A.D., Hippe, H., Stackebrandt, E., L'Haridon, S., Jeanthon, C., 2003. Radioisotopic, culture-based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6143-6151.

Borzenkov, I.A., Milekhina, E.I., Gotoeva, M.T., Rozanova, E.P., Beliaev, S.S., 2006. The properties of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from the oilfields of Tatarstan, Western Siberia, and Vietnam. *Mikrobiologiya* 75, 82-89.

Brito, E.M.S., Guyoneaud, R., Goñi-Urriza, M., Ranchou-Peyruse, A., Verbaere, A., Crapez, M.A.C., Wasserman, J.C.A., Duran, R., 2006. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Research in Microbiology* 157, 752-62.

Chaillan, F., Flèche, A., Bury, E., Phantavong Y., Grimont P., Saliot A., Oudot, J., 2004. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in Microbiology* 155, 587–595.

Connan, J., 1984. Biodegradation of crude oils in reservoirs. In: Brooks, J., Welte, D.H., (Eds.), *Advances in Petroleum Geochemistry*, Academic Press, London, pp. 299–330.

Cord-Ruwich, R., Kleinitz, W., Widdel, F., 1987. Sulphate-reducing bacteria and their activities in oil production. *Journal of Petroleum Technology* 1, 97-106.

Cunha, C.D., Rosado, A.S., Sebastián, G.V., Seldin, L., Weid, I., 2006. Oil biodegradation by *Bacillus* strains isolated from the rock of an oil reservoir located in a deep-water production basin in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, 949-959.

Garbeva, P., van Veen, J.A., van Elsas, J.D., 2003. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microbial Ecology* 45, 302-16.

Grassia, G.S., McLean, K.M., Glénat, P., Bauld, J., Sheehy, A.J., 1996. A systematic survey for thermophilic fermentative bacteria and archaea in high temperature petroleum reservoirs. *FEMS Microbiology Ecology* 21, 47-58.

Guardado, L.R., Gamboa, L.A.P., Lucchesi, C.F., 1989. Petroleum geology of the Campos Basin, Brazil, a model for a producing Atlantic type basin. In: Edwards, J.D., Santogrossi, P.A., (Eds.), *American Association of Petroleum Geologists, Memoir* 48, pp. 3-79.

Guardado, L.R., Spadini, A.R., Brandão, J.S.L., Mello, M.R., 2000. Petroleum system of the Campos Basin, Brazil. In: Mello, M.R., Katz, B.J., (Eds.), *Petroleum Systems of South Atlantic Margins, American Association of Petroleum Geologists, Memoir* 73, Chapter 22: I, pp. 317 – 324.

Head, I.M., Jones, D.M., Larter, S.R., 2003. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature* 426, 344-352.

- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington, E.M., 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3233-3241.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R., 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* 180, 4765-4774.
- Jahnert, R., França, A., Trindade, L.A.F., Quintaes, C., Santos, P., Pessoa, J., Bedregal, R.P., 1998. The petroleum system of Campos Basin. *AAPG Bulletin*, 82, pp. 1883-1884.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Goodfellow, M., Stackebrandt, E., (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, John Wiley and Sons, Chichester, pp. 115-147.
- Liu, L., Coenye, T., Burns, J.L., Whitby, P.W., Stull, T.L., LiPuma, J., 2002. Ribosomal DNA-Directed PCR for identification of *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* recovered from sputum samples from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 1210-1213.
- Magot, M., 1996. Similar bacteria in remote oil fields. *Nature* 379, 681.
- Magot, M., Ollivier, B., Patel, B.K.C., 2000. Microbiology of Petroleum Reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek* 77, 103-116.
- Mello, M.R., Gaglianone, P.C., Brassell, S.C., Maxwell, J.R., 1988. Geochemical and biological marker assessment of depositional environments using Brazilian offshore oils. *Marine and Petroleum Geology* 5, 205-223.
- Mohriak, W.U., Mello, M.R., Karner, G.D., Dewey, J.F., Maxwell, J.R., 1989. Structural and stratigraphic evolution of the Campos Basin, Offshore Brazil. In: *Extensional Tectonics and Stratigraphy of North Atlantic Margins*, American Association of Petroleum Geologists, Memoir 46, chapter 38, pp. 577-598.
- Muyzer, G., Hottentrager, S., Teske, A., Wawer, C., 1995. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA - a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D., de Bruijn, F.J., (Eds.), *Molecular microbial ecology manual*, section 3.4.4, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-23. Kluwer Academic Publishers.
- Nazina, T.N., Ivanova, A.E., Mityushina, L.L., Belyaev, S.S., 1993. Thermophilic hydrocarbon-oxidizing bacteria in oil strata. *Microbiology (English Translation)* 62, 359-365.
- Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., Lysenko, A.M., Petrunyaka, V.V., Osipov, G.A., Belyaev, S.S., Ivanov, M.V., 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 433-446.

Nielsen, D.R., McLellan, P.J., Daugulis, A.J., 2006. Direct estimation of the oxygen requirements of *Achromobacter xylosoxidans* for aerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons (BTEX) in abioscrubber. *Biotechnology Letters* 28, 1293-1298.

Orphan, V.J., Taylor, L.T., Hafenbradl, D., Delong, E.F., 2000. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblage associated with high temperature petroleum reservoirs. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 700-711.

Pace, N.R., 1996. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News* 62, 463-470.

Parkes, R.J., Cragg, B.A., Bale, S.J., Getliff, J.M., Goodman, K.P., Rochelle, A., Fry, J.C., Weightman, A.J., Harvey, S.M., 1994. Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments. *Nature* 371, 410-413.

Peters, K.E., Moldowan, J.M., 1993. *The Biomarkers Guide*. Prentice-Hall, New York, pp. 363.

Pitcher, D.G., Saunders, N.A., Owen, R.J., 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology* 8, 151-156.

Pospiech, A., Neumann, B., 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends in Genetics* 11, 217-218.

Radwan, S.S., Sorkhoh, N.A., Fardoun, F., Al-Hasan, R.H., 1995. Soil management enhancing hydrocarbon biodegradation in the polluted Kuwaiti desert. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44, 265-270.

Rappé, M.S., Giovannoni, S.J., 2003. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology* 57, 369-394.

Roberts, M.A., Crawford, D.L., 2000. Use of Randomly Amplified Polymorphic DNA as a means of developing genus- and strain-specific *Streptomyces* DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2555-2564.

Sebastião, G.V., 1999. Avaliação da população bacteriana presente em um reservatório de petróleo situado em águas profundas brasileiras, com ênfase no isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus*, Msc thesis, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Sette, L.D., Simioni, K.C.M., Vasconcelos, S.P., Dussán, L.J., Marsaioli, A.J., Santos-Neto, E.V., Oliveira, V.M., 2007. Analysis of composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Antonie van Leeuwenhoek* 91, 253-266.

Tanaka, Y., Sogabe, M., Okumura, K., Kurane, R., 2002. A highly selective direct method of detecting sulphate-reducing bacteria in crude oil. *Letters in Applied Microbiology* 35, 242-246.

Telang, A.J., Ebert, S., Foght, J.M., Westlake, D., Jenneman, G.E., Gevertz, D., Voordouw, G., 1997. Effect of Nitrate Injection on the Microbial Community in an Oil Field as Monitored by Reverse Sample Genome Probing. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1785-1793.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24, 4876-4882.

Toledo, F.L., Calvo, C., Rodelas, B., González-López, J., 2006. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 244-252.

Torres, L.G., Rojas, N., Bautista, G., Iturbe R., 2005. Effect of temperature, and surfactant's HLB and dose over the TPH-diesel biodegradation process in aged soils. *Process Biochemistry* 40, 3296-3302.

Trindade, L.A.F., Dias, J.L., Mello, M.R., 1994. Sedimentological and geochemical characterization of the Lagoa Feia Formation, rift phase of the Campos Basin, Brazil. In: Katz, B.J., (Ed.), *Petroleum Source Rocks*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 149-165.

Vasconcellos, S.P., 2006. Atividades Enzimáticas e de Biodegradação de Microrganismos do Petróleo da Bacia de Campos (Pampo Sul), PhD Thesis, Campinas State University, Campinas, Brazil.

Vinãs, M., Sabaté, J., Espuny, M.J., Solanas, A.M., 2005. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 7008-7018.

Voordouw, G., Armstrong, S.M., Reimer, M.F., Fouts, B., Telang, A.J., Shen, Y., Gevertz, D., 1996. Characterization of 16S rRNA genes from oil field microbial communities indicates the presence of a variety of Sulfate-Reducing, Fermentative, and Sulfide-Oxidizing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1623-1629.

Yoshida, N., Yagi, K., Sato, D., Watanabe, N., Kuroishi, T., Nishimoto, K., Yanagida, A., Katsuragi, T., Kanagawa, T., Kurane, R., Tani, Y., 2005. Bacterial Communities in Petroleum Oil in Stockpiles. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99, 143-149.

Young, A., Blakesley, R., 1991. Sequencing plasmids from single colonies with the dsDNA cycle sequencing system. *Focus* 13, 13.

Zvyagintseva, I.S., Beliaev, S.S., Borzenkov, I.A., Kostrikina, N.A., Milekhina, E.I., Ivanov, M.V., 1995. Halophilic archaeobacteria from the Kalamkass oilfield. *Mikrobiologiya* 64, 83-87.

Figures

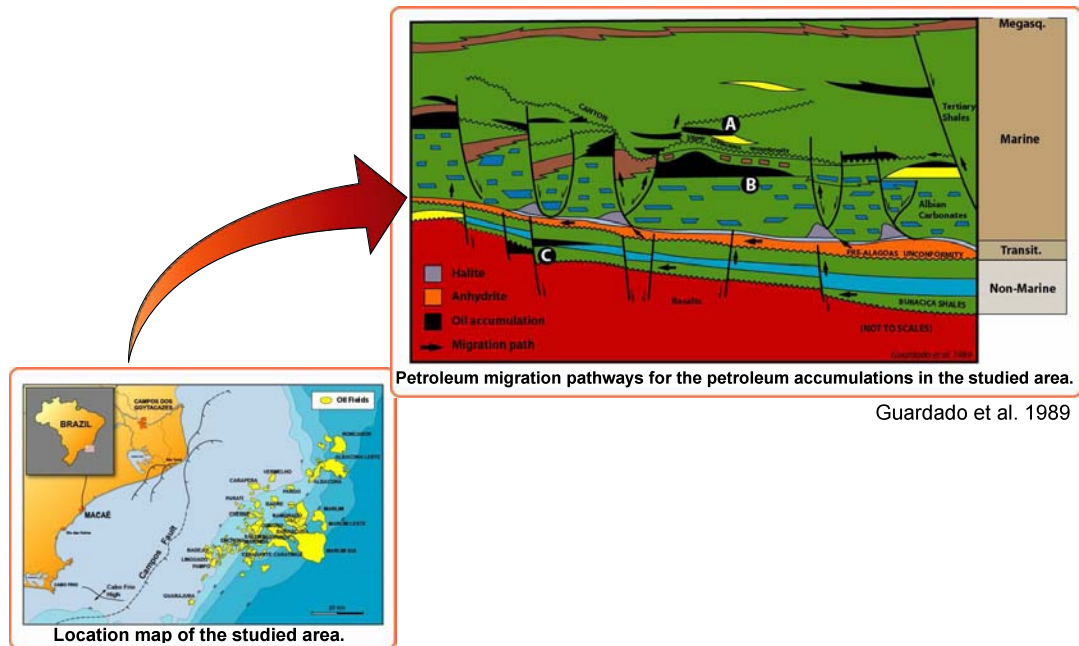


Figure 1. Location map of the Campos Basin and schematic geologic section with indication of the three main reservoir intervals. Oil samples were collected in the interval A (Carapebus Formation, samples 3 and 4), in the interval B (Macaé Formation, samples 1 and 2), and in the interval C (Lagoa Feia Formation, sample 5).

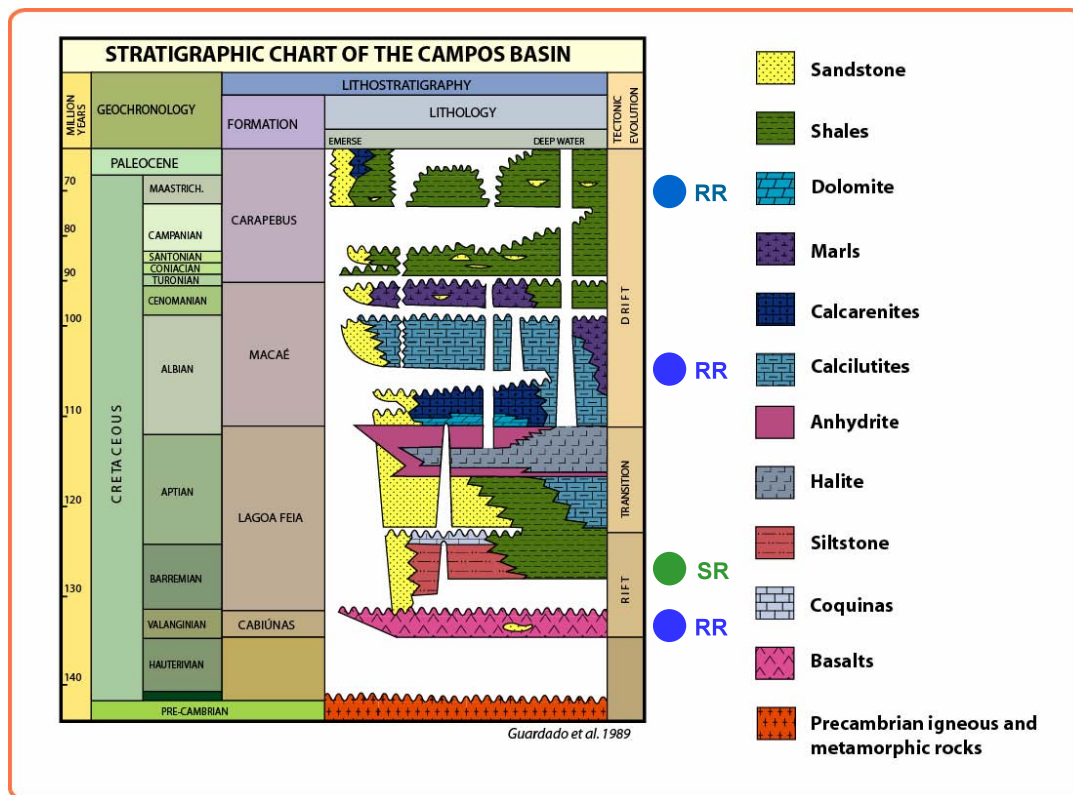


Figure 2. Stratigraphic chart of the Campos Basin. Blue dots (RR) and the green dot (SR) indicate the stratigraphic intervals that reservoir rocks and source rocks are found, respectively.

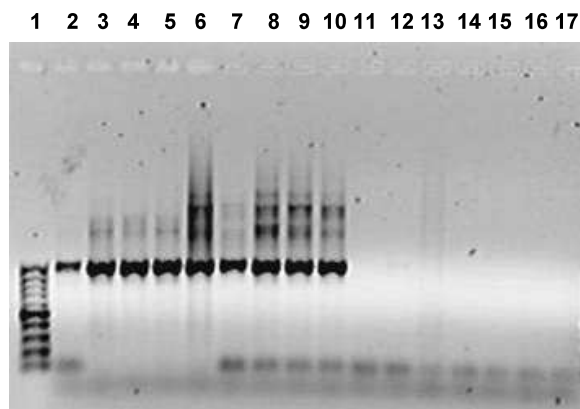


Figure 4. Electrophoresis of PCR products amplified from oil samples using the *Bacillus*-specific primer sets. Lanes: **1**, DNA molecular marker (*100 bp DNA ladder*, Fermentas); **2 to 5**, bacterial strains used as positive controls, respectively: *Bacillus pumilus* CBMAI 639, *Bacillus* sp. CBMAI 637, *Bacillus pumilus* CBMAI 638 and *Bacillus licheniformis* INCQS 107; **6 to 10**, oil samples from production wells 1 to 5, respectively; **11 to 16**, bacterial strains used as negative controls, respectively: *Paenibacillus polymyxa* INCQS 00203, *Alicyclobacillus acidoterrestris* CBMAI 244, *Burkholderia cepacia* INCQS 00400, *Rhizobium radiobacter* IBSBF 1874, *Escherichia coli* INCQS 00310 and *Streptomyces drosdowiczii* CBMAI 498; **17**, PCR control without DNA.

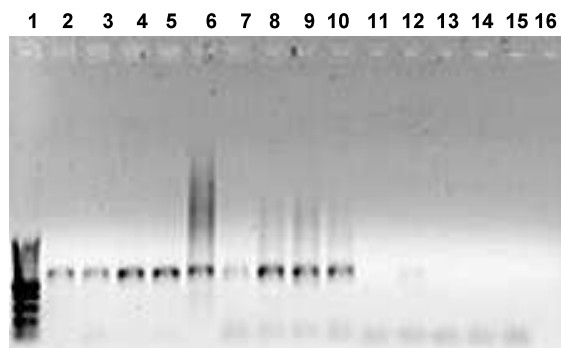


Figure 5. PCR using *Streptomyces*-specific primer sets. Lanes: **1**, DNA molecular marker (*100 bp DNA ladder*, Fermentas); **2 to 5**, positive controls, namely: *Streptomyces venezuelae* DSM 40230, *S. griseocarneum* UFPEDA 3001, *S. somaliensis* UFPEDA 3160 and *S.drosdowiczii* CBMAI 498; **6 to 10**, oil samples from production wells 1 to 5, respectively; **11 to 15**, negative controls, namely: *Micrococcus luteus* INCQS 356, *Dietzia* sp. CBMAI 705, *Burkholderia cepacia* INCQS 00400, *Rhizobium radiobacter* IBSBF 1874 and *Escherichia coli* INCQS 00310; **16**, PCR control without DNA.

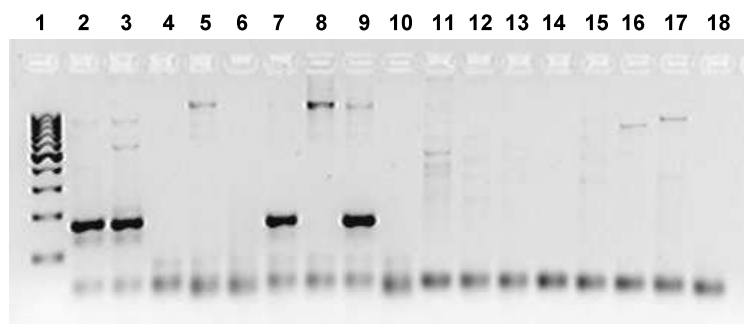


Figure 6. PCR using the primer sets specific for *Achromobacter xylosoxidans*. Lanes: **1**, molecular marker (100 bp DNA ladder, Fermentas); **2** and **3**, strains used as positive controls, namely: *Achromobacter denitrificans* INCQS 108 and *A. xylosoxidans* CBMAI 709; **4** to **9**, DNA from the environmental samples, respectively: formation water, production wells 1 to 5; **10**, reamplification of the generic PCR control (without DNA); **11** to **17**, negative controls, namely: *Burkholderia cepacia* INCQS 00400, *Methylobacterium extorquens* DSM 1337, *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* INCQS 00205, *Stenotrophomonas maltophilia* CBMAI 317, *Stenotrophomonas maltophilia* CBMAI 471, *Bacillus pumilus* CBMAI 638 and *Streptomyces drosdowiczii* CBMAI 498; **18**, PCR control without DNA.

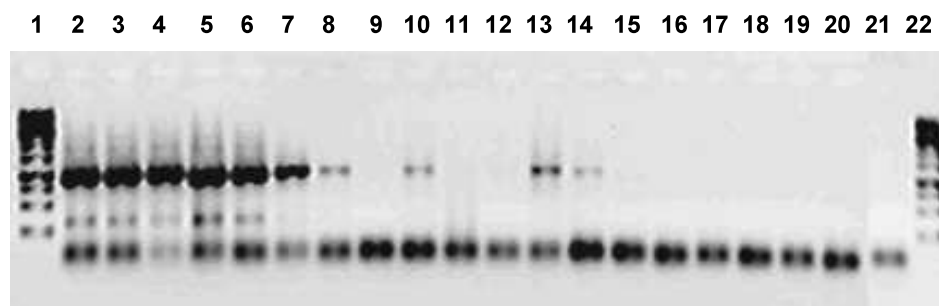


Figure 7. PCR for the specific detection of *Bacillus pumilus*. Lanes: **1** and **22**, molecular marker (1 kb DNA ladder); **2** to **8**, positive controls, respectively: *Bacillus pumilus* strains isolated in our laboratory (lanes 2 to 6), *B. pumilus* CBMAI 638 and *B. pumilus* CBMAI 639; **9** to **14**, DNA from the environmental samples, respectively: formation water, production wells 1 to 5; **15**, reamplification of the universal PCR control (without DNA); **16** to **20**, negative controls, namely: *Bacillus licheniformis* INCQS 107, *Burkholderia cepacia* INCQS 00400, *Rhizobium radiobacter* IBSBF 1874, *Escherichia coli* INCQS 00310 and *Streptomyces drosdowiczii* CBMAI 498; **21**, PCR control without DNA.

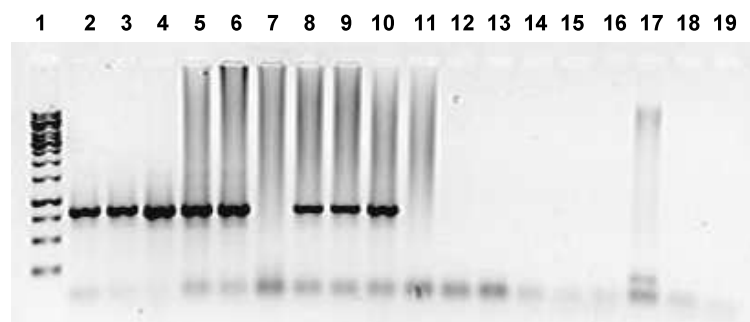


Figure 8. PCR using *Micrococcus*-specific primer sets. Lanes: **1**, molecular marker (1 kb DNA ladder, Fermentas); **2 to 4**, positive amplification controls, respectively: *Micrococcus luteus* INCQS 356, *Micrococcus luteus* DSM 20030 and *Micrococcus* spp. CBMAI 636; **5 to 10**, DNA from the environmental samples, respectively: formation water, oil from production wells 1 to 5; **11**, reamplification of the general PCR control (without DNA); **12 to 18**, negative controls, namely: *Dietzia maris* DSM 44747, *Rhodococcus erythropolis* DSM 43066, *Streptomyces drosdowiczii* CBMAI 498, *Bacillus licheniformis* INCQS 107, *Rhizobium radiobacter* IBSBF 1874, *Burkholderia cepacia* INCQS 00400 and *Escherichia coli* INCQS 00310; **19**, PCR control without DNA.

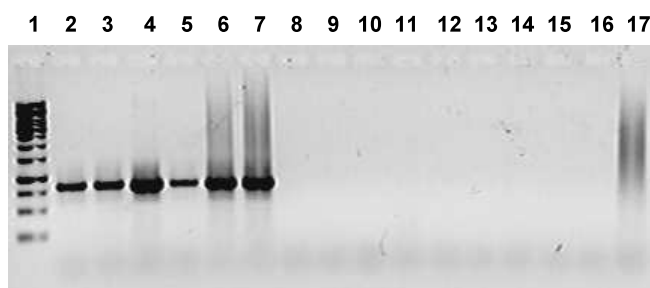


Figure 9. PCR using *Dietzia*-specific primer sets. Lanes: **1**, molecular marker (1 kb DNA ladder, Fermentas); **2 to 5**, positive amplification controls, respectively: *Dietzia* sp. CBMAI 705, *D. maris* DSM 43672, *D. maris* DSM 44747 and *D. natronolimnaea* DSM 44860; **6 to 8**, DNA from the environmental samples, respectively: oil from production wells 4 and 5, formation water; **9 to 15**, negative controls, namely: *Micrococcus luteus* INCQS 356, *Rhodococcus erythropolis* DSM 43066, *Streptomyces drosdowiczii* CBMAI 498, *Bacillus licheniformis* INCQS 107, *Rhizobium radiobacter* IBSBF 1874, *Burkholderia cepacia* INCQS 00400 and *Escherichia coli* INCQS 00310; **16**, PCR control without DNA; **17**, reamplification of the universal PCR control (without DNA).

Tables

Table 1. Characteristics of the petroleum reservoirs and geochemical properties of oil samples.

Well	Biodegradation ranking*	T°C	Depth (m)	Diagnostic features of source, biodegradation and thermal maturity of oils							
				HOP/STER	21/23 TRI	26/25TRI	TET/26 TRI	%SAT	NOR25/H30	$\alpha\beta\beta$	Ts/Ts+Tm
1	Non biodegraded/ Light (0-1)	82°C	2405-2588	13.72	0.97	1.30	0.39	46.6	0.05	0.43	0.20
2	Moderate/ Heavy (5-6)	71°C	1988-2222	10.62	0.97	1.18	0.41	45.7	0.05	0.46	0.30
3	Light/ Moderate (3-4)	62°C	3023	9.95	0.92	1.20	0.39	50.3	0.04	0.49	0.29
4	Heavy (6)	62°C	2066	5.30	0.93	1.19	0.41	36.7	0.88	0.43	0.39
5	Non biodegraded/ Light (0-1)	85°C	3070-3240	11.17	0.97	1.23	0.44	62.7	0.04	0.43	0.37

*Peters and Moldowan, 1993.

Source: GC/MS m/z 191 and 217 - HOP/STER, hopane/sterane ratio, GC/MS m/z 191 - 21/23TRI, C₂₁ tricyclic terpane/C₂₃ tricyclic terpane, 26/25TRI, C₂₆ tricyclic terpane /C₂₅ tricyclic terpane, TET/26TRI, C₂₄ tetracyclic terpane /C₂₆ tricyclic.

Biodegradation: GC/MS m/z 191 - NOR25/H30, C₂₉ 25-nor-17 α (H) hopane/C₃₀ 17 α ,21 β (H) hopane; %SAT - % of saturated hydrocarbons from MPLC.

Thermal maturity: GC/MS m/z 191 - Ts/Ts+Tm, C₂₇ 18 α (H)-trisnorhopane/ C₂₇ 18 α (H)-trisnorhopane + C₂₇ 17 α (H)-trisnorhopane, GC/MS 217 – $\alpha\beta\beta$ stands for $\alpha\beta\beta/\alpha\alpha\alpha+\alpha\beta\beta$ ratio, C₂₉ 5 α (H),14 β (H),17 β (H), 20R+S 24-ethylcholestane/C₂₉ 5 α (H),14 β (H),17 β (H), 20R+S 24-ethylcholestane + C₂₉ 5 α (H),14 α (H),17 α (H), 20R+S 24-ethylcholestane.

Table 2. Primer sets used in this study.

Target groups	Primer name and sequence (5' - 3')	Position	Expected size (bp)	References
<i>Bacillus</i> spp.	pBacF (GGGAAACCGGGGCTAATACCGGAT)	122 to 145 ^a	1214	Garbeva et al., 2003
	pBacR (GTCACCTTAGAGTGCCC)	1320 to 1336 ^a		
<i>Streptomyces</i> spp.	pCLF-4 (AGACACGGCCCAGACTCCTA)	283 to 302 ^b	869 bp	Roberts and Crawford, 2000
	pStrep (GCGTCGAATTAAGCCACA)	1135 to 1152 ^b		
<i>Dietzia</i> spp.	pDz1for (CTCCTGCCGCATGGTGGGGGTTGGAA)	174 to 199 ^c	1086 bp	This work
	pDzrev (ACGACATCTCTGCCGTCGTCTGTATA)	1234 to 1260 ^c		
<i>Micrococcus</i> spp.	pMicfor (ATAGGAGCGYCYACCGCATGGT)	92 to 115 ^d	1165 bp	This work
	pMicrev (CCGTATCTCTACGGCGATCGAGAACAT)	1231 to 1257 ^d		
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	pAX-F1 (GCAGGAAAGAAACGTCGCGGGT)	427 to 448 ^e	168 bp	Liu et al., 2002
	pAX-B1 (ATTTACATCTTTCTTTCCG)	576 to 595 ^e		
<i>Bacillus pumilus</i>	pBPfor (CATGGTTCAAGGATGAAAGACGG)	160 to 182 ^a	1136 bp	This work
	pBPprev (GGCTAAACCTTGCGGTCTCGC)	1275 to 1296 ^a		
Domain Bacteria	p10f (GAGTTTGATCCTGGCTCAG)	317 to 335 ^f		Lane, 1991
	p27f (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG)	316 to 335 ^f		Lane, 1991
	p1100r (AGGGTTGGGGTGGTTG)	1165 to 1180 ^f		Lane, 1991
	pL1401r (CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG)	1162 to 1186 ^f		Heuer et al., 1997

^a: position relative to the 16S rDNA of *Bacillus pumilus* (Genbank access number EU311212); ^b: position relative to the 16S rDNA of *Streptomyces venezuelae* (Genbank access number EU124779); ^c: position relative to the 16S rDNA of *Dietzia natronolimnaea* (Genbank access number DQ821754); ^d: position relative to the 16S rDNA of *Micrococcus luteus* (Genbank access number EU240406); ^e: position relative to the 16S rDNA of *Achromobacter xylosoxidans* (Genbank access number AF411019); ^f: position relative to the 16S rDNA of *Escherichia coli* (Genbank access number AB269763).

Table 3. Summary of the specific detection results in the environmental samples using the nested PCR strategy and group-specific primer sets.

Target \ Sample	Formation water	Reservoir 1	Reservoir 2	Reservoir 3	Reservoir 4	Reservoir 5
<i>Bacillus</i> spp.	+	+	+	+	+	+
<i>Streptomyces</i> spp.	-	+	+	+	+	+
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	-	-	-	+	-	+
<i>Bacillus pumilus</i>	-	+	-	-	+	+
<i>Micrococcus</i> spp.	+	+	-	+	+	+
<i>Dietzia</i> spp.	-	+	ND	ND	+	+

(ND): not determined; (+): presence; (-): not detected with the methodology used.

To be submitted to the Journal: *Letters in Applied Microbiology* (impact: 1.593).

Molecular analysis of *Bacillus* diversity in a highly biodegraded oil sample from a Brazilian reservoir

E. Crespim¹, C. C. Silva¹, E. V. Santos Neto² and V. M. Oliveira¹

¹Microbial Resources Division, CPQBA/UNICAMP, CP. 6171, Campinas, SP, Brazil.

²PETROBRAS R&D Center, Cidade Universitária, Quadra 7, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, CEP 21949-900, Brazil.

E. CRESPIM, C. C. SILVA, E. V. SANTOS NETO AND V. M. OLIVEIRA

Aims: The aim of this work was to evaluate the phylogenetic diversity of bacteria belonging to the genus *Bacillus* in a highly biodegraded petroleum sample through a cultivation-independent approach.

Methods: After direct DNA extraction from environmental samples, 16S rRNA gene fragments were amplified with *Bacillus*-specific primers and used for the assembly of a genomic library. Environmental clones were screened by the ARDRA technique followed by subsequent sequencing and phylogenetic analysis.

Results: 16S rRNA gene sequence analysis of clones revealed the presence of different *Bacillus* species, named *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. circulans* and *B. megaterium*/*B. flexus* in the samples.

Impact of study: We have detected an unexpected high diversity of *Bacillus* species in the biodegraded oil sample, suggesting their tolerance to *in situ* extreme conditions and a possible role in the biogeochemical processes that occur in the petroleum reservoir.

INTRODUCTION

Many microorganisms are involved in petroleum biodeterioration (Austin *et al.*, 1977; Radwan *et al.*, 1998), leading to a significant reduction of its commercial value, biocorrosion of equipments and pipelines or production of undesired compounds, such as polymers, gums, organic acids and H₂S, which may alter petroleum characteristics relevant for subsequent refining operations (Magot *et al.*, 2000).

Despite the huge economical potential of the global reservoir of organic carbon, the microbial ecology of oil fields remains poorly studied. The mechanisms involved in oil biodegradation processes in these environments are still not well-known, nor is the involvement of microorganisms or the catabolic pathways used (Röling *et al.*, 2003).

Several *Bacillus* species have been identified as being involved in crude oil degradation. Felix and Cooney (1971) reported that spore-forming bacteria, in general, have an important role in oil biodegradation, and oil degrading *Bacillus* strains have been isolated from a number of oil or PAHs-polluted sites, with the ability to grow and efficiently use hydrocarbons such as naphthalene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene (Calvo *et al.* 2004; Radwan *et al.*, 1998; Toledo *et al.*, 2006; Zhuang *et al.* 2003). They consist of large, rod-shaped, aerobic, endospore-forming, Gram-positive bacteria, present in a wide variety of environments (Margulis *et al.*, 1998). Recent publications have already detected, by means of molecular methods or culturing techniques, *Bacillus* spp. in petroleum reservoirs (Cunha *et al.*, 2006; Sebastián, 1999; Vasconcellos, 2006; Sette *et al.*, 2007), suggesting they may be common inhabitants of petroleum-related environments.

It is common sense that pure cultures still remain essential for the study of the physiology of microorganisms from diverse environments; however, enrichment techniques are well-known to underestimate the bacterial diversity within natural ecosystems (Hugenholtz *et al.*, 1998; Pace 1996). In addition, the structural and functional diversity of prokaryotes in the deep biosphere have been primarily affected by the poor culturability of these microorganisms.

In that sense, traditional culturing methods have been complemented by culture-independent approaches based on molecular biology techniques, rendering a broader perspective of the microbial diversity in natural environments.

Here we report on the diversity analysis of *Bacillus* species in a highly biodegraded oil sample collected from an offshore Brazilian reservoir, using a molecular approach based on group-specific PCR of 16S rRNA gene fragments, followed by cloning, sequencing and phylogenetic analysis. This work was stimulated by previous findings of our research team of the frequent occurrence of this bacterial group in the oil samples from deep reservoirs of Pampo platform in Campos Basin (RJ, Brazil) (Crespim *et al.*, submitted; Sette *et al.*, 2007; Vasconcellos, 2006).

MATERIALS AND METHODS

Sampling

The sample was collected in July 2005, from a production well at Pampo Platform, Campos Basin (Macaé, RJ, Brazil), with logistic support of CENPES/Petrobras. The geological and geochemical background of Campos Basin is in accordance with Crespim *et al.* (submitted).

The oil was characterized as highly biodegraded, originated from a 2066 m-deep reservoir, with *in situ* temperature of 62°C.

The sample was collected in triplicate using 500 mL sterilized Schott bottles, which were completely filled with the sample in order to prevent oxygen influx. The samples were kept on ice during transportation to the laboratory, and stored at room temperature for further DNA extraction.

DNA extraction

DNA extraction was carried out directly from the crude oil using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), based on the protocol proposed by Tanaka *et al.* (2002).

Minor modifications were introduced to the protocol before purification with the kit, as follows. Two grams of oil were mixed with two volumes of glass beads (0.1 mm diameter, Sigma) and 6 volumes of ASL buffer (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). After heating the mixture at 70°C for 5 minutes, six replicates of 2 mL were transferred to microtubes and homogenized with a mini bead-beater (Biospec) at 3800 rpm for 1 min, followed by another incubation at 70°C for 5 min. The tubes were vortexed for 15 s and centrifuged at 17000 *g* for 1 min. Aliquots of 1.2 mL of the supernatant were transferred to a clean microtube and then purified with the QIAamp DNA Stool Mini Kit, according to the manufacturer's instructions. At the end of the protocol, the DNA recovered from the six replicates was concentrated in a single tube by vacuum centrifugation (Eppendorf concentrator 5301) to a final volume of 40 μ L.

DNA yield and integrity were confirmed through electrophoresis in 1% agarose gel stained with ethidium bromide (0.1 μ g/mL) and documented using the equipment UVP BioImaging System GDS-8000 (UVP, Upland, CA, USA).

Primer sets and amplification conditions

In order to improve the sensitivity of detection of DNA molecules in the crude oil sample, the nested PCR strategy was employed to obtain *Bacillus*-specific 16S rDNA fragments. The primer set p27f (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3', Lane, 1991) and pL1401r (5' CCGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG 3', Heuer *et al.*, 1997), which targeted conserved regions flanking the 16S rRNA gene of the Domain Bacteria, was used in the first PCR reaction. The product of this first PCR was used as template in the second PCR reaction with the specific primers pBacF (5' GGGAAACCGGGGCTAATACCGGAT 3') and pBacR (5' GTCACCTTAGAGTGCCC 3'), described by Garbeva *et al.* (2003) for the detection of *Bacillus* and correlated genera.

The first PCR was performed in 25- μ L reactions containing 5 μ L of environmental DNA solution, 2 U *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), 1X *Taq* Buffer (Invitrogen), 200 μ M dNTP mix, 1.5 mM

MgCl₂ and 0.5 µM each primer. PCR amplifications were carried out in an Eppendorf thermocycler using an initial denaturation step at 95°C for 2 min; 30 cycles at 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 3 min; followed by a final extension step at 72°C for 3 min. In the second PCR, aliquots of 5 µL from the first PCR products were used as templates in a 25 µL-reaction using the *Bacillus*-specific primers and amplification conditions previously established by Crespin *et al.* (submitted), where the authors showed the high specificity of the PCR system by using a range of bacterial strains as positive and negative controls. The results were documented after electrophoresis in 1% agarose gels, as previously described.

Cloning and ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)

Amplification products of the *Bacillus*-specific nested PCR, using total DNA obtained from the crude oil sample, were submitted to electrophoresis in agarose gel and the band of the expected size corresponding to the target fragment was excised. DNA was purified using *GFXTM PCR-DNA and gel band purification kit* (GE Healthcare), ligated into the pGEM-T cloning vector kit and transformed in *Escherichia coli* DH5α competent cells, according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, Wisc.). White colonies were selected and screened for the presence of insert by means of PCR amplification using the vector-based primers M13 forward and reverse. Insert-containing clones were submitted to Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) by digestion with the enzymes *Hae*III, *Msp*I and *Alu*I (GE Healthcare), in independent reactions, at 37°C for 2 h. The fragments were separated by electrophoresis in 2.5% agarose gels stained with ethidium bromide and the different restriction profiles (ribotypes) were defined by a combination of the banding patterns obtained with the three enzymes. One clone representative of each distinct ribotype was selected for DNA sequencing and phylogenetic affiliation.

Sequencing and Phylogenetic analysis

PCR products from clones, obtained via amplification using the primers M13 forward and reverse, were purified with the *GFX PCR-DNA and gel band purification kit* (GE Healthcare) and directly submitted to sequencing. The 16S rRNA gene sequences were determined by using the internal primers 782r (Chun, 1995), 1100r and 10f (Lane, 1991) and the DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for the automated MegaBace 500 system (GE Healthcare), according to the manufacturer's recommendations. Partial 16S rRNA gene sequences obtained from clones were assembled in a contiguous sequence using the phred/Phrap/CONSED program (Ewing *et al.*, 1998; Godon *et al.*, 1997). Identification was achieved by comparing the contiguous 16S rRNA gene sequences (~600 bp in length) from clones with 16S rRNA sequence data from reference and type strains available at the public databases Genbank ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) and RDP (Ribosomal Database Project, Wiscosin, USA, <http://www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html>), by using the BLASTN and RDP sequence match routines. The sequences were aligned using the CLUSTAL X program (Thompson *et al.* 1997) and analyzed using the software MEGA v. 2 (Kumar *et al.*, 2001). Evolutionary distances were derived from sequence-pair dissimilarities using Kimura 2P substitution model (Kimura, 1980). The phylogenetic reconstruction was done using the neighbor-joining (NJ) algorithm, with bootstrap values calculated from 1,000 replicate runs, using the routines included in the MEGA software.

Nucleotide sequence accession numbers

The nucleotide sequences determined in this study for the environmental clones were deposited at the Genbank database under the accession numbers: from EU436125 to EU436139 (Figure 2).

RESULTS AND DISCUSSION

DNA extraction from the oil sample did not yield enough amount of DNA that could be detected using electrophoresis on agarose gel and staining with ethidium bromide, as expected (Crespim *et al.*, submitted). However, the nested PCR approach used generated a clear positive amplification signal, corresponding to the 16S rDNA products of the expected size (data not shown), and confirmed the presence of *Bacillus* spp. in the environmental samples and the amplifiability of the DNA obtained.

Forty clones were analyzed by ARDRA, in order to detect ribotypes representing potentially different taxonomic groups. After electrophoresis, 22 distinct ribotypes were observed based on the combined data of the restriction enzymes *MspI*, *AluI* and *HaeIII* (example given in Figure 1).

BLASTN analysis of the 16S rDNA clone sequences revealed that 16 ribotypes were affiliated to the Phylum Firmicutes, Class Bacillaceae, as expected, whereas six clones were affiliated to the Class δ -proteobacteria, Order Desulfovibrionales, suggesting some lack of specificity of the primers used. The primers pBacF and pBacR were designed by Garbeva *et al.* (2003) for the detection of *Bacillus* spp. and correlated taxa in soils, and, although the authors have tested the application of their primer set for a great number of bacteria, no sulphate-reducers were used as negative controls. Therefore, one should be aware that the stringency of PCR amplification conditions must be improved when using this primer set in further studies focusing on complex mixtures of environmental DNA where members of the order Desulfovibrionales may be present.

The phylogenetic analysis of the 16S rDNA partial sequences obtained revealed the presence of bacteria affiliated to the species *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. circulans* and to the *B. megaterium*/*B. flexus* group (Figure 2). One of the ribotypes, not shown in Figure 2, was sequenced separately and analyzed with BLASTN as *Bacillus pumilus*.

The species *B. subtilis* was the most abundant one found in the highly biodegraded oil studied. A great number of studies have already reported the presence of *B. subtilis* in a variety of PAHs-contaminated environments. Toledo *et al.* (2006), for instance, have characterized a high

percentage of *Bacillus* strains able to grow in the presence of PAHs, correlating this fact with the property of these microorganisms to colonize hydrocarbon-contaminated environments. *B. subtilis* and *B. pumilus* were among the selected strains that presented a considerable effective PAH utilization.

B. subtilis was also recovered from a highly biodegraded oil sample using a cultivation-based approach by Sette *et al.* (2007). Interestingly, when the authors used, for the same crude oil sample, a cultivation-independent approach based on cloning, ARDRA analysis and sequencing, they have found a *Bacillus*-like clone, but more closely related to *B. sporothermodurans*, thus demonstrating the well-known discrepancy between characterizations of bacterial communities achieved when using different approaches.

Another study (Johnson and Hill, 2003) reported a *Bacillus* strain isolated from Mermaid Reef (Australia) capable of degrading the total hydrocarbon source of a PAH stock mixture composed of 2-methylnaphthalene, phenanthrene, pyrene, dibenzothiophene, fluorene, carbazole, and fluoranthrene. This strain showed 94% sequence similarity to *Bacillus oleonius* (GenBank accession number X82492) and 93% to a marine strain of *Bacillus subtilis* with the ability to take up cadmium.

Other *Bacillus* species found in the present work have already been described in the literature as occurring in petroleum-related environments. Vasconcellos (2006), working with aerobic enrichment culturing, has reported the recovery of several *B. pumilus* and *B. megaterium* strains from formation water samples and a *B. subtilis* strain from a petroleum sample. Additionally, *B. subtilis*, *B. firmus* and *B. licheniformis* were isolated from a Brazilian reservoir and tested for their ability to produce antimicrobial substances, in a work conducted by Korenblum *et al.* (2005). The authors have even suggested a potential use of these bacteria as biocides in the petroleum industry for controlling problems associated with sulphate-reducing bacteria.

Zhuang *et al.* (2003), searching for relatively fast-growing naphthalene-degrading bacteria from oil-contaminated tropical marine sediments, have found a *B. naphthovorans* strain. This strain,

together with a *Staphylococcus* sp. and a *Micrococcus* sp. – all of them Gram-positive – were the most abundant microorganisms in their enrichment culture. The authors emphasize that this predominance of Gram-positive bacteria is not surprising, once they have a stronger cell envelope than the Gram-negative, which allows them to thrive in hostile environments. This may also be true for the *Bacillus* strains we have found in this work, which were detected in an oil sample originated from a petroleum reservoir bearing high values of depth, temperature and pressure.

Based on a recent publication (Cunha *et al.*, 2006), the diversity of *Bacillus* spp. verified in our study may be considered high, as five different taxonomic groups were detected in such an extreme environment, characterized by high pressure and temperature values, not to mention the low oxygen concentration. In addition, as far as we know, this was the first report of *B. circulans* in oil samples originated from petroleum reservoirs.

ACKNOWLEDGEMENTS

This Project was supported by FINEP and PETROBRAS. Elaine Crespim was supported by grants from CNPq (*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*, Brazil). We thank PETROBRAS for the authorization to publish this work.

REFERENCES

- Austin, B.; Calomiris, J.J.; Walker, J.D.; Colwell, R.R., 1977. Numerical Taxonomy and Ecology of Petroleum-Degrading Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **34** (1), 60-68.
- Calvo C.; Toledo, F.L.; Gonzalez-Lopez, J., 2004. Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. *Journal of Biotechnology* **109**, 255–262.
- Chun, J., 1995. Computer-Assisted Classification and Identification of Actinomycetes. PhD Thesis, University of Newcastle upon Tyne (UK).
- Crespim, E.; Santos-Neto, E.V.; Oliveira, V.M. Cultivation-independent detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. (Submitted).
- Cunha, C.D.; Rosado, A.S.; Sebastián, G.V.; Seldin, L.; Weid, I., 2006. Oil biodegradation by *Bacillus* strains isolated from the rock of an oil reservoir located in a deep-water production basin in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology* DOI 10.1007/s00253-006-0531-2.
- Ewing, B.; Hillier, L.; Wendl, M.; Green, P., 1998. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* **8**, 175–185.
- Felix, J.A.; Cooney, J.J., 1971. Response of spores and vegetative cells of *Bacillus* spp. in a hydrocarbon–water system. *Journal of Applied Bacteriology* **34**, 411–416.
- Garbeva, P.; van Veen, J.A.; van Elsas, J.D., 2003. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microbial Ecology* **45**, 302-16.
- Godon, J.J.; Zumstein, E.; Dabert, P.; Habouzit, F.; Moletta, R., 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 2802-2813.
- Heuer, H.; Krsek, M.; Baker, P.; Smalla, K.; Wellington, E.M., 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3233-3241.
- Hugenholtz, P.; Goebel, B.M.; Pace, N.R., 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* **180**, 4765-4774.
- Johnson, J.E.; Hill, R.T., 2003. Sediment Microbes of Deep-Sea Bioherms on the Northwest Shelf of Australia. *Microbial Ecology* **46**, 55-61.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**, 111-120.
- Korenblum, E.; der Weid, I.; Santos, A.L.; Rosado, A.S.; Sebastián, G.V.; Coutinho, C.M.; Magalhães, F.C.; Paiva, M.M.; 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. *Journal of Applied Microbiology* **98** (3), 667-675.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Jakobsen, I.B.; Nei, M., 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA. *Bioinformatics* **17**, 1244-1245.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Goodfellow, M.; Stackebrandt, E. (Eds.); *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, 115-147. John Wiley and Sons, Chichester.
- Magot, M.; Ollivier, B.; Patel, B.K.C., 2000. Microbiology of Petroleum Reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek* **77**, 103-116.

- Margulis, L.; Jorgensen, J.Z.; Dolan, S.; Kolchinsky, R.; Rainey, F.A.; Lo, S-C., 1998. The *Arthromitus* stage of *Bacillus cereus*: Intestinal symbionts of animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**, 1236-1241.
- Pace, N.R., 1996. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News* **62**, 463-470.
- Radwan, S.S.; Barabas, G.; Sorkhoh, N.A.; Damjanovich, S.; Szabo, I.; Szollosi, J.; Matko, J.; Penyige, A.; Hirano, T.; Szabo, I.M., 1998. Hydrocarbon uptake by *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* **169** (1), 87-94.
- Röling, W.F.M.; Head, I.M.; Larter, S.T., 2003. The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. *Research in Microbiology* **154**, 321-328.
- Sebastián, G.V., 1999. Avaliação da população bacteriana presente em um reservatório de petróleo situado em águas profundas brasileiras, com ênfase no isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus*, dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Rio de Janeiro, Brasil.
- Sette, L.D.; Simioni, K.C.M.; Vasconcelos, S.P.; Dussán, L.J.; Marsaioli, A.J.; Santos Neto, E.V.; Oliveira, V.M., 2007. Analysis of composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Antonie van Leeuwenhoek* **91**, 253-266.
- Tanaka, Y.; Sogabe, M.; Okumura, K.; Kurane, R., 2002. A highly selective direct method of detecting sulphate-reducing bacteria in crude oil. *Letters in Applied Microbiology* **35**, 242-246.
- Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **24**, 4876-4882.
- Toledo, F.L.; Calvo, C.; Rodelas, B.; González-López, J., 2006. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Systematic and Applied Microbiology* **29**, 244-252.
- Vasconcellos, S.P., 2006. Atividades Enzimáticas e de Biodegradação de Microrganismos do Petróleo da Bacia de Campos (South Pampo), tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.
- Zhuang, W.-Q.; Tay, J.-H.; Maszenan, A.M.; Krumholz, L.R.; Tay, S.T.-L., 2003. Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments. *Letters in Applied Microbiology* **36**, 251-257.

Figures

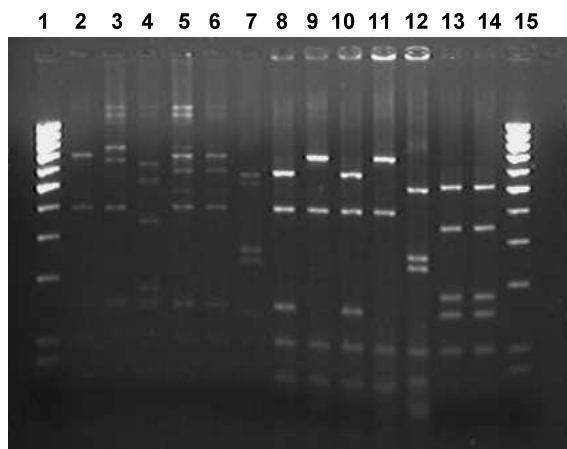


Figure 1. Restriction profiles obtained for some of the crude oil clones after digestion with *MspI* (lanes 2 to 14). Lanes **1** and **15**: molecular marker (*1kb DNA ladder*, Fermentas).

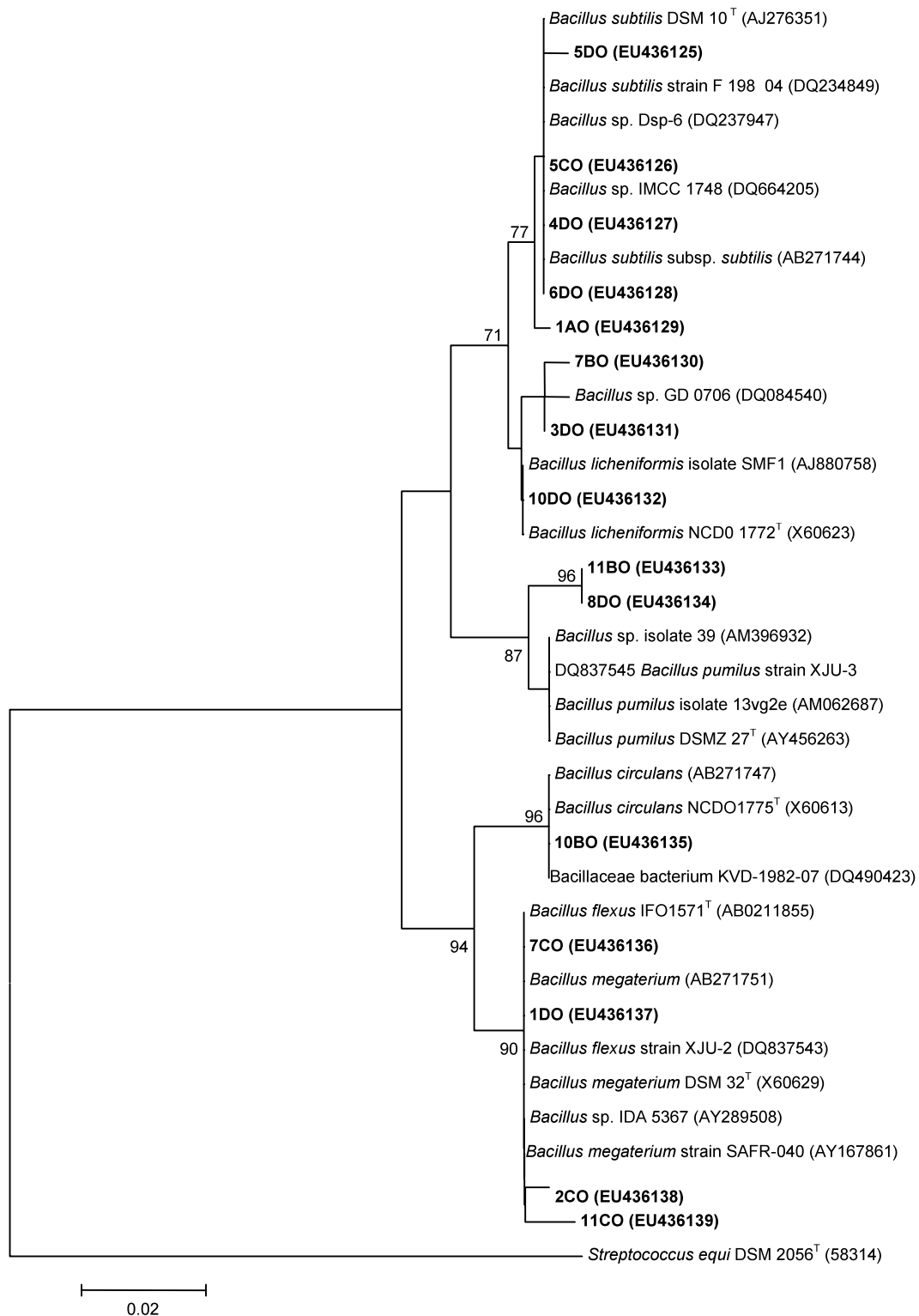


Figure 2. Neighbor-joining phylogenetic tree of the 16S rDNA environmental sequences showing the relationship between the clones and the *Bacillus*-related strains.

Capítulo 3: Quantificação de *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Dietzia* spp. e *Streptomyces* spp. em amostras de petróleo por PCR em tempo real (*real-time* PCR)

1. Introdução

A técnica de PCR tem sido crescentemente utilizada em estudos de Microbiologia relacionados à detecção de organismos em amostras ambientais ou mesmo clínicas. Mais recentemente, variações nesta técnica possibilitaram seu uso para a quantificação e comparação da quantidade de ácidos nucleicos em diferentes tipos de amostras. As duas principais estratégias de PCR quantitativo são o PCR competitivo e o PCR em tempo real (*real-time PCR*) (Baldwin *et al.*, 2003; Heid *et al.*, 1996).

No PCR competitivo, um competidor interno é adicionado a cada reação. Este competidor consiste em uma sequência de DNA exógeno introduzido na reação em quantidades conhecidas e cuja sequência também é amplificada pelos *primers* da sequência-alvo, com a diferença de produzir um padrão de bandas diferente (Vieira, 2008). O resultado da quantificação é visualizado ao término da reação, em gel de agarose, comparando-se a concentração do DNA em estudo com aquela do fragmento competidor (Heid *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 2002).

Já no caso do PCR em tempo real, como o próprio nome diz, o resultado da quantificação é observado no decorrer da reação; portanto, não há uma etapa pós-PCR, o que diminui as chances de erros manuais e gera um resultado mais rápido (Baldwin *et al.*, 2003). Seu princípio se baseia na concepção de que existe uma relação entre a quantidade de amostra-alvo e a quantidade de produtos de PCR em um dado ciclo de amplificação. Assim sendo, a técnica de PCR em tempo real detecta o acúmulo de amplicon durante a reação. Os dados são medidos na fase exponencial da reação de PCR, que é o ponto ideal para a análise destes resultados. Esta técnica é bastante precisa, podendo-se partir de uma quantidade ínfima de DNA para se ter resultado confiável (*Applied Biosystems*, 2007-a).

Existem várias formas de se estimar a quantidade de DNA ou RNA em estudo por PCR em tempo real, sendo que as mais utilizadas são os corantes que se ligam ao DNA e as sondas de hidrólise. No caso dos corantes, existe o *SYBR Green*, que emite um sinal de fluorescência ao se ligar a qualquer molécula de DNA em arranjo de dupla-fita. Esta fluorescência é medida e usada para a quantificação. Já o sistema de sonda hidrolítica (TaqMan) faz uso da ação 5' exonucleásica da DNA polimerase para hidrolizar uma sonda específica, marcada com

fluoróforos nas duas extremidades, que se liga ao gene-alvo. Um destes fluoróforos, chamado de *reporter*, emite fluorescência, enquanto o outro (*quencher*) a absorve, não permitindo que esse sinal seja reconhecido pelo aparelho de PCR quantitativo. No entanto, quando esta sonda é hidrolizada, os fluoróforos se separam e o sinal de fluorescência é emitido. Esta sonda é altamente específica para o fragmento-alvo de DNA que se pretende quantificar (Baldwin *et al.* 2003).

Todas estas formas de quantificação possuem suas vantagens e limitações, de forma que cada tipo de estudo deve utilizar o que for mais adequado para a situação em questão. Conforme descrito em literatura (Applied Biosystems, 2007-a; Heid *et al.*, 1996), o uso de corantes como o *SYBR Green*, que se ligam a moléculas de DNA dupla-fita, dispensa a necessidade do uso de sonda específica. No entanto, se uma molécula de DNA dupla-fita não correspondente ao grupo-alvo estiver presente, a quantidade deste DNA contaminante também será levada em consideração, resultando em erro no resultado final da quantificação. Já o sistema TaqMan oferece, em geral, uma quantificação mais precisa do fragmento-alvo. Entretanto, no caso de quantificação a partir de amostras ambientais mistas, existe o risco de alguma nova linhagem de microrganismo pertencer ao grupo-alvo, mas apresentar alguma pequena diferença em sua sequência de DNA, não sendo passível de detecção pela sonda utilizada.

A estratégia de PCR competitivo foi utilizada por Watanabe *et al.* (2002) em um estudo no qual foi constatada uma abundância significativa de bactérias afiliadas aos gêneros *Desulfotomaculum*, *Acetobacterium*, *Desulfovibrio* e *Zoogloea* em uma cavidade subterrânea em Kuji (Iwate, Japão). No entanto, as bactérias dominantes naquele ambiente mostraram-se relacionadas ao subgrupo *Thiovulum*, da Classe ϵ -Proteobacteria.

Em outro estudo, Nyssönen *et al.* (2006) utilizaram o PCR em tempo real com o corante *SYBR Green* para a quantificação de um grupo de bactérias degradadoras de naftaleno em amostras de solo contaminado com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, tendo como alvo para a reação de PCR as sequências gênicas codificantes para a subunidade maior da naftaleno-dioxigenase.

A estratégia de PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan foi adotada para estudar a abundância e distribuição, em amostras ambientais, de organismos capazes de utilizar a via de degradação de naftaleno, semelhante à utilizada por uma linhagem de *Ralstonia* isolada da Venezuela (Dionisi *et al.*, 2004).

Em estudo anterior (Crespim *et al.*, submetido), nosso grupo de pesquisa avaliou, por PCR grupo-específico, a presença de seis grupos bacterianos em uma amostra de água de

formação e cinco amostras de petróleo obtidas a partir de reservatórios em produção com diferentes características e graus de biodegradação, localizados na Bacia de Campos (Rio de Janeiro, RJ). Entre tais grupos bacterianos estão: *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Dietzia* spp. e *Streptomyces* spp., freqüentemente relacionados com a degradação de hidrocarbonetos do petróleo (Radwan *et al.*, 1995; Sette *et al.*, 2007; Toledo *et al.*, 2006; Vasconcellos, 2006) e conseqüente diminuição de seu valor econômico. No referido estudo, estas bactérias foram detectadas tanto em amostras de petróleo consideradas altamente biodegradadas quanto naquelas consideradas não biodegradadas, o que nos faz ponderar sobre seu papel na biodeterioração do petróleo em cada reservatório. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo realizar uma análise de caráter quantitativo com relação à abundância destes grupos bacterianos nas amostras ambientais, utilizando a estratégia de PCR em tempo real baseada no sistema de sonda hidrolítica TaqMan.

2. Material e Métodos:

Os experimentos de PCR em tempo real foram realizados no Laboratório de Genética Molecular e Genomas, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (Univap), em São José dos Campos, SP. Este laboratório é coordenado pelo Dr. Francisco G. da Nóbrega e pela Dra. Marina P. Nóbrega, que gentilmente nos permitiram utilizar seu laboratório e colaboraram com os experimentos.

2.1. Amostragem

Cinco amostras de petróleo e uma amostra de água de formação foram coletadas a partir de reservatórios de petróleo em produção localizados na Bacia de Campos, Plataforma Pampo (Rio de Janeiro, RJ) em julho de 2005. Estes reservatórios apresentavam diferentes características relacionadas à temperatura, pressão e grau de biodegradação de seus óleos, conforme descrito em trabalho anterior da nossa equipe (Crespim *et al.*, submetido).

As amostras foram coletadas em triplicata utilizando frascos Schott esterilizados e mantidas em gelo durante o transporte ao laboratório, onde foram armazenadas em temperatura ambiente até a subsequente extração de DNA.

2.2. Extração de DNA

O DNA da comunidade microbiana foi extraído diretamente a partir das amostras de petróleo, sem cultivo prévio, utilizando-se o QIAmp DNA Stool Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia,

CA, USA), conforme descrito em artigo prévio por Crespim *et al.* (submetido). Assim como descrito, foram utilizadas alíquotas de 100 mL de óleo dos reservatórios 1, 4 e 5, e 25 mL no caso dos reservatórios 2 e 3. Prosseguiu-se com duas lavagens em isooctano, com base no protocolo descrito por Yoshida *et al.* (2005). A solução foi, a seguir, submetida à lise mecânica utilizando *glass beads*, de acordo com o protocolo descrito por Tanaka *et al.* (2002), seguida de purificação do DNA com o QIAmp DNA Stool Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA).

No caso da amostra de água de formação, o DNA da comunidade microbiana foi extraído utilizando o protocolo descrito pelo Dr. Bahrat Patel (comunicação pessoal), com modificações (Crespim *et al.*, submetido).

A amplificabilidade do DNA extraído foi confirmada através de reação de PCR utilizando os *primers* p10f e p1100r (Lane, 1991), genéricos para o Domínio Bactéria.

1.1. *Primers* e sondas

O DNA obtido da comunidade de microrganismos das amostras de óleo e água de formação foi empregado em reações de PCR em tempo real utilizando *primers* específicos para os gêneros: *Micrococcus*, *Bacillus*, *Dietzia* e *Streptomyces*. Para posterior comparação, três amostras de petróleo, com diferentes graus de biodegradação, foram escolhidas para a reação de PCR em tempo real utilizando *primers* genéricos para o Domínio Bactéria, descritos por Nadkarni *et al.* (2002). As amostras de óleo escolhidas foram dos poços: 1 (não biodegradado), 2 (altamente biodegradado) e 3 (moderadamente biodegradado). As reações de PCR em tempo real foram feitas através do sistema TaqMan, conforme descrito mais adiante no texto.

Os *primers* e sondas genéricos para o Domínio Bactéria foram sintetizados pela empresa *Applied Biosystems* (São Paulo, SP) e fornecidos em tubos separados; já os *primers* e sondas grupo-específicos foram desenhados pela mesma empresa e fornecidos como uma única solução (*Custom TaqMan*) (Tabela 1).

Tabela 1. *Primers* e sondas utilizados nos experimentos de PCR em tempo real.

Grupo-alvo	Oligonucleotídeos (5' - 3')	Posição	Tamanho esperado
<i>Micrococcus</i>	<i>Primer</i> senso: MICROCOCUS-832F (GCAACGCGAAGAACCTTACC)	545 a 564 ^a	78 pb
	<i>Primer</i> anti-senso: MICROCOCUS-832R (TGAACCCGCCCAAAGG)	607 a 623 ^a	
	Sonda TaqMan: MICROCOCUS-832M2 (FAM)-(TCTACGGCGATCGAGAACA)-(NFQ)	576 a 594 ^a	

Tabela 1, continuação

Grupo-alvo	Oligonucleotídeos (5' - 3')	Posição	Tamanho esperado
<i>Bacillus</i>	<i>Primer</i> senso: BACILLUS-1131F (GATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTG)	1087 a 1111 ^b	66 pb
	<i>Primer</i> anti-senso: BACILLUS-1131R (CACCTTCCTCCGGTTTGTCA)	1134 a 1153 ^b	
	Sonda TaqMan: BACILLUS-1131M2 (FAM)-(CCGGCAGTCACCTTAGAGT)-(NFQ)	1115 a 1133 ^b	
<i>Dietzia</i>	<i>Primer</i> senso: DIETZIA-929F (GAAGAACCCTTACCTAGGCTTGACAT)	943 a 967 ^c	66 pb
	<i>Primer</i> anti-senso: DIETZIA-929R (ACAAGCCACAAGGGAAACGA)	990 a 1009 ^c	
	Sonda TaqMan: DIETZIA-929M2 (FAM)-(ATCTCTGCCGTCGTCCTG)-(NFQ)	971 a 988 ^c	
<i>Streptomyces</i>	<i>Primer</i> senso: STREPTOMYC-889F (AGCGGCGGAGCATGT)	860 a 874 ^d	66 pb
	<i>Primer</i> anti-senso: STREPTOMYC-889R (CCGATGTATGTCAAGCCTTGTAAG)	902 a 926 ^d	
	Sonda TaqMan: STREPTOMYC-889M2 (FAM)-(TTGCGTCGAATTAAGCC)-(NFQ)	875 a 891 ^d	
Domínio Bacteria	<i>Primer</i> senso (TCCTACGGGAGGCAGCAGT)	266 a 284 ^e	441 pb
	<i>Primer</i> anti-senso (GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT)	682 a 707 ^e	
	Sonda TaqMan (6-FAM)-(CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC)-(TAMRA)	416 a 438 ^e	

^a: posição relativa ao DNAr 16S de *Micrococcus luteus* linhagem DJQF8 (acesso no Genbank: EU169564); ^b: posição relativa ao DNAr 16S de *Bacillus pumilus* (acesso no Genbank: EU369175); ^c: posição relativa ao DNAr 16S de *Dietzia natronolimnea* linhagem LL 51 (acesso no Genbank: DQ821754); ^d: posição relativa ao DNAr 16S de *Streptomyces venezuelae* linhagem 13-4 (acesso no Genbank: EU367976); ^e: posição relativa ao DNAr 16S de *Methylobacterium* sp. linhagem CBMB27 (acesso no Genbank: EF126746); **FAM**: reporter, **TAMRA**: quencher, **NFQ**: non-fluorescent quencher (não emite fluorescência).

2.4. Controles de reação

Nas reações com os *primers* específicos, foi escolhida uma linhagem de bactéria pertencente a cada grupo-alvo para uso como padrão (Tabela 2). As bactérias foram cultivadas em meio de cultura apropriado (de acordo com a Coleção de Culturas DSMZ; <http://www.dsmz.de>) e seu DNA foi extraído segundo o protocolo descrito por Pospiech e Neumann (1995). Este DNA foi utilizado em reação de PCR com *primers* homólogos a regiões conservadas do gene que codifica para o RNA ribossomal 16S do Domínio Bacteria. Após confirmação da integridade dos amplicons através de eletroforese em gel de agarose 1%, prosseguiu-se à ligação do produto de PCR ao vetor pCR[®]2.1 (Invitrogen). Células competentes de *Escherichia coli* (*One Shot[®]*, Invitrogen) foram transformadas com o vetor contendo o inserto. Após a transformação, as células foram cultivadas em meio de cultura LA (Luria Agar) contendo ampicilina e X-Gal. Todo o procedimento de ligação e transformação foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. O DNA plasmidial dos transformantes positivos (colônias brancas) foi extraído e quantificado em espectrofotômetro, a fim de se saber com exatidão a concentração do DNA para posterior utilização como padrão para a estimativa da quantidade de DNA das amostras ambientais no PCR quantitativo.

No caso da quantificação utilizando os *primers* genéricos para o Domínio Bacteria, o DNA plasmidial contendo o inserto do DNAr 16S de *Bacillus pumilus* CBMAI 638 foi utilizado como padrão de concentração. Além dos controles de concentração, foi feito um teste, utilizando-se na reação 15 ng/μL de uma mistura dos quatro controles (DNA plasmidial) em igual quantidade. Esta reação foi ajustada no *software* não como padrão, mas como amostra desconhecida, a fim de se confirmar a eficiência de quantificação em uma amostra mista de DNA, na tentativa de simular o caso das amostras ambientais.

Além dos controles de DNA plasmidial, nas reações específicas foi utilizado DNA genômico de bactéria pertencente ao grupo-alvo (Tabela 2), em quantidade normalmente usada em nosso laboratório para reações de PCR de detecção (cerca de 50 ng). Este DNA, chamado de “Controle” nas Figuras 1 a 24, foi utilizado a título de teste da reação, para se avaliar o comportamento das curvas de amplificação diante de DNA genômico, que deve ter padrão de amplificação semelhante ao das ambientais.

Tabela 2. Linhagens bacterianas utilizadas como controle para o PCR em tempo real.

Grupo-alvo	Controle
<i>Micrococcus</i> spp.	<i>Micrococcus luteus</i> INCQS 356
<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus pumilus</i> CBMAI 638
<i>Dietzia</i> spp.	<i>Dietzia maris</i> DSM 43672
<i>Streptomyces</i> spp.	<i>Streptomyces venezuelae</i>

2.5. Condições de reação

As reações foram realizadas em aparelho ABI PRISM^R 7300 (*Applied Biosystems*), utilizando o *software* apropriado (*Sequence Detection System*), com placas de 96 poços.

Em todos os casos, o tipo de reação escolhida foi “Quantificação Absoluta”, que consiste no uso de controles com quantidades conhecidas, que geram curvas-padrão durante a reação de amplificação. Estas curvas são utilizadas como parâmetro pelo *software* para estimar a quantidade inicial de ácido nucléico nas amostras ambientais.

No caso das quantificações grupo-específicas, as reações continham 1X do Mix Universal TaqMan (*Applied Biosystems*) e 1X do Mix de *primers* e sonda específicos, o último consistindo em 900 nM de cada *primer* (senso e anti-senso) e 250 nM da sonda TaqMan. Já no caso da quantificação com os *primers* genéricos bacterianos, foram utilizados: 1X do Mix Universal TaqMan (*Applied Biosystems*), 750 nM de cada *primer* e 250 nM da sonda TaqMan. Em todos os casos, foram utilizados 3 µL da solução de DNA obtido a partir da água de formação (para as reações grupo-específicas), e 5 µL da solução de DNA obtido a partir do óleo. O volume de cada reação foi completado para 25 µL com água esterilizada (Invitrogen).

- **Quantificação de *Bacillus* spp. e *Micrococcus* spp.**

A quantificação de *Bacillus* spp. e *Micrococcus* spp. foi realizada simultaneamente na mesma placa de 96 poços, portanto utilizando o mesmo programa de ciclagem térmica. Isto foi possível porque as duas sondas específicas usam o mesmo *reporter* (FAM) e o mesmo *quencher* (NFQ); portanto, as condições de reação e fluorescência são as mesmas para os dois casos. No momento da análise dos resultados, a distinção se fez pelas informações configuradas em arquivo gerado pelo próprio *software*, havendo um campo específico para anotações referentes ao conteúdo de cada poço da placa utilizada. Este *software* permite a seleção exclusiva dos poços a serem comparados, sendo possível, portanto, a análise de cada resultado independentemente.

O programa de ciclagem térmica utilizado neste caso consistiu em: 1 ciclo de 50°C por 2 minutos; 1 ciclo de 95°C por 10 minutos; e 52 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

- **Quantificação de *Dietzia* spp. e *Streptomyces* spp.**

Assim como descrito acima, a quantificação de *Dietzia* spp. e *Streptomyces* spp. nas amostras ambientais foi realizada simultaneamente, utilizando o mesmo programa de ciclagem térmica. Este consistiu em: 1 ciclo de 50°C por 2 minutos; 1 ciclo de 95°C por 10 minutos; e 55 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Neste caso, o número de ciclos foi aumentado (com relação à ciclagem utilizada para *Bacillus* spp. e *Micrococcus* spp.), com o intuito de se observar o comportamento das amostras alguns ciclos adiante.

- **Quantificação com os *primers* genéricos para o Domínio Bacteria**

Neste caso, o programa de ciclagem térmica consistiu em 1 ciclo de 50°C por 2 minutos; 1 ciclo de 95°C por 10 minutos; e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

3. Resultados e Discussão

Os dados referentes a cada PCR quantitativo foram gerados pelo *software* SDS. Após o ajuste do limiar (*threshold*) e da linha basal de acordo com as instruções do manual da empresa *Applied Biosystems* (2007-b), os dados foram analisados, sendo calculados os parâmetros: Ct (ciclo no qual a fluorescência atinge o limiar); Delta Rn (a magnitude do sinal gerado pelas condições específicas de PCR); e a quantidade inicial de DNA das amostras ambientais, com base nos valores associados aos padrões de quantidade da reação.

Os gráficos a seguir relacionam os valores de Delta Rn com os ciclos de amplificação.

- ***Micrococcus* spp.**

As figuras 1 a 6 ilustram a relação Delta Rn-número de ciclos obtida para cada amostra ambiental utilizando os *primers* específicos para *Micrococcus* spp., com seus respectivos valores de Ct.

Observamos pelas figuras que os valores de Ct foram obtidos entre os ciclos 32 e 35, sendo estes valores maiores do que os padrões de quantidade utilizados. Isto indica uma concentração de DNA ainda menor do que aquela dos controles empregados na reação. Estes valores de Ct são próximos aos obtidos para as reações com os outros *primers* específicos.

Mesmo com os valores baixos de Ct obtidos, o *software* SDS foi capaz de estimar a quantidade inicial de DNA presente na reação (Tabela 3). No entanto, observa-se na Tabela 3 que a concentração estimada para o DNAr 16S de *Micrococcus* spp. foi consideravelmente maior do que para os outros grupos bacterianos, inclusive maior do que a estimada quando foram utilizados os *primers* genéricos para o Domínio Bacteria. Adicionalmente, as figuras 1 a 6 mostram que duas das replicatas do padrão de concentração de 7,5 ng/μL apresentaram curva semelhante à das amostras, o que não ocorreu no caso da quantificação das outras bactérias. Sabendo da alta sensibilidade da detecção do aparelho de PCR em tempo real, acreditamos que tenha ocorrido algum problema de pipetagem do controle e isto tenha interferido no cálculo feito pelo *software*, portanto a quantidade de moléculas de DNAr 16S específicas para o gênero *Micrococcus* deve ser próxima aos valores obtidos para os outros grupos bacterianos, e conseqüentemente menor do que o calculado pelo *software*. Vale lembrar que o poder de detecção do *software*, de acordo com o manual de quantificação absoluta fornecido pela empresa *Applied Biosystems* (2007-b), seria numa faixa entre 10 a 100 ng. Entretanto, sabendo da baixa concentração de DNA recuperada das amostras ambientais, foi necessário utilizarmos como padrão uma quantidade de DNA abaixo dessa faixa.

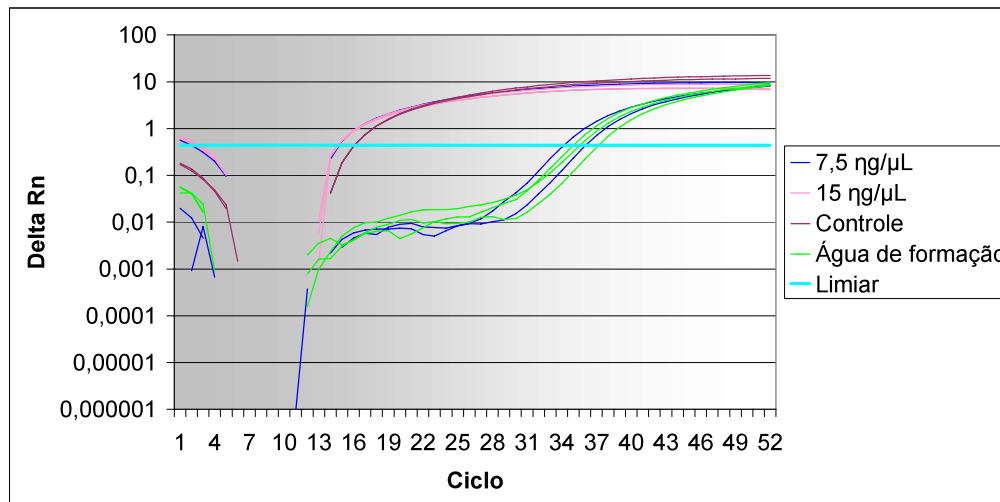


Figura 1. Resultado da quantificação de *Micrococcus* spp. em água de formação por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 35,66.

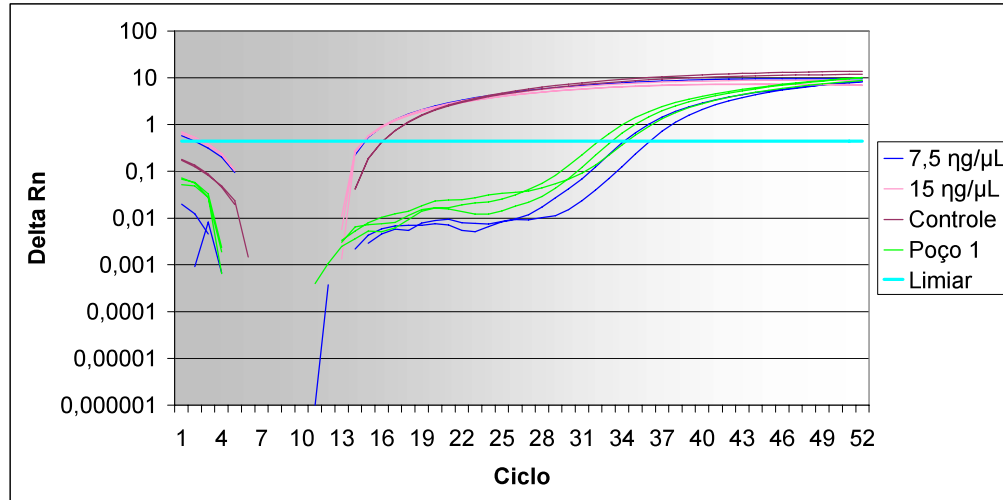


Figura 2. Resultado da quantificação de *Micrococcus* spp. na amostra do poço 1 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 32,92.

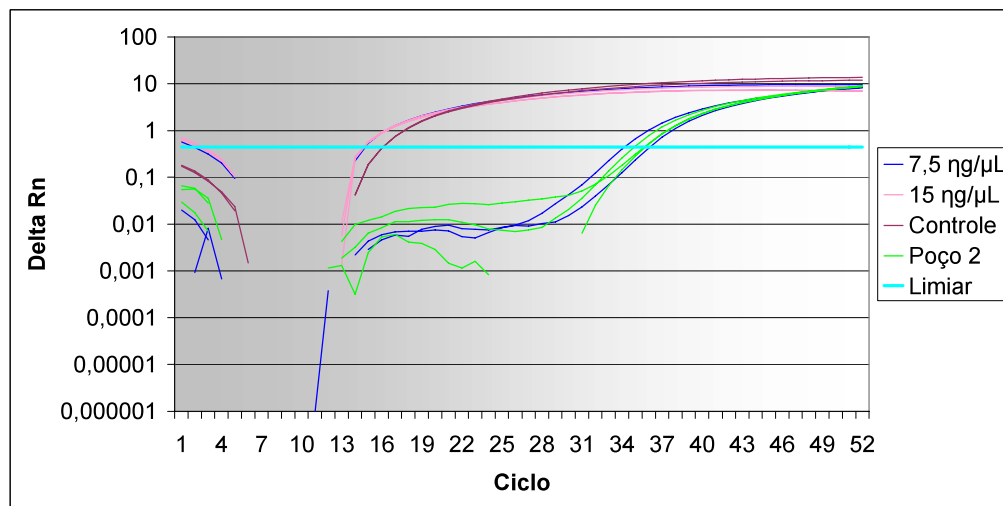


Figura 3. Resultado da quantificação de *Micrococcus* spp. na amostra do poço 2 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 35,08.

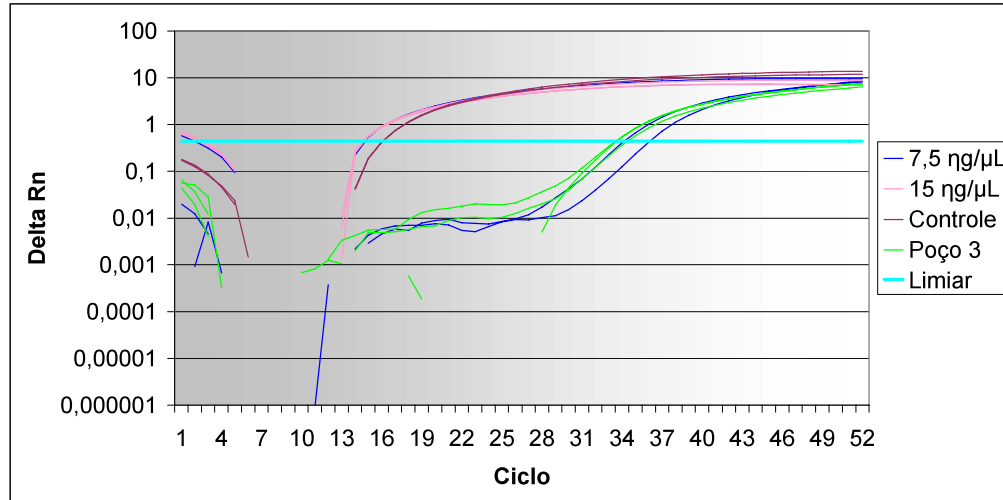


Figura 4. Resultado da quantificação de *Micrococcus* spp. na amostra do poço 3 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 33,63.

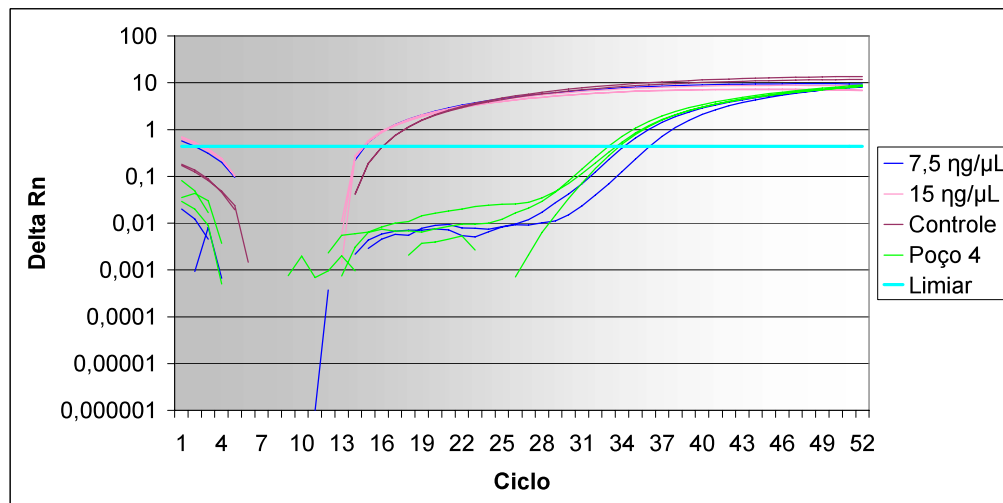


Figura 5. Resultado da quantificação de *Micrococcus* spp. na amostra do poço 4 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 33,1833.

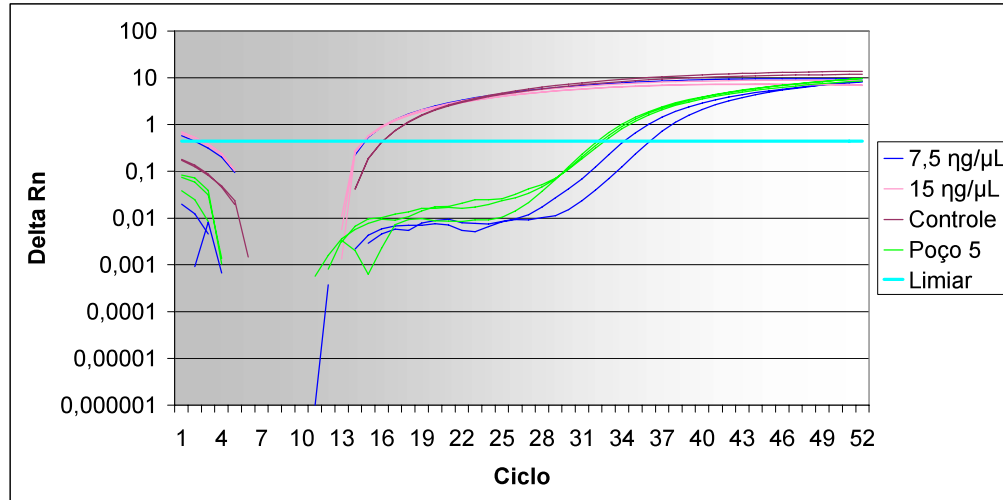


Figura 6. Resultado da quantificação de *Micrococcus* spp. na amostra do poço 5 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 32,0733.

- ***Bacillus* spp.**

Os valores de Ct e a curva mostrando a relação Delta Rn-número de ciclos para as amostras ambientais usando os *primers* específicos para *Bacillus* spp. são ilustrados nas figuras 7 a 12. Os valores de Ct obtidos para as amostras ambientais variaram de 29 a 37, de acordo com a concentração inicial de DNA em cada amostra. Vale lembrar que bactérias pertencentes a este grupo foram anteriormente detectadas em todas estas amostras de petróleo (Crespim *et al.*, submetido).

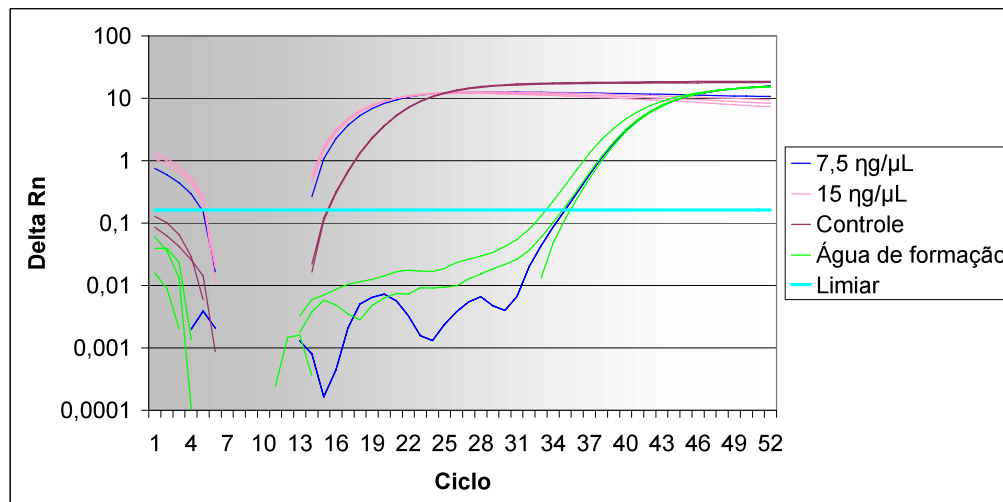


Figura 7. Resultado da quantificação de *Bacillus* spp. em água de formação por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 33,8666.

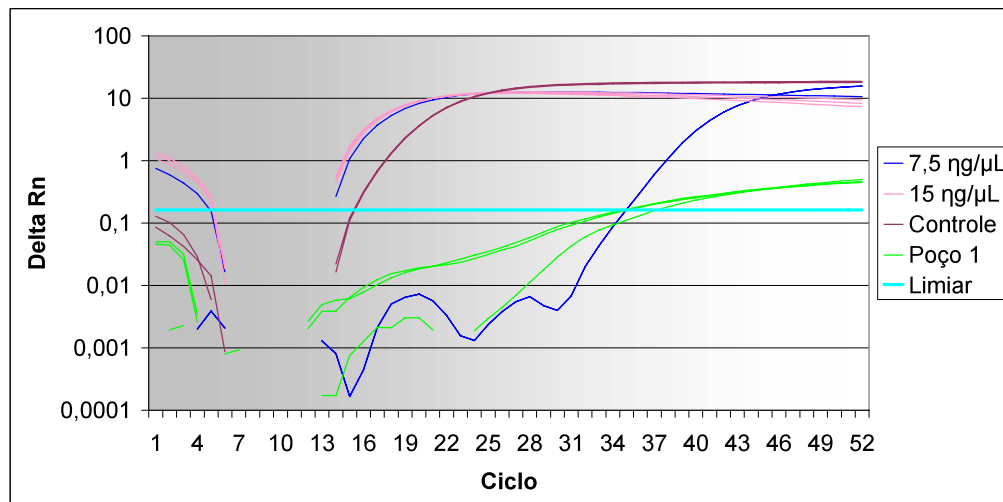


Figura 8. Resultado da quantificação de *Bacillus* spp. na amostra de óleo do poço 1 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 32,5133.

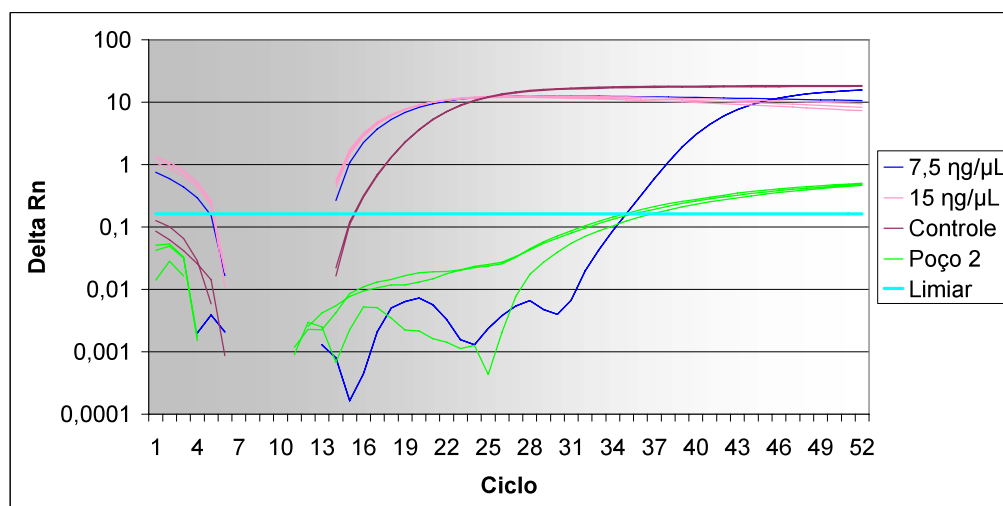


Figura 9. Resultado da quantificação de *Bacillus* spp. na amostra de óleo do poço 2 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 32,05.

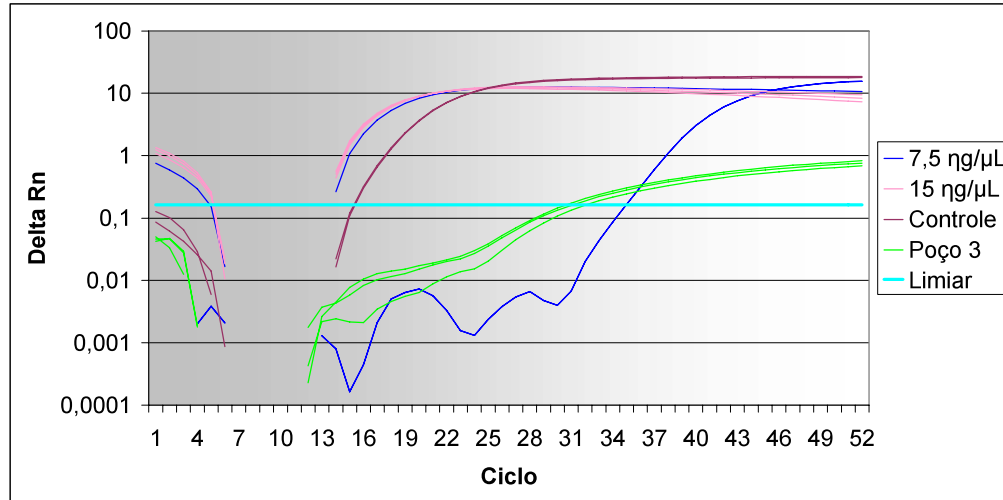


Figura 10. Resultado da quantificação de *Bacillus* spp. na amostra de óleo do poço 3 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 29,38.

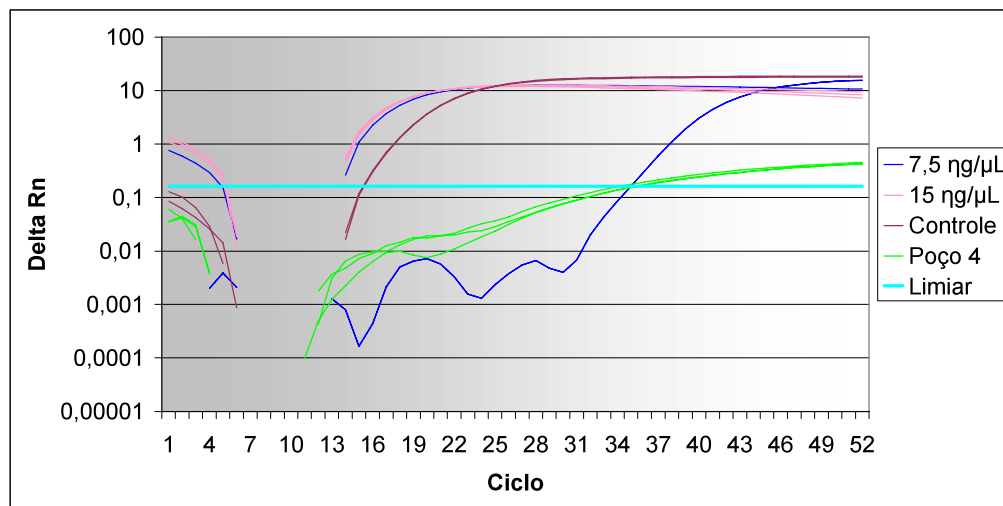


Figura 11. Resultado da quantificação de *Bacillus* spp. na amostra de óleo do poço 4 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 31,0833.

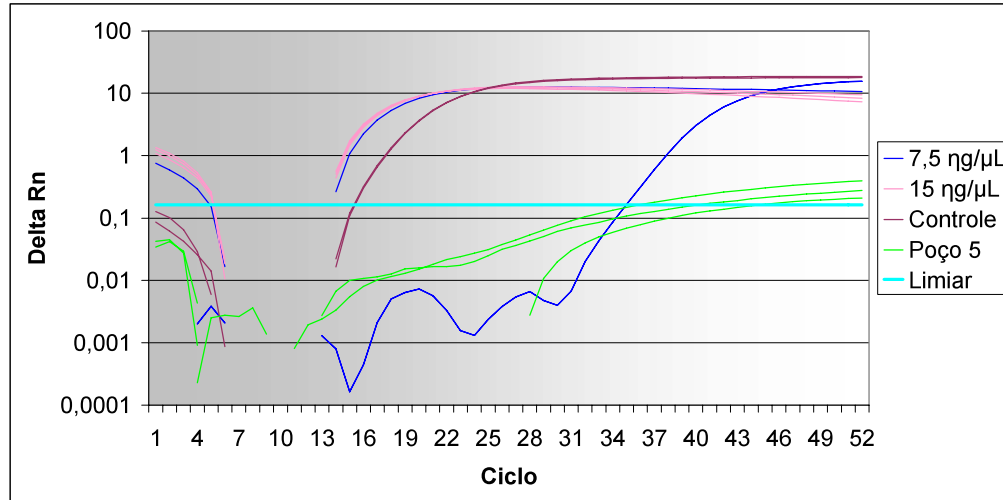


Figura 12. Resultado da quantificação de *Bacillus* spp. na amostra de óleo do poço 5 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 37,27.

- ***Dietzia* spp.**

As figuras 13 a 18 ilustram os valores de Ct e a relação Delta Rn-número de ciclos para as amostras ambientais utilizando os *primers* específicos para *Dietzia* spp. Os maiores valores de Ct observados foram cerca de 43 para a amostra de água de formação e cerca de 40 para o óleo do poço 3, que correspondem a uma menor concentração inicial de DNA na amostra. Estes resultados podem indicar a ausência destas bactérias nas amostras estudadas e estão de acordo com um estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa (Crespim *et al.*, submetido), no qual populações de *Dietzia* spp. foram detectadas nas amostras dos poços 1, 4 e 5 através de PCR grupo-específico, mas não foram detectadas na amostra de água de formação.

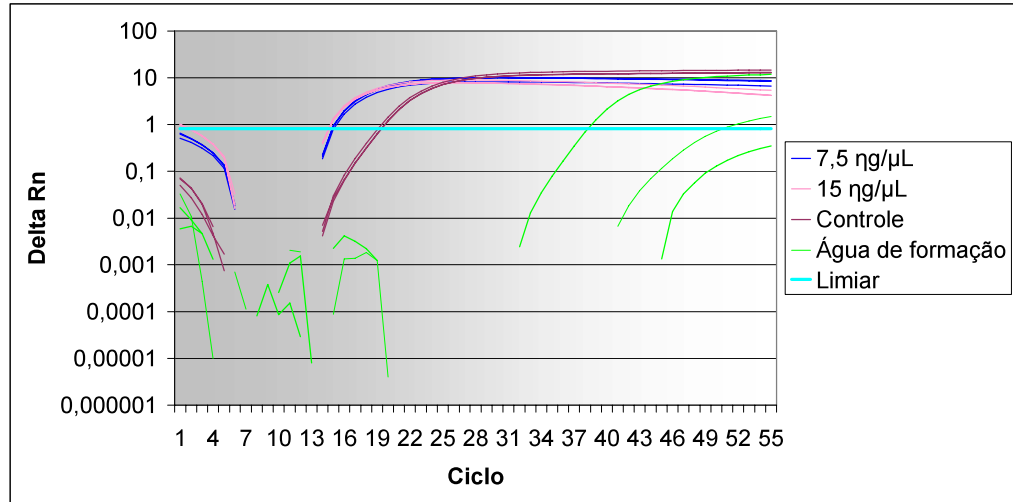


Figura 13. Resultado da quantificação de *Dietzia* spp. na amostra de água de formação por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 43,815.

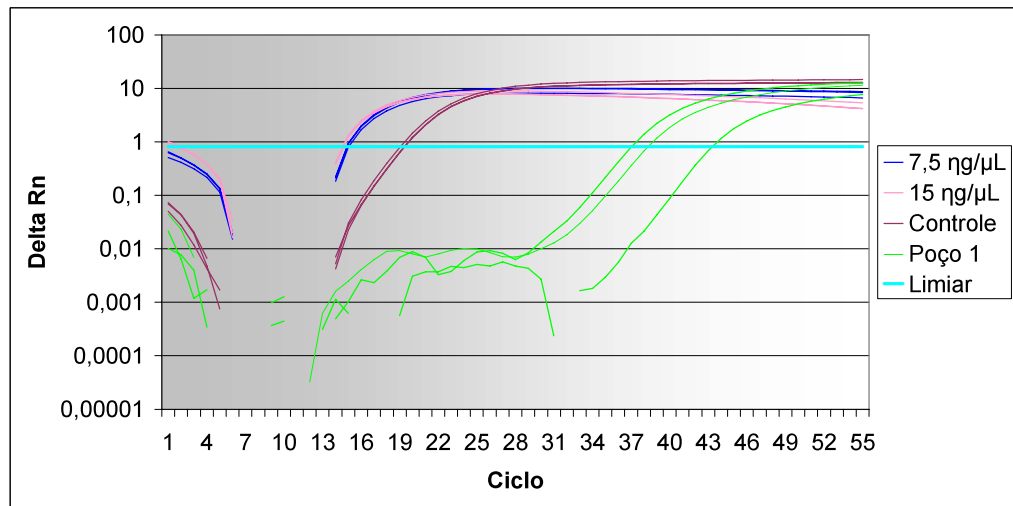


Figura 14. Resultado da quantificação de *Dietzia* spp. na amostra de óleo do poço 1 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 39,19.

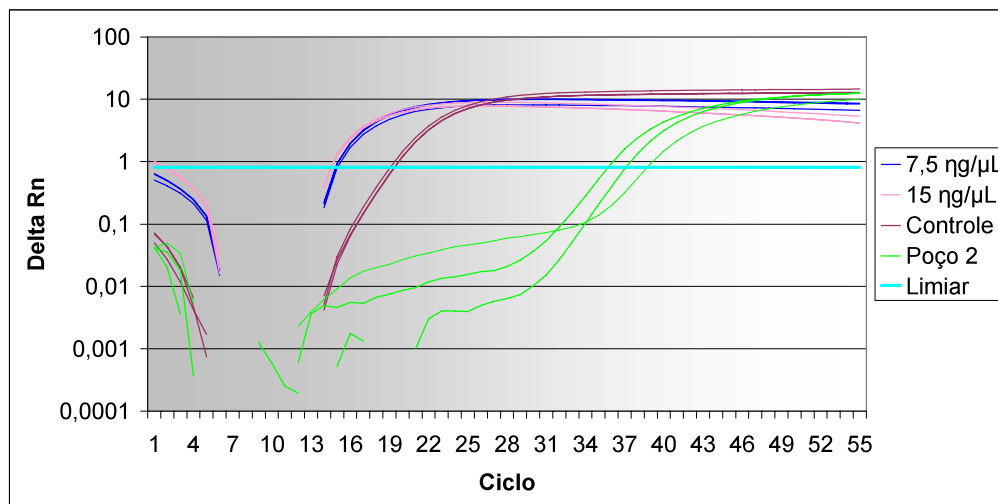


Figura 15. Resultado da quantificação de *Dietzia* spp. na amostra de óleo do poço 2 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 37,00.

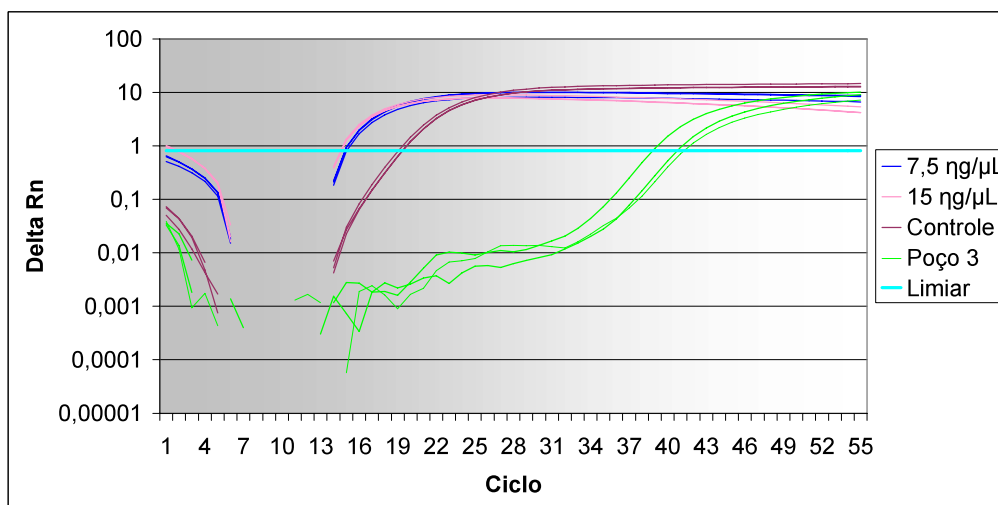


Figura 16. Resultado da quantificação de *Dietzia* spp. na amostra de óleo do poço 3 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 39,9967.

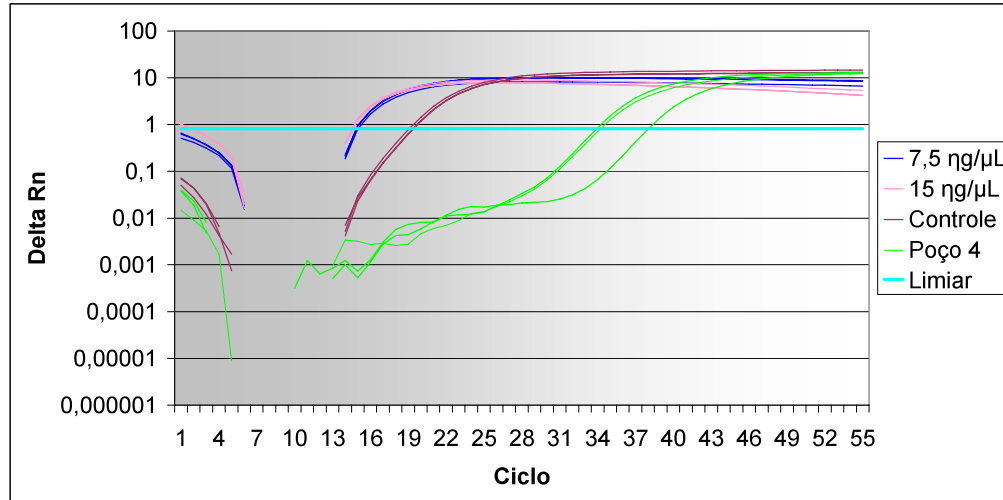


Figura 17. Resultado da quantificação de *Dietzia* spp. na amostra de óleo do poço 4 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 35,1667.

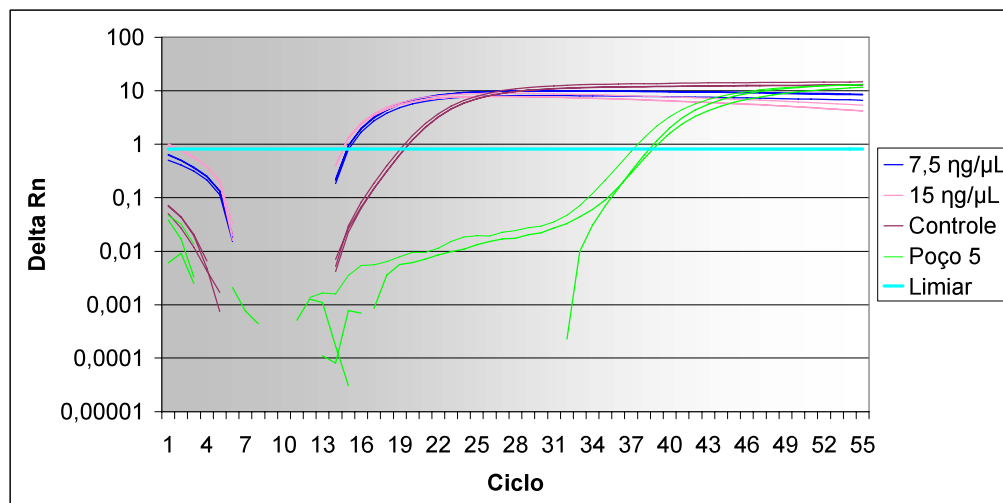


Figura 18. Resultado da quantificação de *Dietzia* spp. na amostra de óleo do poço 5 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 37,81.

- ***Streptomyces* spp.**

Os gráficos obtidos para a quantificação específica de bactérias do gênero *Streptomyces* nas amostras ambientais são ilustrados nas figuras 19 a 24. Conforme observado, os valores de Ct obtidos variaram entre 33 e 38, sendo o maior valor registrado para a amostra de água de formação. Vale lembrar que bactérias deste gênero foram detectadas nas mesmas 5 amostras de óleo em estudo prévio (Crespim *et al.*, submetido), mas não foi avaliada a sua presença na amostra de água de formação. Este valor mais alto de Ct pode indicar que, caso

estejam presentes na amostra de água de formação, estas bactérias devem estar em baixa abundância, ou então não foram efetivamente recuperadas pela metodologia adotada.

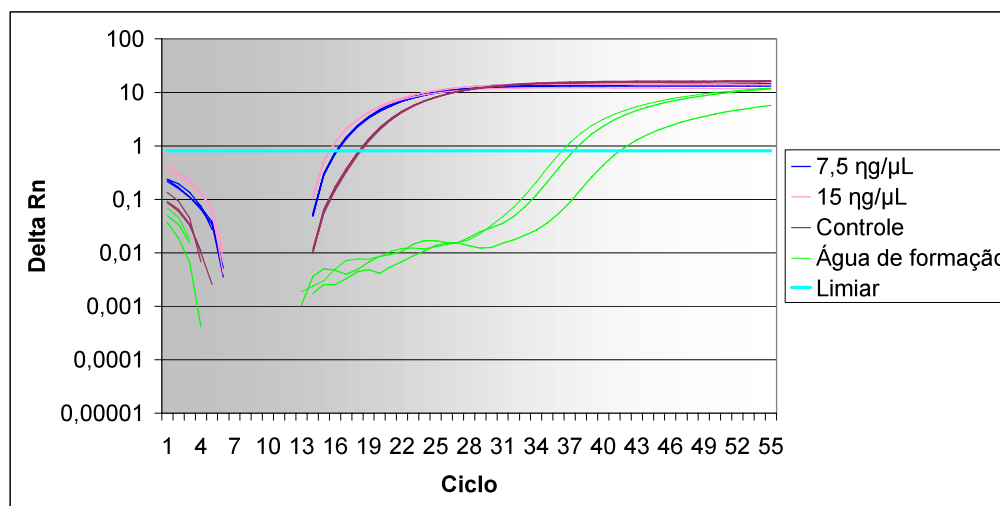


Figura 19. Resultado da quantificação de *Streptomyces* spp. na amostra de água de formação por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 38,1867.

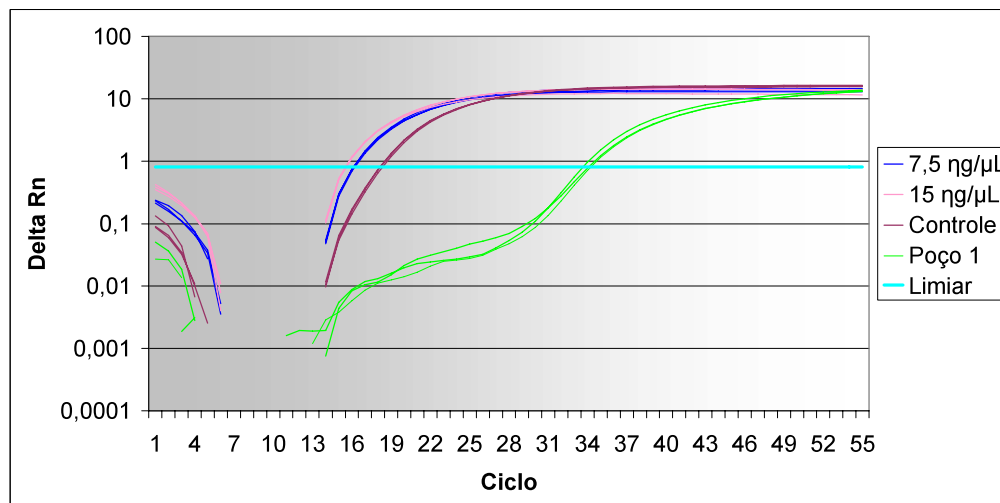


Figura 20. Resultado da quantificação de *Streptomyces* spp. na amostra de óleo do poço 1 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 33,93.

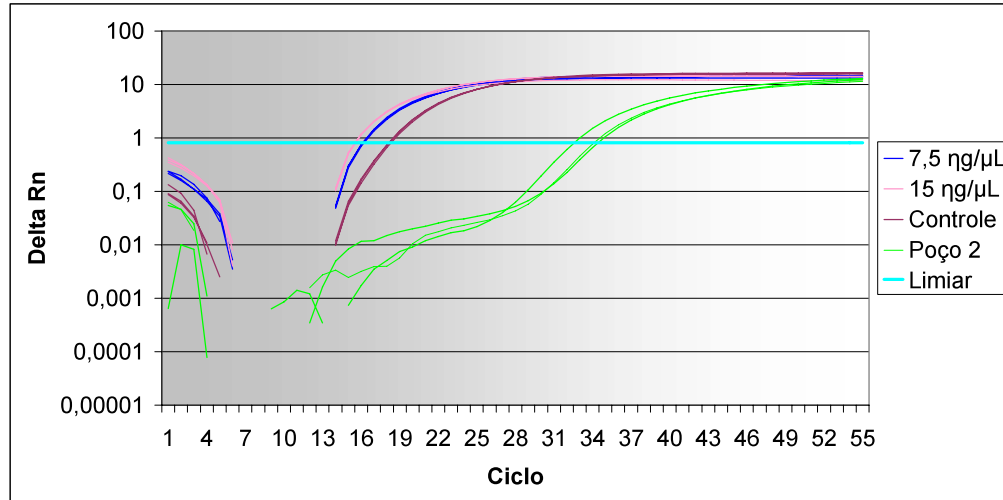


Figura 21. Resultado da quantificação de *Streptomyces* spp. na amostra de óleo do poço 2 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 33,5367.

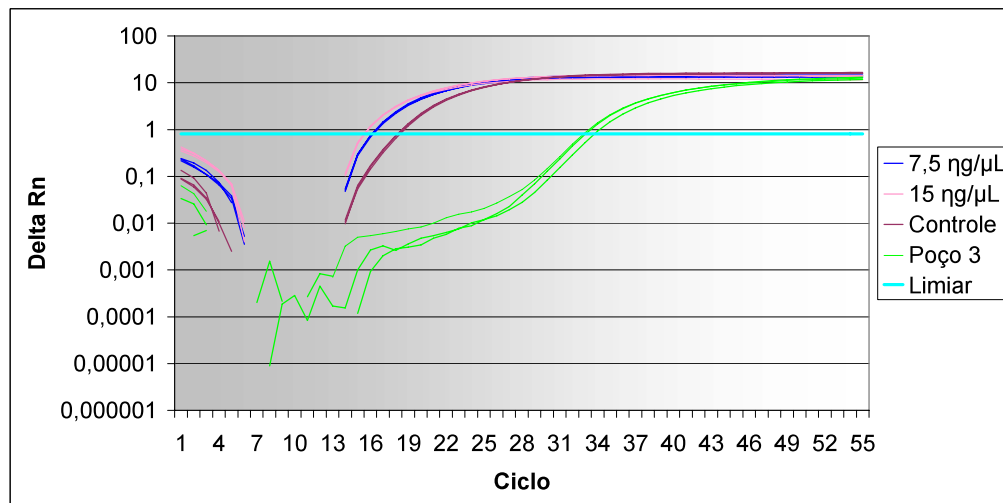


Figura 22. Resultado da quantificação de *Streptomyces* spp. na amostra de óleo do poço 3 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 33,06.

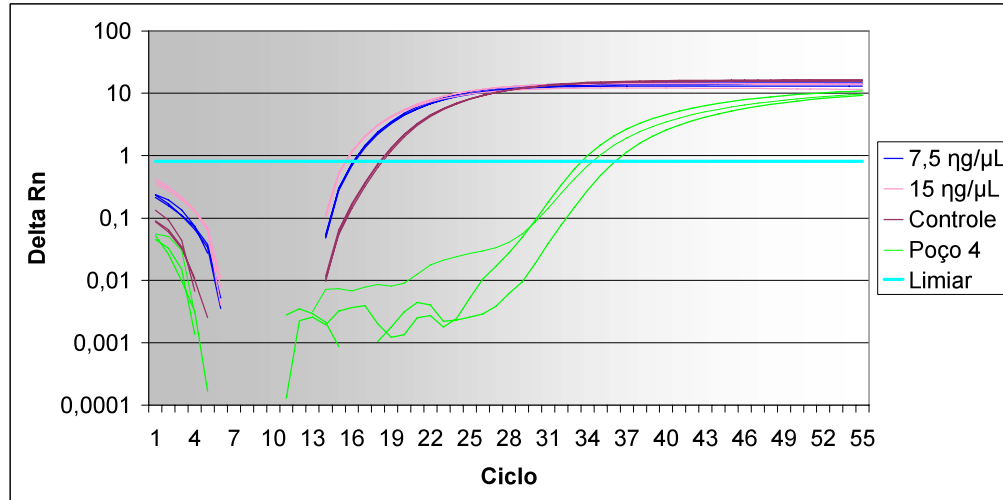


Figura 23. Resultado da quantificação de *Streptomyces* spp. na amostra de óleo do poço 4 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 34,34.

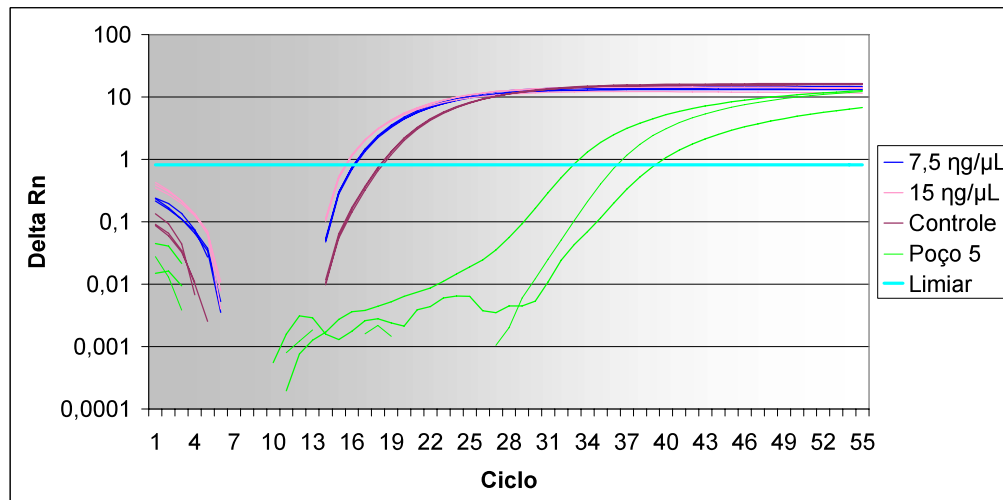


Figura 24. Resultado da quantificação de *Streptomyces* spp. na amostra de óleo do poço 5 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 35,77.

- **Domínio Bacteria (*primers* e sonda genéricos)**

Os gráficos obtidos para a quantificação total de bactérias nas amostras de petróleo dos poços 1, 2 e 3 são mostrados nas Figuras 25 a 27. Os valores de Ct obtidos variaram entre 31 e 38. Neste caso, foi testado o uso de padrões de concentração mais baixa do que para as reações de PCR quantitativo com os *primers* grupo-específicos, com o intuito de se estimar mais precisamente a quantidade de DNA presente nas amostras ambientais. A menor

quantidade utilizada como padrão foi 0,25 ng/μL. Ainda assim, a quantidade de DNA observada para as amostras de petróleo apresentou-se menor do que este valor.

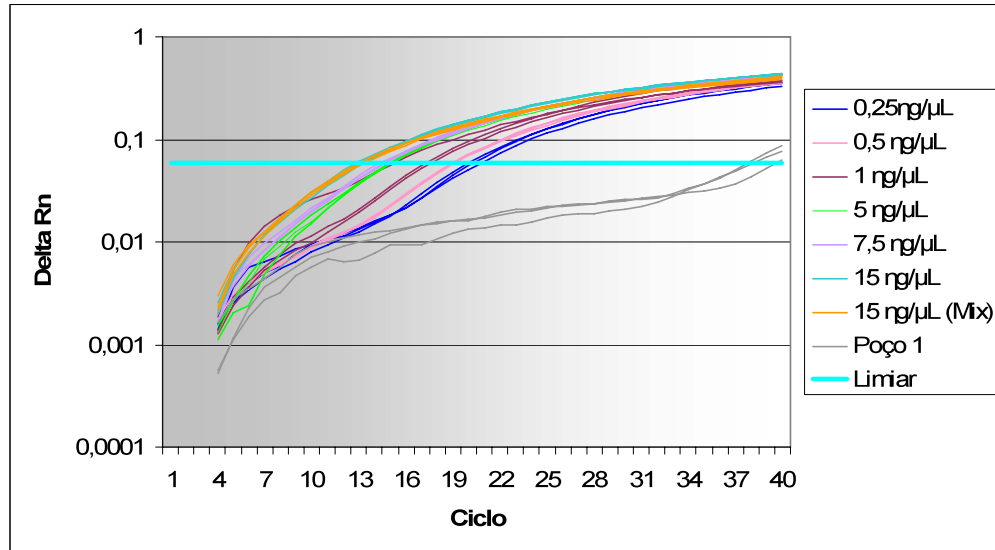


Figura 25. Resultado da quantificação de bactérias na amostra de óleo do poço 1 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 38,5572.

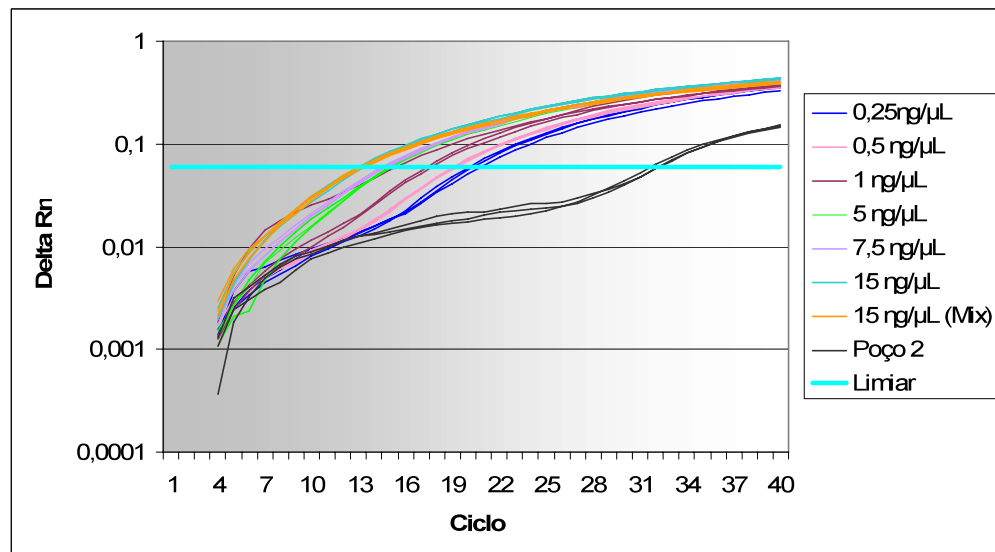


Figura 26. Resultado da quantificação de bactérias na amostra de óleo do poço 2 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 31,9716.

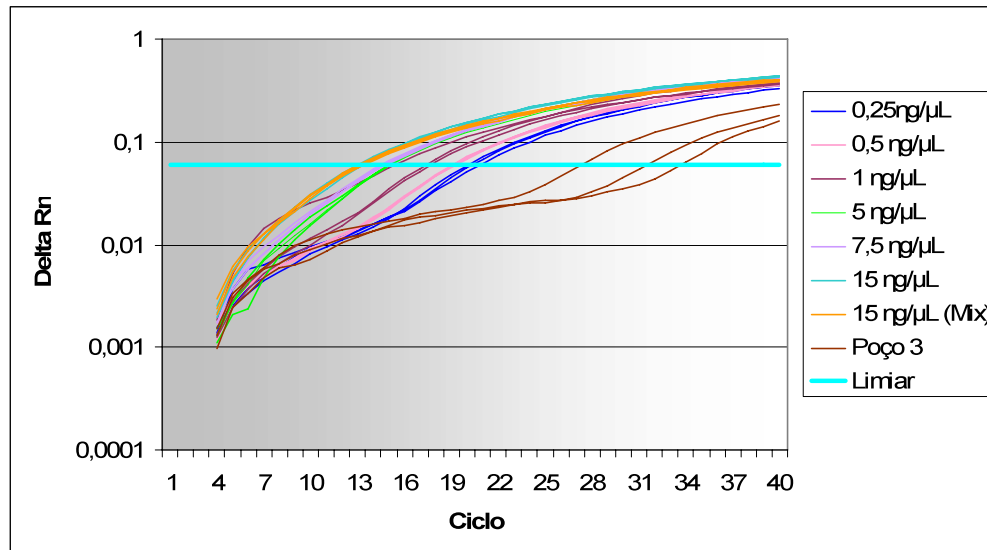


Figura 27. Resultado da quantificação de bactérias na amostra de óleo do poço 3 por PCR em tempo real. A média dos valores de Ct obtidos para a triplicata foi 30,7767.

A tabela a seguir lista a quantidade (média das três replicatas) estimada pelo *software* com relação à quantidade inicial, em $\eta\text{g}/\mu\text{L}$, de moléculas de DNAr 16S para cada grupo-alvo.

Tabela 3. Quantidade média, em $\eta\text{g}/\mu\text{L}$, de cópias do DNAr 16S, estimada para cada amostra.

	<i>Micrococcus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Dietzia</i> spp.	<i>Streptomyces</i> spp.	Domínio Bactéria
Água de formação	5,20	$2,46 \cdot 10^{-4}$	$5,64 \cdot 10^{-7}$	$4,71 \cdot 10^{-6}$	ND
Poço 1	5,88	$7,78 \cdot 10^{-4}$	$1,26 \cdot 10^{-6}$	$4,01 \cdot 10^{-5}$	$6,59 \cdot 10^{-6}$
Poço 2	5,34	$6,80 \cdot 10^{-4}$	$2,96 \cdot 10^{-6}$	$6,00 \cdot 10^{-5}$	$2,78 \cdot 10^{-4}$
Poço 3	5,70	$2,04 \cdot 10^{-3}$	$3,98 \cdot 10^{-7}$	$7,14 \cdot 10^{-5}$	$1,45 \cdot 10^{-3}$
Poço 4	5,81	$9,74 \cdot 10^{-4}$	$1,10 \cdot 10^{-5}$	$3,61 \cdot 10^{-5}$	ND
Poço 5	6,11	$3,73 \cdot 10^{-4}$	$1,38 \cdot 10^{-6}$	$3,26 \cdot 10^{-5}$	ND

Conforme mencionado anteriormente neste trabalho, os valores obtidos para a quantificação de *Micrococcus* spp. provavelmente não refletem a abundância destas bactérias nas amostras, mas sim alguma falha que pode ter ocorrido no preparo de duas replicatas do padrão de concentração de $7,5 \eta\text{g}/\mu\text{L}$. Portanto, estes valores devem ser recalculados, desta vez sem que estas replicatas sejam levadas em consideração, para que se obtenha um resultado mais confiável de quantificação.

Considerando que os baixos valores de concentração de DNA a partir das amostras ambientais (Tabela 3) foram obtidos inclusive na reação com os *primers* genéricos para o Domínio Bacteria, acreditamos que a quantidade de DNA recuperado das amostras de petróleo tenha sido infimamente baixa, o que pode ser decorrente da baixa eficiência de obtenção de biomassa a partir das amostras de petróleo, as quais se constituem em matrizes de difícil manipulação, ou de uma baixa abundância de bactérias nos reservatórios de petróleo *in situ*.

Não foi possível, portanto, avaliar se a presença destas bactérias nas amostras de petróleo não degradado se deve a uma menor abundância das mesmas nestes reservatórios. No entanto, o presente trabalho constituiu um primeiro passo para estudos quantitativos utilizando amostras de óleo cru. Aperfeiçoamentos no protocolo de extração de DNA das amostras e também nos ensaios de PCR em tempo real provavelmente resultarão em uma quantificação mais confiável em estudos posteriores.

Vale lembrar que os valores expressos na Tabela 3 não refletem diretamente a quantidade de células nas amostras, uma vez que deve ser levado em consideração o tamanho do gene RNAr 16S para cada grupo de organismos. Além disso, cada grupo taxonômico apresenta um número diferente de cópias do operon para o RNA ribossomal, o que deve ser levado em consideração no momento da estimativa da quantidade de células no ambiente (Nadkarni *et al.*, 2002).

A esse respeito, Fogel *et al.* (1999) fizeram uma busca em literatura com relação ao número de cópias de operons para a subunidade menor ribossomal em diferentes grupos de procariotos, e encontraram dados para 101 táxons. Dentre os grupos encontrados estão 4 espécies de *Streptomyces*, para as quais foram descritas 6 cópias do gene RNAr 16S. No caso de *Bacillus*, os autores encontraram um dado relacionado a *B. cereus*, cujo número de cópias do gene RNAr 16S pode variar de 10 a 12, dependendo da linhagem. Não foram encontrados dados referentes aos gêneros *Micrococcus* e *Dietzia*. Neste caso, os autores sugerem que, salvo algumas exceções, grupos filogeneticamente próximos possam ser usados como comparação, pois o número de cópias deve ser aproximado. Portanto, é provável que *Micrococcus* e *Dietzia* se assemelhem, neste sentido, a *Streptomyces*, todos pertencentes à Classe Actinobacteria.

Fogel *et al.* (1999) discutem, ainda, que seria de se esperar que o tamanho do genoma dos organismos tivesse uma relação direta com a quantidade de cópias de genes RNAr 16S. No entanto, isto não se mostrou verdadeiro em suas análises, havendo organismos com muitas cópias e genomas relativamente pequenos, enquanto o inverso também foi observado.

Existe ainda uma hipótese sobre uma correlação positiva entre a taxa de crescimento do microrganismo e o número de genes para o RNA ribossomal (Fogel *et al.*, 1999; Nadkarni *et al.*, 2002).

Outros estudos, como o de Dionisi *et al.* (2004), encontraram uma quantidade consideravelmente maior de cópias do gene-alvo nas amostras. Estes autores calcularam uma quantidade de $(1,2 \pm 0,6) \times 10^5$ e $(5,4 \pm 0,4) \times 10^7$ de cópias gênicas por grama de amostra. No entanto, como suas amostras eram de sedimento, a extração de DNA das amostras geralmente tem maior rendimento do que o observado para amostras de petróleo. Nesse sentido, os valores de quantificação obtidos no presente estudo corroboram resultados prévios de nosso grupo de pesquisa (Crespim *et al.*, submetido; Oliveira *et al.*, submetido, Sette *et al.*, 2007), nos quais foi verificada uma baixa recuperação de DNA das amostras de óleo, sendo necessária a utilização da estratégia de *nested* PCR para se obter sinal positivo de amplificação de fragmentos de DNAr 16S. Apesar destas dificuldades, uma alta diversidade de microrganismos vem sendo detectada nestas amostras (Sette *et al.*, 2007; Vasconcellos *et al.*, 2006), o que é um incentivo para que sejam aprofundados os estudos e aperfeiçoadas metodologias que permitam entender melhor o papel dos microrganismos nos processos de biodegradação que ocorrem nos reservatórios de petróleo. Além disso, até onde sabemos, este estudo, envolvendo quantificação de populações bacterianas diretamente a partir de amostras de óleo bruto por PCR quantitativo, é inédito. Portanto, novos dados relacionados à dinâmica das populações bacterianas nas amostras de óleo bruto podem vir à tona em estudos futuros.

4. Referências Bibliográficas

- Applied Biosystems* (a). Real-time PCR vs. traditional PCR. Manual explicativo consultado em dez/2007.
- Applied Biosystems* (b). Quantificação absoluta. Manual explicativo consultado em dez/2007.
- Baldwin, B.R.; Nakatsu, C.H.; Nies, L., 2003. Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **69** (6), 3350-3358.
- Crespim, E.; Santos-Neto, E.V.; Oliveira, V.M. Cultivation-independent detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. *International Biodeterioration and Biodegradation*. (submetido)
- Dionisi, H.M.; Chewning, C.S.; Morhan, K.H.; Menn, F-M; Easter, J.P.; Sayler, G.H., 2004. Abundance of dioxygenase genes similar to *Ralstonia* sp. strain U2 *nagAc* is correlated with naphthalene concentrations in coal tar-contaminated freshwater sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **70** (7), 398-3995.

- Fogel, G.B.; Collins, C.R.; Brunk, C.F., 1999. Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microbial Ecology* **38**, 93-113.
- Heid, C.A.; Stevens, J.; Kenneth, J.L.; Williams, P.M., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Methods* **6**, 986-994.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Goodfellow, M.; Stackebrandt, E., (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, John Wiley and Sons, Chichester, pp. 115-147.
- Nadkarni, A.M.; Martin, F.E.; Jacques, N.A.; Hunter, N., 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* **148**, 257-266.
- Nyyssönen, N.; Piskonen, R.; Itävaara, M., 2006. A targeted real-time PCR assay for studying naphthalene degradation in the environment. *Microbial Ecology* **52**, 533-543.
- Pospiech, A.; Neumann, B., 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends in Genetics* **11** (6), 217-218.
- Radwan, S.S.; Sorkhoh, N.A.; Fardoun, F.; Al-Hasan, R.H., 1995. Soil management enhancing hydrocarbon biodegradation in the polluted Kuwaiti desert. *Applied Microbiology and Biotechnology* **44**, 265-270.
- Sette, L.D.; Simioni, K.C.M.; Vasconcellos, S.P.; Dussán, L.J.; Marsaioli, A.J.; Santos-Neto, E.V.; Oliveira, V.M., 2007. Analysis of composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Antonie van Leeuwenhoek* **91**, 253-266.
- Tanaka, Y.; Sogabe, M.; Okumura, K.; Kurane, R., 2002. A highly selective direct method of detecting sulphate-reducing bacteria in crude oil. *Letters in Applied Microbiology* **35**, 242-246.
- Toledo, F.L.; Calvo, C.; Rodelas, B.; González-López, J., 2006. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Systematic and Applied Microbiology* **29** (3), 244-252.
- Vasconcellos, S.P., 2006. Atividades enzimáticas e de biodegradação de microrganismos do petróleo da Bacia de Campos (Pampo Sul), Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.
- Vieira, D.P. Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações, Aula 3 – Análise dos Produtos: Qualitativa e Semi-Quantitativa. Material didático disponível em: <http://www.imtsp.fm.usp.br/Proto/aula3.pdf>, acesso: fev/2008.
- Watanabe, K.; Kodama, Y.; Kaku, N., 2002. Diversity and abundance of bacteria in an underground oil-storage cavity. *BMC Microbiology* **2**, 23.
- Yoshida, N.; Yagi, K.; Sato, D.; Watanabe, N.; Kuroishi, T.; Nishimoto, K.; Yanagida, A.; Katsuragi, T.; Kanagawa, T.; Kurane, R.; Tani, Y., 2005. Bacterial Communities in Petroleum Oil in Stockpiles. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **99**, 143-149.

Capítulo 4: Desenvolvimento de protocolos para a detecção das bactérias *Brevibacillus* spp., *Rhodococcus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. em amostras de petróleo da Bacia de Campos (RJ) por PCR grupo-específico

1. Introdução

O petróleo (do grego *petra* - pedra e *elaion* – óleo, ou latim *oleum* - óleo, Wikipedia, 2006) é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos, incluindo alguns constituintes organometálicos, mais notavelmente vanádio e níquel. Há uma grande variação com relação à composição e às propriedades físicas do petróleo obtido de diferentes reservatórios (Van Hamme *et al.*, 2003).

Várias bactérias que habitam o ambiente marinho são degradadoras de petróleo, sendo geralmente isoladas as degradadoras de alcanos ou compostos aromáticos, tais como tolueno, naftaleno e fenantreno (Harayama *et al.*, 2004). Estes microrganismos têm causado problemas para os engenheiros do petróleo desde o início de sua produção comercial, cerca de 140 anos atrás (Magot *et al.*, 2000). As bactérias sulfato-redutoras, por exemplo, utilizam compostos sulfurosos presentes na água do mar e produzem ácido sulfídrico, que é tóxico aos seres humanos e corrói tubulações e tanques de petróleo. Há também os microrganismos que proliferam em poços de petróleo, bloqueando os poros das rochas reservatório e reduzindo sua permeabilidade; e ainda há aqueles que inativam produtos químicos que são adicionados para facilitar operações de produção e aumentar a durabilidade dos reservatórios (Bass e Lapping-Scott, 1997).

No entanto, existem microrganismos que produzem, durante seu crescimento, substâncias úteis que aumentam a recuperação do óleo, tais como solventes, ácidos, gases, surfactantes e biopolímeros. Além disso, alguns produzem metabólitos que inibem o crescimento das bactérias sulfato-redutoras, enquanto estimulam o crescimento das metanogênicas (Bass e Lapping-Scott, 1997).

O desenvolvimento de metodologias moleculares independentes de cultivo, baseadas na extração direta de ácidos nucleicos de amostras ambientais, associadas às técnicas de PCR, clonagem e seqüenciamento, vem permitindo uma avaliação mais precisa da diversidade microbiana no ambiente e a descoberta de novos grupos de organismos, nunca antes cultivados. Estas técnicas moleculares têm sido cada vez mais utilizadas como ferramenta para

a avaliação da diversidade de microrganismos em amostras ambientais, contornando os problemas associados aos métodos de isolamento e cultivo tradicionais (Coutinho *et al.*, 2001).

Em microbiologia do petróleo, a aplicação de técnicas moleculares é ainda pouco difundida. Uma caracterização abrangente da microbiota em amostras de água de formação e de injeção foi conduzida por alguns autores através da construção de bancos de DNAr 16S, resultando na descoberta de novos grupos de bactérias e arqueias em campos de petróleo e abrindo novas perspectivas para o estudo de comunidades microbianas associadas ao óleo (Voordouw *et al.*, 1996; Orphan *et al.*, 2000). Considerando que apenas uma pequena fração da diversidade microbiana na natureza pode ser cultivada (Pace, 1997; Hugenholtz *et al.*, 1998), estudos que utilizam uma abordagem independente de cultivo são de grande relevância em ambientes extremos, como aqueles representados por reservatórios de petróleo profundos.

O desenvolvimento de um método molecular para a detecção rápida da presença de microrganismos com potencial para degradar hidrocarbonetos do petróleo seria extremamente útil como ferramenta de apoio para a determinação da qualidade dos óleos em reservatórios de águas profundas.

Com base nos resultados de caracterização da comunidade de bactérias associadas ao petróleo, realizada na primeira fase do Projeto CTPetro (Sette *et al.*, 2007), e nos estudos de degradação realizados com bactérias isoladas das amostras de água de formação e óleo (conduzidos pelo grupo de pesquisa liderado pela Dra. Anita Marsaioli, Instituto de Química/UNICAMP, colaborador do projeto), a presente proposta teve como objetivo o desenvolvimento de um protocolo experimental para a detecção dos gêneros *Brevibacillus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, em amostras de petróleo da Bacia de Campos, utilizando *primers* grupo-específicos em reações de PCR.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta das amostras de petróleo e água de formação

Amostras de petróleo de cinco poços da Bacia de Campos (Rio de Janeiro, RJ), Plataforma Pampo, e uma amostra de água de formação, foram coletadas em julho de 2005, em parceria com a Petrobras (CENPES). Cada amostra foi coletada em triplicata utilizando garrafas Schott esterilizadas. As amostras foram transportadas em gelo até o laboratório, onde foram mantidas à temperatura ambiente até o seu processamento.

As características referentes a cada poço de petróleo encontram-se listadas na tabela a seguir.

Tabela 1. Características dos reservatórios de petróleo analisados neste estudo.

Reservatórios de petróleo	1	2	3	4	5
Nível de biodegradação	Não biodegradado	Altamente biodegradado	Moderadamente biodegradado	Altamente biodegradado	Não biodegradado
Temperatura	82 °C	71 °C	62 °C	62 °C	85 °C
Profundidade	2405-2588 m	1988-2222 m	3023 m	2066 m	3070-3286 m

2.2. Aquisição, cultivo e extração do DNA das linhagens bacterianas

Com base nos microrganismos definidos como grupos-alvo e nos grupos de bactérias a serem usados como controles negativo e positivo nas reações de PCR, uma lista de linhagens-tipo de bactérias foi elaborada. Estas linhagens foram adquiridas de Coleções de Culturas nacionais e internacionais, conforme descrito na Tabela 2.

Estas bactérias foram cultivadas em condições e meios de cultura apropriados – sugeridos pelas coleções de cultura que as forneceram ou pela Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas de Células DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*). Após a verificação da pureza das linhagens por análises macro e microscópicas, o DNA foi extraído com base no protocolo descrito por Pitcher *et al.*, 1989 (Anexo 1). Nos casos em que tal protocolo não se mostrou efetivo, foi utilizado aquele descrito por Young e Blakesley, 1991 (Anexo 2), cuja lise é baseada na digestão com proteinase K a 55°C, ou o protocolo descrito por Pospiech e Neumann, 1995 (Anexo 3), cujo método de lise se baseia em longo tempo de incubação em lisozima e proteinase K. A concentração de DNA de cada linhagem foi estimada através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e documentado através do equipamento *UVP BioImaging System GDS-8000* (UVP, Upland, CA, USA), utilizando-se um padrão de concentração (DNA do fago lambda, Invitrogen). A qualidade do DNA isolado das linhagens foi confirmada por PCR com *primers* genéricos bacterianos. As bactérias foram então criopreservadas a -80°C, em solução de glicerol 10%, para experimentos subsequentes.

Tabela 2. Bactérias utilizadas no presente estudo como controles positivo e negativo nas reações de PCR

Linhagens de bactérias	Taxonomia	Cultivo
<i>Acinetobacter baumannii</i> INCQS 00143	γ -proteobacteria	37°C, meio NA
<i>Acinetobacter</i> sp. INCQS 87	γ -proteobacteria	37°C, meio TSA (BBL 11042) com 5% de glicerol
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> CCT 0050	γ -proteobacteria	30 °C, meio NA
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> CBMAI 709	β -proteobacteria	28°C, meio NA
<i>Alkanindiges illinoisensis</i> DSM 15370 ^T	γ -proteobacteria	28 °C, meio 381, placas de ágar com 1% hexadecano
<i>Bacillus pumilus</i> CBMAI 638	Eubacteria, Firmicutes	28°C, meio NA
<i>Bacillus licheniformis</i> INCQS 107	Eubacteria, Firmicutes	37°C, meio NA
<i>Brevibacillus brevis</i> DSM 30 ^T	Eubacteria, Firmicutes	28 °C, meio 1
<i>Brevibacillus brevis</i> CCGB LFB-FIOCRUZ 52	Eubacteria, Firmicutes	35°C, meio NA
<i>Brevibacillus limnophilus</i> DSM 6472 ^T	Eubacteria, Firmicutes	40 °C, meio 453, com 10 mg/L MnSO ₄
<i>Brevibacillus</i> sp. CBMAI 708	Eubacteria, Firmicutes	28°C, NA
<i>Burkholderia cepacia</i> INCQS 400	β -proteobacteria	30°C, NA
<i>Dietzia maris</i> DSM 43672 ^T	Actinomiceto	28 °C, meio 65
<i>Dietzia maris</i> DSM 44747	Actinomiceto	28 °C, meio 535
<i>Dietzia natronolimnaea</i> DSM 44860 ^T	Actinomiceto	28 °C, meio 535
<i>Escherichia coli</i> INCQS 310 ^T	γ -proteobacteria	37°C, meio NA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CBMAI 701	γ -proteobacteria	28°C, meio 2
<i>Pseudomonas oleovorans</i> CBMAI 703	γ -proteobacteria	28°C, meio 2
<i>Pseudomonas stutzeri</i> CBMAI 460	γ -proteobacteria	30°C, meio NA
<i>Rhizobium radiobacter</i> IBSBF 1874	α -proteobacteria	28°C, meio NA
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 43066 ^T	Actinomiceto	28 °C, meio 65
<i>Rhodococcus opacus</i> DSM 43205 ^T	Actinomiceto	28 °C, meio 65
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> DSM 44107 ^T	Actinomiceto	28 °C, meio 65 ou 535
<i>Streptomyces drosdowiczii</i> CBMAI 498	Actinomiceto	28°C, meio ISP2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> CBMAI 317	γ -proteobacteria	30°C, meio NA

2.3. Teste de especificidade dos *primers in silico* (*Probe Match*)

A especificidade dos *primers* utilizados neste projeto foi testada *in silico*, empregando-se a ferramenta *Probe Match* do RDP (*Ribosomal Database Project*) – Release 9, acessada na página <http://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp>.

2.4. Extração de DNA das amostras ambientais

Inicialmente, os frascos contendo amostras de óleo muito viscosas (originadas dos poços 2, 3 e 4) foram aquecidos a 70°C durante 20 minutos, para facilitar a retirada das amostras. As alíquotas foram retiradas com pipetas descartáveis de 20 mL sob fluxo contínuo de nitrogênio, a fim de evitar a entrada de oxigênio e possíveis alterações das comunidades microbianas.

O DNA da comunidade microbiana de pelo menos uma replicata de cada amostra de petróleo foi extraído utilizando-se o *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), de acordo com o protocolo descrito por Tanaka *et al.* (2002), com algumas modificações, as quais incluíram um pré-tratamento das amostras com isooctano, conforme sugerido por Yoshida *et al.* (2005). O protocolo final está descrito no capítulo 1 (“*Cultivation-independent detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin*”) desta dissertação.

A extração de DNA com o *QIAamp DNA Stool Mini Kit* gerou 10 a 14 replicatas, as quais foram ao final concentradas e purificadas utilizando-se mini-colunas (*GFX PCR DNA and gel band purification kit*, GE Healthcare) e suspensas em 40 µL de água Milli Q.

O resultado da extração de DNA a partir das amostras de óleo foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Após a eletroforese, o gel foi corado com *Sybr Green I* (*Molecular Probes*) por uma hora no escuro e documentado utilizando-se o sistema UVP BioDot-It™.

Para a obtenção do DNA da comunidade bacteriana a partir da amostra de água de formação, foi utilizado um protocolo descrito pelo Dr. B. Patel (comunicação pessoal). Várias modificações foram introduzidas ao protocolo, a fim de adaptá-lo para as amostras em estudo.

O protocolo otimizado partiu de um volume inicial de 20 mL de amostra de água de formação. Deste volume, 10 mL foram distribuídos em cinco microtubos (2,0 mL em cada). As amostras foram centrifugadas a 5700 *g* por 10 min, sendo o sobrenadante descartado quase na sua totalidade. Os 10 mL restantes foram distribuídos, em seguida, entre estes mesmos cinco tubos, a fim de aumentar a biomassa microbiana para a extração de DNA. Após nova

centrifugação, o sobrenadante foi descartado, deixando alíquotas de 50 µL de amostra em cada tubo. Após a suspensão do precipitado do primeiro tubo em 450 µL de tampão TE, esta solução foi transferida para o segundo tubo, a fim de suspender as células precipitadas, e assim sucessivamente com os tubos restantes. O volume final obtido foi cerca de 800 µL.

Este tubo foi centrifugado (12900 *g*/10 min) novamente e o sobrenadante, descartado, deixando cerca de 50 µL de amostra. Foram acrescentados 450 µL de tampão TE e as células foram suspensas neste tubo único.

Adicionou-se lisozima na concentração final de 1,6 mg/mL e o tubo foi incubado a 37 °C por 1 h 30 min. A seguir, adicionou-se SDS na concentração final de 0,5% e proteinase K na concentração final 0,4 µg/µL. A solução foi incubada a 50 °C por 1 h 30 min. Foram acrescentados 100 µL de NaCl 5 M e 80 µL de CTAB (concentração estoque CTAB 10%, NaCl 0,7 M). O conteúdo do tubo foi misturado e incubado a 65 °C por 10 min. A solução foi extraída com cerca de 750 µL de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1), e, a seguir, com clorofórmio:álcool-isoamílico (24:1). A precipitação do DNA se deu com 450 µL de isopropanol e centrifugação por 15 min a 12900 *g*. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o precipitado, lavado com 200 µL de etanol 70%. Depois de seco, o DNA foi suspenso em 30 µL de tampão TE. Finalmente, a solução de DNA foi tratada com 1 µL de RNase (solução estoque 10 mg/mL) e incubada em banho-maria por 1 hora a 37°C.

A integridade e a concentração do DNA foram confirmadas através de visualização em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio sob luz ultravioleta.

O DNA obtido foi a seguir utilizado em reações de PCR para verificação da amplificabilidade. Os *primers* universais utilizados nestas reações, homólogos a regiões conservadas do gene RNAr 16S para o Domínio Bactéria, foram o 27f e o L1401r (Tabela 3), e o programa de amplificação utilizado consistiu em 1 ciclo a 95 °C por 2 minutos; 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 3 minutos; e 1 ciclo de extensão final a 72 °C por 3 minutos.

Tabela 3. *Primers* genéricos bacterianos utilizados neste trabalho.

Código	Seqüência (5' - 3')	Aplicação	Referência
p10f	GAG TTT GAT CCT GGC TCA G	DNAr 16S do Domínio Bactéria	Lane, 1991
p27f	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	DNAr 16S do Domínio Bactéria	Lane, 1991
p1100r	AGG GTT GGG GTG GTT G	DNAr 16S do Domínio Bactéria	Lane, 1991
L1401r	CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG	DNAr 16S do Domínio Bactéria	Heuer <i>et al.</i> , 1997

2.5. Testes de especificidade dos *primers* em reações de PCR

Foram feitos testes de ciclagem térmica e condições de reação, tomando como ponto de partida protocolos descritos na literatura, para a detecção dos gêneros *Brevibacillus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, e *Acinetobacter*. Os *primers* grupo-específicos utilizados nesta etapa do projeto encontram-se listados na Tabela 4.

• PCR para a detecção de bactérias do gênero *Brevibacillus*

A reação de PCR para a detecção específica de *Brevibacillus* foi realizada utilizando-se os *primers* pBREV 174F (Shida *et al.*, 1996; Tabela 4) e pL1401r (Heuer *et al.*, 1997; Tabela 3). Neste caso, apenas o *primer* pBREV 174F é utilizado como *primer* específico para o gênero *Brevibacillus*.

A amplificação foi realizada em reações de 25 µL, contendo cerca de 50 ng de DNA de linhagem controle, 2 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 1X tampão da *Taq* (Invitrogen), 200 µM de uma mistura de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ e 0,4 µM de cada *primer*.

O programa de ciclagem térmica utilizado para as reações de PCR para a detecção específica de *Brevibacillus* consistiu em uma etapa inicial a 94 °C por 30 s; 25 ciclos de 94 °C por 1 min, 58 °C por 90 s e 72 °C por 90 s; 1 etapa final a 72 °C por 5 min.

• PCR para a detecção de bactérias do gênero *Rhodococcus*

Para este PCR, foram utilizados os *primers* pRo1 e pRo2, descritos por Bell *et al.* (1999) e listados na Tabela 4.

Em um volume final de 25 µL, as reações continham cerca de 50 ng de DNA de linhagem controle, 2 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 1X tampão da *Taq* (Invitrogen), 200 µM de uma mistura de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ e 0,4 µM de cada *primer*.

O programa de ciclagem térmica foi definido com base naquele descrito por Bell *et al.* (1999). Entretanto, alguns ajustes foram necessários a fim de obter sinais positivos de amplificação mais claros. O programa estabelecido consistiu, portanto, em uma etapa inicial a 95 °C por 10 min; 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 57 °C por 1 min e 72 °C por 1 min; e uma etapa final de 72 °C por 10 min.

- **PCR para a detecção de bactérias do gênero *Pseudomonas***

Para a detecção de *Pseudomonas*, foram utilizados os *primers* pPs-for e pPs-rev, descritos por Widmer *et al.* (1998) para amplificação de uma região do gene RNAr 16S específica deste gênero.

As reações de amplificação (volume final de 25 µL) continham cerca de 50 ng de DNA de linhagem controle, 2 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 1X tampão da *Taq* (Invitrogen), 200 µM de uma mistura de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂ e 0,2 µM de cada *primer*.

Com base nos testes de programas de ciclagem térmica descritos por estes autores, foram feitos ensaios envolvendo a variação da temperatura de anelamento dos *primers* ao DNA molde. O programa de PCR estabelecido consiste em uma etapa inicial a 95 °C por cinco minutos; 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 61 °C por 1 minuto e 72 °C por 90 segundos; e uma etapa de extensão final a 72 °C por 10 minutos.

- **PCR para a detecção de *Acinetobacter***

O mesmo tipo de teste comentado acima foi realizado para o *primer* S-ACA23a (Zimmermann *et al.*, 2001), a partir do protocolo descrito pelos autores, a fim de ajustar as condições de amplificação para *Acinetobacter* spp. Como a quantificação em gel de agarose revelou que a concentração do *primer* estava < 5 µM, foi utilizado 1 µL da solução estoque deste oligonucleotídeo e 0,4 µM do *primer* 27f (Lane, 1991) por reação de 25 µL. Além dos *primers* e DNA de linhagem controle, as reações de amplificação continham 2 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 1X tampão da *Taq* (Invitrogen), 200 µM de uma mistura de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂.

O programa de ciclagem térmica que ficou estabelecido para a detecção específica de *Acinetobacter* spp., ao final dos testes, consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos; 4 ciclos de *touch down*: 94°C por 1 minuto, 63°C por 45 segundos (diminuindo 0,5°C por ciclo) e 72°C por 2 minutos; 25 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 61°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos; uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

2.6. Detecção de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos nas amostras ambientais através de PCR gênero-específico

Após o estabelecimento dos protocolos de PCR, os conjuntos de *primers* específicos foram usados para a detecção dos grupos-alvo nas amostras ambientais.

A estratégia de *nested* PCR foi usada com o DNA ambiental obtido das amostras de óleo e água de formação. Dois conjuntos de *primers* foram usados para cada grupo alvo. Na primeira reação de PCR, as seqüências de genes RNAr 16S foram amplificadas usando os *primers* genéricos para o Domínio Bacteria 27f e L1401r (Tabela 3) quando *Rhodococcus* era o grupo-alvo, e 10f e 1100r quando o grupo-alvo era *Pseudomonas*.

A amplificação foi realizada em reações de 50 µL contendo 5 µL de DNA ambiental, 2 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 1X tampão da *Taq* (Invitrogen), 200 µM de uma mistura de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂ e 0,4 µM de cada *primer*, em termociclador Eppendorf. O programa de ciclagem térmica consistiu de um passo inicial de desnaturação a 95°C por 2 min; 30 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 3 min; seguido de uma extensão final a 72°C por 3 min. Na segunda reação de PCR, alíquotas de 5 µL dos produtos do primeiro PCR foram usadas como DNA-molde nas reações (25 µL) independentes subseqüentes, com os *primers* grupo-específicos e protocolos descritos acima. Os resultados foram documentados após eletroforese em gel de agarose 1%, como descrito anteriormente.

3. Resultados e Discussão

3.1. Definição dos *primers* grupo-específicos

Com base em levantamento bibliográfico, foram definidos conjuntos de *primers* para quatro grupos de bactérias consideradas degradadoras de hidrocarbonetos, ou cujos ensaios realizados pelo grupo da Dra. Anita Marsaioli (IQ) mostraram resultados positivos de degradação, a saber: *Acinetobacter* spp., *Brevibacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Rhodococcus opacus* (Tabela 4). À exceção do oligonucleotídeo S-ACA23a, usado como sonda no estudo de Zimmermann *et al.* (2001), todos os outros oligonucleotídeos citados na Tabela 4 haviam sido usados como *primers* em estudos anteriores. O oligonucleotídeo S-ACA23a foi utilizado como *reverse primer* em nosso laboratório, usando o *primer* p27f como *forward primer* na reação de PCR tendo o gênero *Acinetobacter* como grupo-alvo. Além deste, apenas o *primer forward* pBREV174F, para o gênero *Brevibacillus*, foi específico na reação de PCR, sendo que o segundo consistiu em um *primer* genérico para o Domínio Bactéria (1401r; Heuer *et al.*, 1997).

Tabela 4. *Primers* encontrados na literatura empregados nos experimentos de detecção por PCR de grupos específicos de microrganismos nas amostras de água de formação e óleo.

<i>Primers</i>	Seqüência (5'-3')	Posição	Especificidade
S-ACA23a	ATCCTCTCCCATACTCTA	634-617 ^a	<i>Acinetobacter</i>
pBREV174F	AGACCGGGATAACATAGGGAACTTAT	148-174	<i>Brevibacillus</i>
pPs-for	GGTCTGAGAGGATGATCAGT	292-311 ^b	<i>Pseudomonas</i>
pPs-rev	TTAGCTCCACCTCGCGGC	1263-128 ^b	
pRo1	TATGACCTTCGGCTGCATGGCTGAG	179-202 ^b	<i>Rhodococcus opacus</i>
pRo2	CCGTATCGCCTGGAAGCTCGAG	623-644 ^b	

^a: posição relativa ao DNAr 16S de *Acinetobacter* sp. linhagem ANT9054 (nº. de acesso no Genbank AY167273); ^b: posição relativa ao DNAr 16S de *E. coli*.

3.2. Testes de especificidade dos primers *in silico*

Observou-se que todos os *primers* detectaram seu grupo-alvo de bactérias; entretanto, a especificidade não foi absoluta, pois em certos casos, alguns poucos grupos taxonomicamente relacionados ao organismo de interesse foram listados como apresentando homologia à seqüência dos *primers*. Isto foi verificado principalmente para a sonda S-ACA23a, utilizada para a detecção de *Acinetobacter*, e os *primers* pPs-for e pPs-rev, empregados para a detecção de *Pseudomonas*. No caso destes *primers*, algumas Ordens e Classes fora do grupo-alvo foram também detectadas pela ferramenta *Probe Match* do RDP.

Já o *primer* pBREV174F, para a detecção de *Brevibacillus*, e os *primers* pRo1 e pRo2, designados neste para a detecção de *Rhodococcus* (principalmente *R. opacus* e *R. wratislaviensis*), apresentaram alta especificidade.

Neste sentido, foram utilizadas como controles negativos nas reações de PCR linhagens que representassem várias Classes do Domínio Bactéria, assim como linhagens de táxons filogeneticamente relacionados ao grupo-alvo.

3.3. Extração de DNA das linhagens referência bacterianas

O DNA isolado das linhagens de bactérias adquiridas das Coleções de Culturas mostrou-se puro o suficiente para ser amplificado por PCR. Na Figura 1, observa-se o resultado da amplificação do DNA de *Dietzia* e *Rhodococcus* (a título de exemplo) com *primers* universais para o Domínio Bactéria.

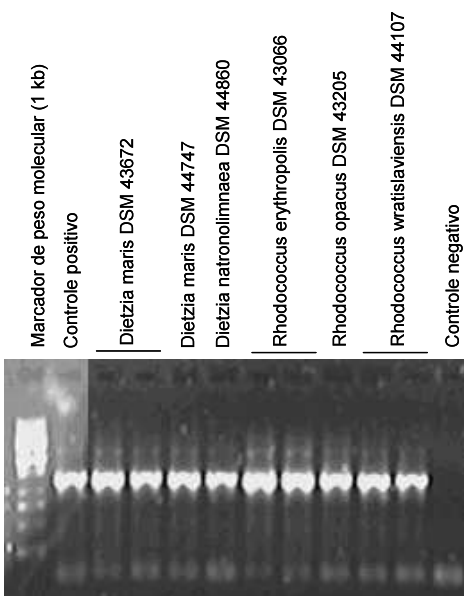


Figura 1. Eletroforese dos produtos de PCR do DNAr 16S amplificados a partir do DNA genômico de *Dietzia* e *Rhodococcus* utilizando *primers* genéricos para o Domínio Bactéria.

3.4. Extração de DNA das amostras ambientais

O resultado da extração de DNA do óleo foi visualizado após eletroforese em gel de agarose 0,8%. Não foi observado DNA das amostras neste gel (dados não mostrados), o que já era esperado de acordo com os resultados do projeto CTPetro anterior, os quais revelaram que o DNA da comunidade de bactérias obtido estava abaixo do limite de detecção do gel de agarose. Portanto, prosseguiu-se com a técnica de amplificação do DNA ribossomal 16S de bactérias, a fim de confirmar a presença destas nas amostras.

Os resultados do PCR revelaram a presença de bactérias nas amostras de óleo, confirmada pelo sinal fraco de amplificação observado após a primeira reação de PCR (Figura 2) utilizando os *primers* p10f e p1100r, que são genéricos para o Domínio Bactéria (Tabela 3).

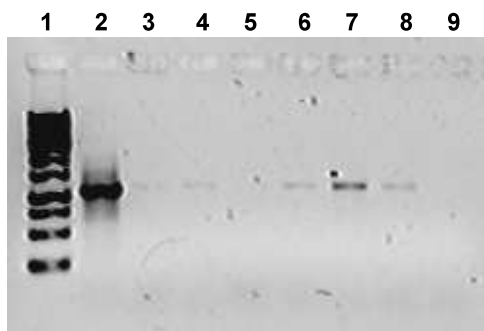


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR para o Domínio Bactéria, utilizando os *primers* 10f e 1100r, a partir de DNA das amostras do petróleo. Canaletas: **1**, marcador de peso molecular (*1 kb DNA ladder*, Fermentas); **2**, DNA de *Streptomyces venezuelae* (controle positivo de amplificação); **3 a 8**, DNA das amostras ambientais, respectivamente: água de formação, poços 1, 2, 3, 4 e 5; **9**, controle negativo do PCR (sem DNA).

Os resultados da extração de DNA a partir da água de formação, por outro lado, permitiram a visualização do DNA total de comunidade após eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A concentração do DNA obtido foi estimada em cerca de 40 ng/ μ L.

Resultados positivos de amplificação do DNA total isolado da amostra de água de formação foram obtidos quando diluições de 1:50 e 1:100 da solução de DNA foram empregadas nas reações de PCR (Figura 3).

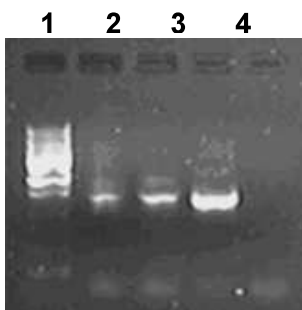


Figura 3. Produtos de PCR do DNAr 16S do Domínio Bactéria amplificados a partir do DNA total isolado da amostra de água de formação. Canaletas: **1**, padrão de peso molecular *1Kb DNA ladder* (Fermentas); **2 e 3**, DNA obtido da amostra de água de formação utilizado como molde nas diluições 1:50 e 1:100, respectivamente; **4**, DNA de *Streptomyces venezuelae*, utilizado como controle positivo de amplificação; **5**, controle negativo da reação de PCR sem DNA (tubo branco).

Estes resultados positivos permitiram que o DNA total da microbiota do óleo e da água de formação fosse utilizado em experimentos subseqüentes para detecção dos grupos-alvo de bactérias neste projeto.

3.5. Testes de especificidade dos *primers* em reações de PCR

Foram feitos testes de ciclagem térmica e condições de reação, tomando como ponto de partida protocolos descritos na literatura, para a detecção dos gêneros *Brevibacillus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. Os *primers* grupo-específicos utilizados nesta etapa do projeto encontram-se listados na Tabela 4.

- **PCR para a detecção de *Brevibacillus* spp.**

O programa de ciclagem térmica descrito pelos autores mostrou-se bastante efetivo em seu propósito, sendo que somente o DNA de *Brevibacillus* sp. CBMAI 708, utilizado como controle positivo, apresentou sinal de amplificação, produzindo um fragmento de cerca de 1200 pb (Figura 4), conforme esperado.

Vale mencionar que o DNA de uma bactéria adquirida da Coleção de Culturas CCGB, recebida como sendo *Brevibacillus brevis* LFB-FIOCRUZ 52, não apresentou resultado positivo de amplificação (Figura 4). Verificou-se, posteriormente, por seqüenciamento parcial do DNAr 16S, que esta pertencia na realidade à espécie *Bacillus pumilus*, grupo bacteriano filogeneticamente próximo ao *Brevibacillus*. Isto explica por que esta linhagem não apresentou sinal positivo de amplificação utilizando os *primers* e condições de reação estabelecidas para o gênero *Brevibacillus* neste trabalho.

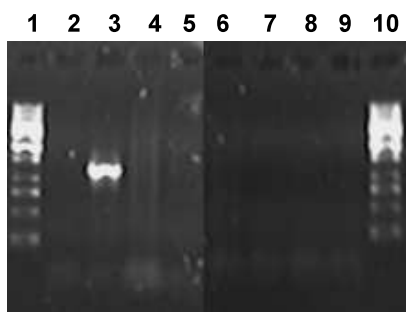


Figura 4. Eletroforese dos produtos de PCR amplificados a partir do DNA genômico de linhagens de bactérias utilizando os *primers* específicos para o gênero *Brevibacillus*. Canaletas: **1 e 10**, marcador de peso molecular (*1Kb DNA ladder*, Fermentas); **2**, *Brevibacillus brevis* CCGB LFB-FIOCRUZ 52; **3**, *Brevibacillus* sp. CBMAI 708; **4 a 8**, linhagens bacterianas utilizadas como controles negativos, respectivamente: *Bacillus licheniformis* INCQS 107, *Rhizobium radiobacter* IBSBF 1874, *Burkholderia cepacia* INCQS 400, *Escherichia coli* INCQS 310 e *Streptomyces drosdowiczii* CBMAI 498; **9**, controle da reação de PCR sem DNA (tubo branco).

Embora este resultado sugira que o programa de ciclagem térmica para a detecção de *Brevibacillus* nas amostras já esteja definido, seria necessário fazer um teste de amplificação com mais controles positivos, para se ter um resultado mais confiável e definitivo.

- **PCR para a detecção de bactérias do gênero *Rhodococcus***

Os *primers* pRo1 e pRo2, descritos por Bell *et al.* (1999) e listados na Tabela 4, foram desenhados e empregados pelos autores visando à detecção especificamente de *Rhodococcus opacus*. No entanto, testes *in silico* utilizando a ferramenta *Probe Match* do RDP revelaram que sua aplicação abrange também a detecção de linhagens de *Rhodococcus wratislaviensis*. Como no projeto CTPetro fase I, o seqüenciamento de clones da biblioteca de genes RNAr 16S revelou a presença de bactérias filogeneticamente relacionadas a estas duas espécies bacterianas em amostras de petróleo, o uso dos *primers* pRo1 e pRo2 nas amostras do presente projeto tornou-se bastante conveniente.

O programa de ciclagem térmica descrito pelos autores e utilizado neste trabalho apresentou considerável especificidade, sendo que somente foi observado sinal de amplificação para os controles positivos: *Rhodococcus opacus* e *Rhodococcus wratislaviensis* (dados não mostrados). No entanto, o sinal de amplificação apresentou-se relativamente fraco. Com os ajustes realizados no programa de ciclagem térmica, verificou-se a obtenção de uma banda mais nítida de amplificação para os controles positivos (Figura 5). Os nossos resultados confirmaram que o par de *primers* utilizado também é capaz de detectar *Rhodococcus wratislaviensis*. Além disso, um representante de outra espécie do gênero *Rhodococcus* – *R. erythropolis* – também apresentou sinal de amplificação, ainda que mais fraco, com as novas condições de PCR.

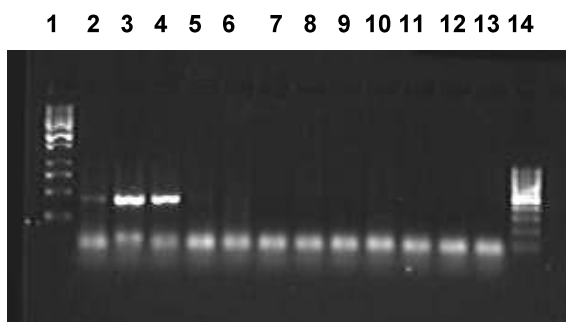


Figura 5. Eletroforese dos produtos de PCR amplificados a partir do DNA genômico de linhagens de bactérias utilizando os *primers* específicos para o gênero *Rhodococcus*. Canaletas: **1**, marcador de peso molecular (*1 kb DNA ladder*, Fermentas); **2**, *Rhodococcus erythropolis* DSM 43066; **3 e 4**, linhagens utilizadas como controles positivos, respectivamente: *R. opacus* DSM 43205 e *R. wratislaviensis* DSM 44107; **5 a 12**, linhagens utilizadas como controles negativos, respectivamente: *D. maris* DSM 43672, *D. maris* DSM 44747, *D. natronolimnaea* DSM 44860, *S. drosdowiczii* CBMAI 498, *B. licheniformis* INCQS 107, *R. radiobacter* IBSBF 1874, *B. cepacia* INCQS 400 e *E. coli* INCQS 310; **13**, controle da reação de PCR sem DNA; **14**, marcador de peso molecular (*100 bp DNA ladder*, Fermentas).

- **PCR para a detecção de bactérias do gênero *Pseudomonas***

Quatro bactérias foram utilizadas, a princípio, como controles positivos para a reação de PCR específica para este gênero, a saber: *Pseudomonas aeruginosa* CBMAI 701, *Pseudomonas putida* IBSBF 1119, *Pseudomonas stutzeri* CCT 4826 e *Pseudomonas oleovorans* CBMAI 703. No entanto, não obtivemos sucesso na amplificação de *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas stutzeri*, inclusive após purificação do DNA ou diminuição da estringência do programa de ciclagem térmica (dados não mostrados). Foi feito um seqüenciamento parcial do DNAr 16S destas bactérias, que revelou que, na realidade, a primeira pertencia ao gênero *Achromobacter* e a segunda era *Stenotrophomonas maltophilia*.

A linhagem *P. stutzeri* CCT 4826 foi substituída por *P. stutzeri* CBMAI 460. Esta última apresentou um nítido sinal de amplificação com o programa utilizado, bem como as linhagens de *P. aeruginosa* e *P. oleovorans*, como pode ser observado na Figura 6. O fragmento de DNA amplificado apresentou o tamanho esperado (971 pb).

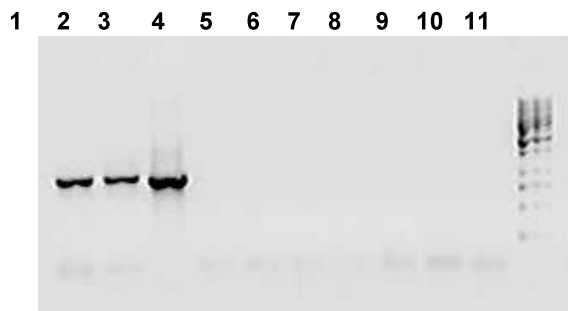


Figura 6. Eletroforese dos produtos do PCR específico para a detecção de *Pseudomonas* spp. Canaletas: **1 a 3**, linhagens utilizadas como controles positivos, respectivamente: *Pseudomonas aeruginosa* CBMAI 701, *Pseudomonas oleovorans* CBMAI 703 e *Pseudomonas stutzeri* CBMAI 460; **4 a 9**, controles negativos, respectivamente: *Burkholderia cepacia* INCQS 00400, *Rhizobium radiobacter* IBSBF 1874, *Stenotrophomonas maltophilia* CBMAI 317, *Escherichia coli* INCQS 00310, *Streptomyces drosdowiczii* CBMAI 498 e *Achromobacter xylosoxidans* CBMAI 709; **10**, controle da reação de PCR sem DNA; **11**, marcador de peso molecular (1 kb DNA ladder, Fermentas).

- **PCR para a detecção de *Acinetobacter* spp.**

Após todos os testes de ajustes das condições de reação e de ciclagem térmica para a detecção específica de *Acinetobacter* spp., uma das espécies bacterianas utilizadas como controle negativo para este PCR apresentou um sinal de amplificação quase tão nítido quanto aquele obtido para os controles positivos (Figura 7, canaleta 5). Esse fato se justifica por ser esta espécie – *Alkanindiges illinoisensis* – muito próxima filogeneticamente das bactérias do gênero *Acinetobacter*. Neste sentido, o gene RNAr 16S, usado como marcador molecular para

a reação de PCR, é praticamente idêntico entre estas espécies. Isto foi confirmado pelo alinhamento dos *primers* com as seqüências do gene RNAr 16S de *A. illinoisensis* e de três espécies de *Acinetobacter*, utilizando o programa ClustalX (dados não mostrados). Com estes testes *in silico*, pudemos verificar que de fato este par de *primers* pode detectar também *Alkanindiges illinoisensis*. Assim, o protocolo de PCR desenvolvido pode ser aplicado para a detecção de *Acinetobacter* spp. e gêneros que forem proximamente relacionados a este.

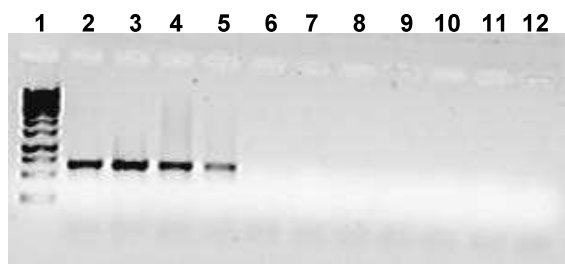


Figura 7. Eletroforese dos produtos de PCR amplificados a partir do DNA genômico de linhagens de bactérias utilizando os *primers* específicos para o gênero *Acinetobacter*. Canaletas: **1**, marcador de peso molecular (*1 Kb DNA ladder*, Fermentas); **2 a 4**, linhagens utilizadas como controles positivos, respectivamente: *Acinetobacter* sp. INCQS 87, *Acinetobacter baumannii* INCQS 00143 e *Acinetobacter calcoaceticus* CCT 0050; **5 a 11**, linhagens utilizadas como controles negativos, respectivamente: *Alkanindiges illinoisensis* DSM 15370, *Burkholderia cepacia* INCQS 00400, *Rhizobium radiobacter* IBSBF 1874, *Stenotrophomonas maltophilia* CBMAI 317, *Escherichia coli* INCQS 00310, *Streptomyces drosdowiczii* CBMAI 498 e *Bacillus pumilus* CBMAI 638; **12**, controle da reação de PCR sem DNA.

3.6. Detecção de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos nas amostras ambientais através de PCR gênero-específico

Quando a solução de DNA ambiental foi utilizada como molde em reações de PCR grupo-específico, sinais positivos de amplificação puderam, apenas em alguns casos, ser detectados após a primeira reação de PCR (dados não mostrados). No entanto, como na maioria dos casos as reações de PCR gênero-específicas não apresentaram nenhum sinal de amplificação, decidimos utilizar a estratégia de *nested* PCR para todas as reações de detecção específica.

- **Detecção de *Rhodococcus* spp.**

Conforme citado acima, para a detecção de bactérias do gênero *Rhodococcus* nas amostras ambientais, foi utilizada a estratégia de *nested PCR*. Não foi observado sinal positivo de amplificação do tamanho esperado nas amostras ambientais analisadas (Figura 8, canaletas 5 a 7), o que pode sugerir a ausência de bactérias deste gênero nas amostras de óleo dos

poços 4 e 5 e da água de formação, ou talvez estas estejam em abundância muito baixa, isto é, abaixo do limite de detecção da metodologia adotada no presente projeto. Vale lembrar que estas bactérias foram anteriormente encontradas em amostras de óleo por nosso grupo de pesquisa utilizando uma estratégia independente de cultivo baseada em clonagem e seqüenciamento de fragmentos do gene RNAr 16S (Oliveira *et al.*, submetido).

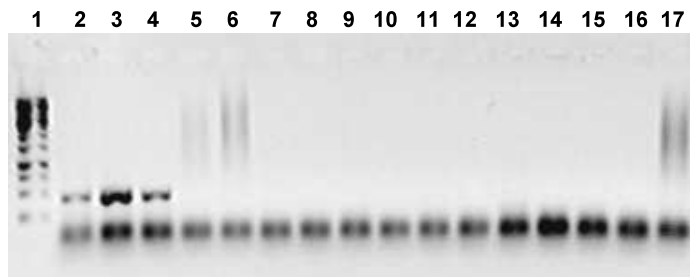


Figura 8. PCR para a detecção de *Rhodococcus* spp. Canaletas: **1**, marcador de peso molecular (1 kb DNA ladder, Fermentas); **2 a 4**, linhagens utilizadas como controles positivos, respectivamente: *R. erythropolis* DSM 43066, *R. opacus* DSM 43205 e *R. wratislaviensis* DSM 44107; **5 a 7**, nested PCR do DNA obtido a partir dos poços 4 e 5, e da água de formação, respectivamente; **8 a 15**, controles negativos, respectivamente: *D. maris* DSM 43672, *D. maris* DSM 44747, *D. natronolimnaea* DSM 44860, *S. drosdowiczii* CBMAI 498, *B. licheniformis* INCQS 107, *R. radiobacter* IBSBF 1874, *B. cepacia* INCQS 00400 e *E. coli* INCQS 00310; **16**, controle da reação de PCR sem DNA; **17**, nested PCR do tubo “branco” (sem DNA) do PCR genérico.

Em outro teste de amplificação realizado em nosso laboratório com os *primers* específicos para a detecção de *Rhodococcus* (dados não mostrados), também não foram detectadas bactérias pertencentes a este gênero em nossas amostras.

- **Deteção de *Pseudomonas* spp.**

Linhagens pertencentes ao gênero *Pseudomonas* são conhecidas como hábeis degradadoras de hidrocarbonetos, tendo sido apontadas em estudos recentes como componentes da microbiota indígena de reservatórios de petróleo (Déziel *et al.*, 1996; Prabhu *et al.*, 2003). Estes dados de literatura são corroborados pelos resultados de isolamento de bactérias deste gênero nas amostras de petróleo do reservatório Pampo Sul da Bacia de Campos, sugerindo fortemente que tais microrganismos não são contaminantes adquiridos na coleta das amostras, ou provenientes de biofilmes de tubulações que carregam o petróleo à superfície, mas sim, correspondem a constituintes nativos do reservatório (Vasconcellos, 2006).

No presente estudo, populações de *Pseudomonas* spp. foram detectadas nas amostras dos poços 4 e 5, utilizando a estratégia de nested PCR. Entretanto, foram verificadas bandas de tamanhos distintos daquele esperado para seqüências de DNA correspondentes a

Pseudomonas spp. nas amostras dos cinco poços, assim como na água de formação, que podem ter sido resultantes de amplificação inespecífica ou de contaminação das reações de PCR (Figura 9). Neste sentido, os resultados referentes à detecção de *Pseudomonas* nas amostras ambientais não são conclusivos, e ensaios futuros com *primers* obtidos de nova síntese devem ser realizados visando à confirmação da presença deste grupo de bactérias nas amostras ambientais e publicação dos dados.

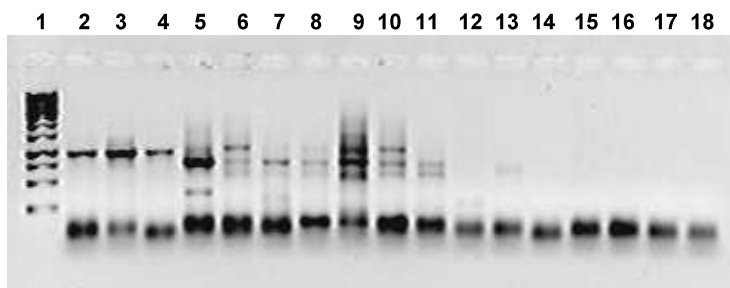


Figura 9. PCR para a detecção de *Pseudomonas* spp. Canaletas: 1, marcador de peso molecular (1 kb DNA ladder, Fermentas); 2 a 4, linhagens utilizadas como controles positivos, respectivamente: *Pseudomonas aeruginosa* CBMAI 701, *P. oleovorans* CBMAI 703 e *P. stutzeri* CBMAI 460; 5 a 10, nested PCR do DNA obtido a partir das amostras ambientais, respectivamente: água de formação e poços 1 a 5; 11, nested PCR do tubo “branco” (sem DNA) do PCR genérico; 12 a 17, controles negativos, respectivamente: *B. cepacia* INCQS 00400, *R. radiobacter* IBSBF 1874, *S. maltophilia* CBMAI 317, *E. coli* INCQS 00310, *S. drosdowiczii* CBMAI 498 e *A. xylosoxidans* CBMAI 709.

- **Detecção de *Acinetobacter* spp.**

Quanto aos ensaios de detecção específica de bactérias pertencentes ao gênero *Acinetobacter* nas amostras ambientais, infelizmente os resultados obtidos não foram confiáveis, pois foram observadas muitas bandas resultantes de amplificação inespecífica e contaminação do controle negativo do PCR após o segundo ciclo de amplificação (dados não mostrados). Estes ensaios foram repetidos 2 vezes e ainda assim não foi possível obter resultados satisfatórios. Neste sentido, a confirmação da presença deste grupo em amostras de petróleo dos reservatórios estudados deverá ser futuramente realizada após novos ajustes nas condições de amplificação e utilizando *primers* derivados de nova síntese.

- **Detecção de *Brevibacillus* spp.**

No caso de *Brevibacillus* spp., não foi realizada a detecção deste grupo nas amostras ambientais, pois como apenas uma linhagem foi utilizada como controle positivo de amplificação nos testes de especificidade dos *primers*, a eficiência de detecção das bactérias-alvo nas amostras ambientais certamente seria questionável. Assim, um maior número de

linhagens, pertencentes a diferentes espécies do gênero *Brevibacillus*, deverá ser testado em ensaios futuros como controles positivos de amplificação, a fim de se comprovar a robustez do protocolo de PCR para posterior aplicação em amostras ambientais.

4. Conclusões

- Foram desenvolvidos protocolos de PCR para a detecção específica de *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Brevibacillus* e *Acinetobacter* spp. Estes protocolos mostraram-se bem específicos para os grupos-alvo, oferecendo uma ferramenta rápida com potencial para uso na avaliação rotineira da qualidade de óleos.
- Apesar de relatos anteriores da nossa equipe com relação à presença de *Rhodococcus* spp. em reservatórios de petróleo, neste trabalho não foram detectadas bactérias deste grupo através da estratégia molecular utilizada. Nesse sentido, pode-se sugerir que estas bactérias não estejam presentes nos poços amostrados, ou se encontram em baixa abundância, abaixo do limite de detecção do método.
- Ensaios futuros para a detecção de *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. deverão ser realizados, a fim de se investigar a presença destas bactérias nos reservatórios amostrados e confirmar resultados prévios de isolamento destes grupos a partir de amostras de óleo e água de formação de reservatórios da plataforma Pampo.

5. Referências bibliográficas

- Bass, C.; Lapping-Scott, H. (1997) The bad guys and the good guys in Petroleum Microbiology. *Spring*, 17-25.
- Bell, K.S.; Kuyukina, M.S.; Heidbrink, S.; Philp, J.C.; Aw, D.W.J.; Ivshina, I.B.; Christofi, N. (1999) Identification and environmental detection of *Rhodococcus* species by 16S rDNA-targeted PCR. *Journal of Applied Microbiology* **87**, 472 - 480.
- Coutinho, H.L.C.; Oliveira, V.M.; Manfio, G.P. (2001) Diversidade microbiana em amostras ambientais. In: Garay, I.; Dias, B.; (Eds.), *Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais*, Editora Vozes, Petrópolis, pp. 215-232.
- Déziel, É.; Paquette, G.; Villemur, R.; Lépine, F.; Bisailon, J.G. (1996) Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* **62** (6), 1908-1912.
- Harayama, S.; Kasai, Y.; Hara, A. (2004) Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Current Opinion in Biotechnology*, **15**, 205-214.
- Heuer, H.; Krsek, M.; Baker, P.; Smalla, K.; Wellington, E.M. (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3233-3241.

- Hugenholtz, P.; Goebel, B.M.; Pace, N.R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* **180**, 4765-4774.
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Goodfellow, M.; Stackebrandt, E.; (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, John Wiley and Sons, Chichester, pp. 115-147.
- Magot, M. (1996) Similar bacteria in remote oil fields. *Nature* **379**, 681.
- Oliveira, V.M.; Sette, L.D.; Simioni, K.C.M.; Santos-Neto, E.V. Bacterial communities in formation water and oil samples from petroleum reservoirs analyzed by PCR-DDGE and cloning approaches. *Brazilian Journal of Microbiology* (submitted).
- Orphan, V.J.; Taylor, L.T.; Hafenbradl, D.; Delong, E.F. (2000) Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblage associated with high temperature petroleum reservoirs. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 700-711.
- Pace, N.R. (1996) New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News* **62**, 463-470.
- Pitcher, D.G.; Saunders, N.A.; Owen, R.J. (1989) Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology* **8**, 151-156.
- Pospiech, A.; Neumann, B. (1995) A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends in Genetics* **11** (6), 217-218.
- Prabhu, Y.; Phale, P.S. (2003) Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Applied Microbiology & Biotechnology* **61** (4), 342-351.
- Sette, L.D.; Simioni, K.C.M.; Vasconcelos, S.P.; Dussán, L.J.; Marsaioli, A.J.; Santos-Neto, E.V.; Oliveira, V.M. (2007) Analysis of composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Antonie van Leeuwenhoek* **91**, 253-266.
- Shida, O.; Takagi, H.; Kadowaki, K.; Komagata, K. (1996) Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 939-946.
- Tanaka, Y.; Sogabe, M.; Okumura, K.; Kurane, R. (2002) A highly selective direct method of detecting sulphate-reducing bacteria in crude oil. *Letters in Applied Microbiology* **35**, 242-246.
- Van Hamme, J.D.; Singh, A.; Ward, O.P. (2003) Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 503-549.
- Vasconcellos, S.P. (2006) Atividades enzimáticas e de biodegradação de microrganismos do petróleo da Bacia de Campos (Pampo Sul). Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
- Voordouw, G.; Armstrong, S.M.; Reimer, M.F.; Fouts, B.; Telang, A.J.; Shen, Y.; Gevertz, D. (1996) Characterization of 16S rRNA genes from oil field microbial communities indicates the presence of a variety of Sulfate-Reducing, Fermentative, and Sulfide-Oxidizing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 1623-1629.
- Widmer, F.; Seidler, R.; Gillevet, P.M.; Watrud, L.S.; Giovanni, G.D. (1998) A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the Genus *Pseudomonas* (Sensu Stricto) in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 2545-2553.
- Wikipedia (Enciclopédia virtual). Página da Internet: <http://en.wikipedia.org/wiki/Petroleum> acessada em março/2006.
- Yoshida, N.; Yagi, K.; Sato, D.; Watanabe, N.; Kuroishi, T.; Nishimoto, K.; Yanagida, A.; Katsuragi, T.; Kanagawa, T.; Kurane, R.; Tani, Y. (2005) Bacterial Communities in Petroleum Oil in Stockpiles. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **99**, 143-149.
- Young, A.; Blakesley, R. (1991) Sequencing plasmids from single colonies with the dsDNA cycle sequencing system. *Focus* **13**, 13.
- Zimmermann, J.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. (2001) DNA polynucleotide probes generated from representatives of the Genus *Acinetobacter* and their application in fluorescence in situ hybridization of environmental samples. *Systematic and Applied Microbiology* **24**, 238-244.

Conclusões Gerais:

- A estratégia de *nested* PCR mostrou-se efetiva para a rápida detecção das bactérias definidas como grupos-alvo, a saber: *Bacillus* spp. e *Bacillus pumilus* (Filo Firmicutes), *Streptomyces* spp., *Dietzia* spp. e *Micrococcus* spp. (Filo Actinobacteria), e *Achromobacter xylosoxidans* (Classe β -proteobacteria).

- *Primers* e protocolos de PCR foram definidos para a detecção específica de *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhodococcus* spp. e *Brevibacillus* spp. Novos ensaios deverão ser realizados visando o ajuste das condições de amplificação no caso de *Brevibacillus* spp. e *Acinetobacter* spp.

- Bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* foram detectadas em todas as amostras de petróleo, corroborando dados de literatura. Além disso, linhagens de *Bacillus pumilus* foram detectadas no óleo dos reservatórios 1, 4 e 5. Estes dados sugerem um grande potencial destas populações bacterianas para degradar hidrocarbonetos nestes reservatórios e, conseqüentemente, alterar as características do petróleo.

- Bactérias do gênero *Micrococcus* spp. mostraram-se amplamente distribuídas nos poços amostrados (poços: 1, 3, 4 e 5). Além disso, este grupo-alvo foi também detectado na amostra de água de formação, corroborando resultados anteriores obtidos pelo nosso grupo de pesquisa. Já o gênero *Dietzia*, outro representante do grupo dos actinomicetos comumente relacionado com a degradação de hidrocarbonetos, foi detectado no óleo dos poços 1, 4 e 5, mas não na água de formação. Bactérias pertencentes à espécie *Achromobacter xylosoxidans* foram encontradas somente no óleo dos reservatórios 3 e 5, ambos localizados a altas profundidades e com temperatura variando entre 62 °C e 85 °C.

- Apesar de relatos anteriores da nossa equipe com relação à presença de *Rhodococcus* spp. em reservatórios de petróleo, neste trabalho não foram detectadas bactérias deste grupo através da estratégia molecular utilizada. Estes dados sugerem que estas bactérias não estão presentes nos poços amostrados, ou se encontram em abundância inferior ao limite de detecção do método.

- A análise da diversidade de espécies de *Bacillus* usando a estratégia de bibliotecas de DNAr 16S sugeriu uma alta diversidade deste grupo na amostra de petróleo estudada, sendo detectadas bactérias relacionadas com: *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. circulans* e o

grupo *B. megaterium*/*B. flexus*. Destes, *B. subtilis* foi a espécie encontrada em maior abundância. Este foi o primeiro relato de *B. circulans* em ambientes associados a petróleo.

- Os resultados de quantificação com o PCR em tempo real revelaram uma abundância muito baixa para todos os grupos-alvo nos poços avaliados. No entanto, sabe-se que o rendimento da extração de DNA diretamente a partir das amostras de óleo é baixo, o que dificulta inferências robustas com relação à abundância das populações bacterianas estudadas. Não foram encontrados na literatura outros relatos envolvendo a quantificação de populações bacterianas em amostras de óleo bruto por PCR quantitativo. Portanto, considerando a alta diversidade bacteriana que tem sido detectada em reservatórios de petróleo, o aperfeiçoamento futuro da metodologia utilizada poderá oferecer novos dados relacionados à relevância das populações bacterianas que habitam ambientes de reservatórios de petróleo nos processos de biodegradação.

- A presença de bactérias com conhecido potencial para degradação de hidrocarbonetos nos poços com óleo não biodegradado, poderia ser explicada pelo fato destas bactérias estarem presentes em baixa abundância nestas amostras, em função da condição limitante da alta temperatura e, conseqüentemente, não terem um papel relevante na degradação do petróleo. Outra explicação plausível seria o fato destas bactérias não estarem necessariamente envolvidas nas etapas de degradação do óleo nestes reservatórios.

- A aplicação dos protocolos baseados em PCR específico desenvolvidos no presente estudo para a detecção e quantificação direta de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos pode oferecer uma ferramenta rápida e altamente sensível para a predição da qualidade do óleo em reservatórios e, assim, ajudar a reduzir os prejuízos econômicos nas operações de exploração de petróleo.

Referências Gerais:

- Abulencia, C.B.; Wyborski, D.L.; Garcia, J.A.; Podar, M.; Chen, W.; Chang, S.H.; Watson, D.; Brodie, E.L.; Hazen, T.C.; Keller, M., 2006. Environmental whole-genome amplification to access microbial population in contaminated sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (5), 3291-3301.
- Adkins, J.P.; Cornell, L.A.; Tanner, R.S., 1992. Microbial composition of carbonate petroleum reservoir fluids. *Geomicrobiology Journal* **10**, 87-97.
- Amann, R.L.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**, 143-169.
- Bach, H.; Berdichevsky, Y.; Gutnick, D., 2003. An exocellular protein from the oil-degrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier emulsan. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 2608-2615.
- Bass, C.; Lappin-Scott, H., 1997. The bad guys and the good guys in Petroleum Microbiology. *Spring*, 17-25.
- Ben-Dov, E.; Brenner, A.; Kushmaro, A., 2007. Quantification of sulfate-reducing bacteria in industrial wastewater, by real-time polymerase chain reaction (PCR) using *dsrA* and *apsA* genes. *Microbial Ecology* **54**, 439-451.
- Bernard, F.P.; Connan, J.; Magot, M., 1992. Indigenous microorganisms in cinnate water of many oil fields: a new tool in exploration and production techniques. In: Richardson, T. X. SPE 24811. *Proceedings of the Society of Petroleum Engineers* **2**, 467-475. Society of Petroleum Engineers, Inc.
- Bonch-Osmolovskaya, E.A.; Miroshnichenko, M.L.; Lebedinsky, A.V.; Chernyh, N.A.; Nazina, T.N.; Ivoilov, V.S.; Belyaev, S.S.; Boulygina, E.S.; Lysov, Y.P.; Perov, A.N.; Mirzabekov, A.D.; Hippe, H.; Stackebrandt, E.; L'Haridon, S.; Jeanthon, C., 2003. Radioisotopic, culture-based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 6143-6151.
- Borzenkov, I.A.; Milekhina, E.I.; Gotoeva, M.T.; Rozanova, E.P.; Beliaev, S.S., 2006. The properties of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from the oilfields of Tatarstan, Western Siberia, and Vietnam. *Mikrobiologiya* **75**, 82-89.
- Connan, J., 1984. Biodegradation of crude oils in reservoirs. In: Brooks, J., Welte, D.H., (Eds.), *Advances in Petroleum Geochemistry*, Academic Press, London, pp. 299-330.
- Cord-Ruwich, R.; Kleinitz, W.; Widdel, F., 1987. Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production. *Journal of Petroleum Technology* **1**, 97-106.
- Corrêa, O.L.S., 2003. Petróleo: Noções sobre Exploração, Perfuração, Produção e Microbiologia. Ed. Interciência. Rio de Janeiro, RJ.
- Cunha, C.D.; Rosado, A.S.; Sebastián, G.V.; Seldin, L.; Weid, I., 2006. Oil biodegradation by *Bacillus* strains isolated from the rock of an oil reservoir located in a deep-water production basin in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology* **73** (4), 949-959.
- Grabowski, A.; Blanchet, D.; Jeanthon, C., 2005. Characterization of long-chain fatty-acid-degrading syntrophic associations from a biodegraded oil reservoir. *Research in Microbiology* **156**, 814-821.
- Grassia, G.S.; McLean, K.M.; Glénat, P.; Bauld, J.; Sheehy, A.J., 1996. A systematic survey for thermophilic fermentative bacteria and archaea in high temperature petroleum reservoirs. *FEMS Microbiology Ecology* **21**, 47-58.
- Head, I.M.; Jones, D.M.; Larter, S.R., 2003. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature* **426**, 344-352.

- Head, I.M.; Jones, D.M.; Röling, W.F.M., 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews (Microbiology)* **4**, 173-182.
- Hugenholtz, P.; Goebel, B.M.; Pace, N.R., 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* **180**, 4765-4774.
- Lu, X.X.; Zhang, X.; Li, G.H.; Zhang, W.H., 2003. Production of biosurfactant and its role in the biodegradation of oil hydrocarbons. *Journal of Environmental Science and Health, part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* **38**, 483-492.
- Macnaughton, S.J.; Stephen, J.R.; Venosa, A.D.; Davis, G.A.; Chang, Y.J.; White, D.C., 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (8), 3566-3574.
- Magot, M., 1996. Similar bacteria in remote oil fields. *Nature* **379**, 681.
- Magot, M.; Ollivier, B.; Patel, B.K.C., 2000. Microbiology of Petroleum Reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek* **77**, 103-116.
- Matz, A.A.; Borisov, A.Y.; Mamedov, Y.G.; Ibatulin, R.R., 1992. Commercial (pilot) test of microbial enhanced oil recovery. In: Richardson, T.X. *Proceedings of the 8th SPE/DOE Symposium on Enhanced Oil Recovery*. SPE/DOE paper 24208. Society of Petroleum Engineers, Inc.
- Muyzer, G.; Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**, 127-141.
- Nadkarni, A.M.; Martin, F.E.; Jacques, N.A.; Hunter, N., 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* **148**, 257-266.
- Nazina, T.N.; Ivanova, A.E.; Mityushina, L.L.; Belyaev, S.S., 1993. Thermophilic hydrocarbon-oxidizing bacteria in oil strata. *Microbiology* (English Translation) **62**, 359-365.
- Nazina, T.N.; Tourova, T.P.; Poltarau, A.B.; Novikova, E.V.; Grigoryan, A.A.; Ivanova, A.E.; Lysenko, A.M.; Petrunyaka, V.V.; Osipov, G.A.; Belyaev, S.S.; Ivanov, M.V., 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, 433-446.
- Nazina, T.N.; Grigor'ian, A.A.; Sue, K.F.; Sokolova, D.S.; Novikova, E.V.; Turova, T.P.; Poltarau, A.B.; Beliaev, S.S.; Ivanov, M.V., 2002. Phylogenetic diversity of aerobic saprotrophic bacteria isolated from the Daqing oil field. *Mikrobiologiya* **71**, 103-110.
- Nyyssönen, M.; Piskonen, R.; Itävaara, M., 2006. A targeted Real-time PCR assay for studying naphthalene degradation in the environment. *Microbial Ecology* **52**, 533-543.
- Orphan, V.J., Taylor, L.T., Hafenbradl, D., Delong, E.F., 2000. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblage associated with high temperature petroleum reservoirs. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 700-711.
- Pace, N.R., 1996. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News* **62**, 463-470.
- Radwan, S.S.; Sorkhoh, N.A.; Fardoun, F.; Al-Hasan, R.H., 1995. Soil management enhancing hydrocarbon biodegradation in the polluted Kuwaiti desert. *Applied Microbiology and Biotechnology* **44**, 265-270.
- Rapp, P.; Gabriel-Jürgens, L.H.E., 2003. Degradation of alkanes and highly chlorinated benzenes, and production of biosurfactants, by a psychrophilic *Rhodococcus* sp. and genetic characterization of its chlorobenzene dioxygenase. *Microbiology* **149**, 2879-2890.

- Rappé, M.S.; Giovannoni, S.J., 2003. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology* **57**, 369-394.
- Röling, W.F.M.; Head, I.M.; Larter, S.T., 2003. The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. *Research in Microbiology* **154**, 321-328.
- Saadoun, I., 2002. Isolation and characterization of bacteria from crude petroleum oil contaminated soil and their potential to degrade diesel fuel. *Journal of Basic Microbiology* **42**, 420-428.
- Satyanarayana, T.; Raghukumar, C.; Shivaji, S., 2005. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science* **89** (1), 78-90.
- Sette, L.D.; Simioni, K.C.M.; Vasconcelos, S.P.; Dussán, L.J.; Marsaioli, A.J.; Santos-Neto, E.V.; Oliveira, V.M., 2007. Analysis of composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Antonie van Leeuwenhoek* **91**, 253-266.
- Staley, J., 1998. Microbial diversity and the biosphere. In: <http://www.bdt.org.br/oea/sib/staley>.
- Suzuki, M.T.; Giovannoni, S.J., 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 625-630.
- Tanaka, Y.; Sogabe, M.; Okumura, K.; Kurane, R., 2002. A highly selective direct method of detecting sulphate-reducing bacteria in crude oil. *Letters in Applied Microbiology* **35**, 242-246.
- Telang, A.J.; Ebert, S.; Foght, J.M.; Westlake, D.; Jenneman, G.E.; Gevertz, D.; Voordouw, G., 1997. Effect of Nitrate Injection on the Microbial Community in an Oil Field as Monitored by Reverse Sample Genome Probing. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 1785-1793.
- Van Hamme, J.D.; Singh, A.; Ward, O.P., 2003. Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 503-549.
- 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, S.M.; Reimer, M.F.; Fouts, B.; Telang, A.J.; Shen, Y.; Gevertz, D., 1996. Characterization of 16S rRNA genes from oil field microbial communities indicates the presence of a variety of sulfate-reducing, fermentative, and sulfide-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 1623-1629.
- Watanabe, K.; Kodama, Y.; Kaku, N., 2002. Diversity and abundance of bacteria in an underground oil-storage cavity. *BMC Microbiology* **2**, 23.
- Yoshida, N.; Yagi, K.; Sato, D.; Watanabe, N.; Kuroishi, T.; Nishimoto, K.; Yanagida, A.; Katsuragi, T.; Kanagawa, T.; Kurane, R.; Tani, Y., 2005. Bacterial Communities in Petroleum Oil in Stockpiles. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **99**, 143-149.
- Zvyagintseva, I.S.; Beliaev, S.S.; Borzenkov, I.A.; Kostrikina, N.A.; Milekhina, E.I.; Ivanov, M.V., 1995. Halophilic archaeobacteria from the Kalamkass oilfield. *Mikrobiologiya* **64**, 83-87.

Anexos

Anexo 1: Extração de DNA genômico de bactérias em pequena escala

Este protocolo parte de uma quantidade inicial de cultura bacteriana equivalente ao tamanho de um grão de arroz. No caso de crescimento bacteriano em meio de cultura sólido, uma alçada do crescimento bacteriano da superfície da placa foi recolhida e transferida para micro tubo de 1,5 mL (Eppendorf). Já no caso de meio de cultura líquido, a cultura foi centrifugada até que o *pellet* tivesse o tamanho de um grão de arroz.

As células foram lavadas 2 vezes com 1 mL de água Milli-Q. Para o caso de microrganismos pertencentes ao grupo dos Actinomicetos, a lavagem foi realizada com tampão NaCl 0,1 M + EDTA 0,1 M. Após suspensão na água ou no tampão, as células foram centrifugadas a 12902,4 g por 3 min. e o sobrenadante foi descartado.

No caso de células microbianas Gram-positivas, tais como actinomicetos e *Bacillus*, foram utilizadas pérolas de vidro ("*glass beads*") de 1 µm de diâmetro em volume igual ao do *pellet*. As células foram maceradas com as pérolas de vidro, utilizando um bastão de plástico com ponta afilada, a fim de ajudar a quebrar a parede celular destes microrganismos.

A seguir, as células foram suspensas em 100µL de TE pH 8,0 contendo 2 mg/mL de lisozima dissolvida e incubadas a 37 °C por 30 min. (no caso de bactérias Gram-positivas, o tempo de incubação foi maior, 60 min., a fim de promover a lise).

Foram adicionados 500µL da solução de guanidina, para promover a lise. A solução foi agitada em *vortex* brevemente e incubada à temperatura ambiente por 5 a 10 min.

Os lisados foram resfriados no gelo e 250µL de acetato de amônio 7,5M foram adicionados. A solução foi misturada gentilmente, invertendo-se os tubos várias vezes, e incubada no gelo por mais 10 min.

Após adição de 500µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v/v), a mistura foi agitada manualmente e centrifugada a 12902,4 g por 10 min.

A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga e foi adicionado 0,54 vol. de isopropanol, para a precipitação do DNA. Os tubos foram invertidos várias vezes, até que as soluções estivessem misturadas, ou até que fosse possível a visualização de um precipitado fibroso branco.

Após centrifugação a 3785,6 g por 3 min., o *pellet* de DNA foi lavado 2 vezes com 1 mL de etanol 70% (v/v). Entre as lavagens, os tubos foram centrifugados a 3785,6 g por 3 min. O DNA foi então incubado à temperatura ambiente ou em estufa a 37 °C para secar.

O *pellet* foi dissolvido em 200 µL de TE pH 8,0 e foram adicionados 6 µL de RNase A, partindo-se de uma solução estoque de 10 mg/mL. Os tubos foram incubados por 1 hora a 37 °C.

Após a adição de 20 µL de cloreto de lítio 4M e 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), os tubos foram agitados manualmente e centrifugados a 12902,4 g por 10 min.

O DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto gelado, seguindo centrifugação a 3785,6 g por 3 min. O sobrenadante foi descartado.

Os *pellets* foram lavados 2 vezes com etanol 70%, com centrifugação a 3785,6 g por 3 min. entre as lavagens. O DNA secou à temperatura ambiente, em estufa a 37 °C ou a vácuo (*Eppendorf concentrator 5301*).

Por fim, o DNA foi suspenso em 20 a 50 µL de água Milli-Q e estocado a -20 °C.

Referência:

Pitcher, D.G.; Saunders, N.A.; Owen, R.J., 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology* **8**, 151-156.

Anexo 2: Extração do DNA genômico de bactérias através de lise com proteinase K

Assim como descrito no Anexo 1 desta dissertação (“Extração de DNA genômico de bactérias em pequena escala”; Pitcher *et al.*, 1989), para este protocolo, partimos de uma quantidade inicial de cultura bacteriana equivalente a um grão de arroz, através de raspagem de crescimento em meio de cultura sólido ou centrifugação de cultura em meio líquido.

As células foram suspensas em 100 μ L da solução de lise (100 η g/ μ L de proteinase K dissolvidos em TE pH 8,0).

Os tubos foram incubados em banho-maria a 55 °C por 15 min. e, em seguida, transferidos para um banho-maria a 80 °C, onde ficaram incubados por mais 15 min.

Ao final, os tubos foram centrifugados por 7 min a 129,02 *g* e o sobrenadante foi transferido para outro tubo, podendo ser utilizado em reações de PCR.

Referência:

Young, A.; Blakesley, R., 1991. Sequencing plasmids from single colonies with the dsDNA cycle sequencing system. *Focus* **13**, 13.

Anexo 3: Extração de DNA genômico de bactérias Gram-positivas

Assim como descrito nos Anexos 1 e 2 desta dissertação (“Extração de DNA genômico de bactérias em pequena escala”, Pitcher *et al.*, 1989; e “Extração do DNA genômico de bactérias através de lise com proteinase K”, Young e Blakesley, 1991), uma quantidade de crescimento bacteriano do tamanho de um grão de arroz foi obtida e transferida a um tubo de microcentrífuga (*Eppendorf*). Foram adicionados 600 μ L de solução SET (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 7,5).

Foi adicionada lisozima para a concentração final de 1 mg mL⁻¹ e a mistura foi incubada em banho-maria a 37 °C por 1 hora. Após adição de 1/10 volumes de SDS 10% e proteinase K para a concentração final 0,5 mg mL⁻¹, o tubo foi incubado em banho-maria a 55 °C por 2 horas, sendo homogeneizado ocasionalmente, invertendo-se o mesmo algumas vezes.

NaCl 5M foi adicionado em quantidade equivalente a 1/3 o volume dentro do tubo, seguindo adição de 1 volume de clorofórmio. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 30 min., com freqüentes inversões do tubo.

O tubo foi centrifugado a 4500 *g* por 15 minutos e a fase aquosa foi cuidadosamente transferida a um novo tubo, utilizando ponteira com a ponta cortada, a fim de não provocar quebra do DNA.

O DNA foi precipitado através da adição de 1 volume de isopropanol e o tubo foi gentilmente invertido. A solução foi centrifugada a 3902,98 *g* por 3 min. e o *pellet* foi lavado com etanol 70%. Após incubação no ambiente ou em estufa a 37 °C para secagem do *pellet*, o DNA foi suspenso em 50 μ L de água Milli Q.

Referência:

Pospiech, A.; Neumann, B., 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends in Genetics* **11** (6), 217-218.