

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PROSPECÇÃO GÊNICA E DIVERSIDADE BACTERIANA
DE UM CONSÓRCIO DEGRADADOR DE ÓLEO DIESEL**

Douglas Antonio Alvaredo Paixão

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal-UNESP, para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia área de concentração em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2009

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DOUGLAS ANTONIO ALVAREDO PAIXÃO - nascido em 07 de setembro de 1980, no município de São Carlos - SP, é Biólogo pela modalidade licenciatura e bacharel, formado pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal em Dezembro de 2006. Em Março de 2007, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agropecuária na UNESP – FCAV, em Jaboticabal – SP, onde defendeu sua dissertação de mestrado em julho de 2009.

"Se você quer os acertos, esteja preparado para os erros"
(Carl Yastrzemski)

Dedico

A meus pais,

Omar Antonio Paixão e Maria Cândida Alvaredo Paixão,
que em todos os momentos me deram apoio, incentivaram,
compreenderam, amaram e lutaram para este sonho se tornar
realidade. A eles, todo o meu amor...

A minha namorada,

Juliana Xavier Cordeiro pelo amor, carinho, paciência, dedicação e por
ter estado ao meu lado em todos os momentos em que
precisei. A ela todo o meu amor e carinho.

Aos meus Avós Maternos

José Alvaredo (*in memoriam*) e Ana Finoto (*in memoriam*), por
todo o carinho e educação que me deram. Meus queridos
Avós, "aonde quer que eu vá, levo vocês no olhar"

Ao meu tio Ilbes Alvaredo,

que se comportou como meu segundo pai durante
toda a minha vida.

Muito obrigado Tio Ibe !!!

Agradecimentos

Em primeiro lugar a Deus por ter me dado saúde e uma belíssima família como suporte de minha vida. Muito obrigado por tudo que tem dado a mim e a minha família, pra sempre serei grato.

A Prof^a. Dr^a Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, pela amizade, paciência, compreensão e principalmente pela confiança e oportunidade oferecida durante todos esses anos. O conhecimento que tenho hoje é graças a tua dedicação e paciência em ensinar.

A Prof^a Dr^a Lucia Alves Carareto pela, amizade, respeito e pela presença e atenção nos momentos e que precisei.

Ao grande companheiro João Campanharo pela força e dedicação durante minha graduação e pós-graduação

A UNESP-FCAV em especial ao Departamento de Tecnologia pela oportunidade.

Aos integrantes da banca examinadora, Dr^o Alessandro Minillor, Prof^a Dr^a Eliana Gertrudes de Macedo Lemos e a Prof^a Dr^a Janete Aparecida Desiderio Sena pelas sugestões para a melhoria deste trabalho.

A minha namorada Juliana Xavier Cordeiro que sempre me apoiou e ficou ao meu lado, pela sua amizade, carinho e pelo seu amor durante todos estes anos. Te amo!!!

Ao meu grande amigo Mauricio Rocha Dimitrov, pelas batalhas juntas durante sete anos de convivência e amizade. Sua participação na minha vida foi vital para o

meu crescimento tanto acadêmico quanto pessoal. Muito obrigado por poder compartilhar meus melhores e piores momentos contigo meu grande amigo.

A minha grande amiga Simone de quem tenho grande admiração, pelos conselhos que me dera durante toda minha pós-graduação, pela força que me deu quando mais precisei, e é claro pela sua amizade que prezo tanto, muito obrigado minha grande amiga. Agradeço o Haroldão que sempre esteve presente quando precisei.

Aos meus grandes amigos Luciano Takeshi Kishi, Denilson Scaquito, Érico Silverio, Mauricio Cantão que participaram ativamente deste trabalho e pelos momentos incontáveis de apoio e amizade.

Em especial agradeço ao meu grande amigo Rodrigo Matheus Pereira (Poeta) que esteve sempre pronto a ajudar em todas as horas que precisei na confecção da minha dissertação. Muito obrigado

Aos meus amigos e companheiros de trabalho do LBMP, Ana Rita, Bethânia, Cândida, Denílson, Eliamar, Érico, Ester, Fernanda, Haroldo, Jackson, , Luciano, Mauricio Cantão, Mariana, Silvana, Thais, Tereza, Tehuni, Viviane, Karla, Wellington, Elizangela, Viviane Vieira, Andressa, Érika e todos aqueles que não me recordo agora.

A amigas do LBM, Janaina Gonçalves, Juliana Costa, Juliana Rossi, Viviam Bother. Muito obrigado pelas amizades.

Aos meus mais que irmãos moradores da República Kilombo, “Picolino”, “K-lado”, Argos, “Pudendo”, “Zumbi”, “Tche Gay” e aos ex-moradores que tiveram a felicidade de fazer parte desta grande república “Catarro”, “Mau-Mau”, “Atrofiado” e “Stink” e ao ex agregado “Tchão”, agradeço pela amizade, festas, alegrias, discussões e aprendizado. Muito obrigado por vocês fazerem parte da minha vida durante sete anos.

Ao meu grande amigo Matheus Nicolino Peixoto Henares (Picolino) pelo convívio e amizade durante todos estes anos. Obrigado por me socorrer e me dar apoio nas horas em que mais precisei, pelas conversas que tivemos, pelas festas que participamos e bebemos juntos, pelas ressacas que passamos juntos, pelas viagens compartilhadas, enfim pela tua amizade, muito obrigado meu grande amigo.

Aos meus amigos de curso que considero como irmãos, Picolino, Argos, K-lado, o novato Pudendo, Catarro, Russo, Cabeça, Juliana Xavier, Tilapia.

Aos meus tios, Maura Paixão de Andrade, Ezequiel Venâncio de Andrade. Aos meus primos Wender, Ana Grazielle e Wesley.

Aos meus tios Ilbes Alvaredo (Puruca), Alcides Alvaredo (*in memoriam*) e Paulo Alvaredo (*in memoriam*) que com certeza estão e sempre estarão ao meu lado.

Aos meus queridos animais de estimação, minha filha Bamboocha, ao meu irmãozinho Scoobi-doo “Biduzão” e aos meus sobrinhos Monstro, Theo, Mingau e Prince, e agora Meg, Max e o terrível Thor, a quem dei o nome.

A minha querida cunhada Jussara Xavier.

Aos meus amigos de Sanca Dão, Jéferson, Renato, Cristiano, Eduardo.

A minha família por sempre estar ao meu lado.

A **Deus**, por tudo que me concedeu...

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Diversidade microbiana do solo e análise molecular por abordagem metagenômica	3
2.2 Prospecção gênica em bibliotecas metagenômicas.....	6
2.3 O gene <i>16S</i> como marcador molecular	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Obtenção do consórcio microbiano	10
3.1.1 Extração de DNA metagenômico do consórcio	10
3.1.2 Quantificação do DNA.....	11
3.1.3 Determinação do tamanho do DNA por eletroforese em campo pulsado	12
3.2 Construção da biblioteca metagenômica de 16s rDNA para análise da biodiversidade.	13
3.2.1 Amplificação do gene <i>16S rRNA</i>	13
3.2.2 Eluição dos produtos de PCR.....	13
3.2.3 Clonagem em vetor pGEM® T Easy	14
3.2.4 Transformação das células competentes.....	14
3.2.5 Coleta de clones transformantes	14
3.2.6 Cultivo dos clones bacterianos e extração do DNA plasmidial	15
3.2.7 Reação de restrição dos clones para detecção dos insertos	16
3.2.8 Sequenciamento dos clones.....	17
3.2.9 Análises das sequências.....	17
3.2.10 Números de acesso das sequências de nucleotídeos.....	18
3.3 Construção da biblioteca metagenômica a partir de DNA do consórcio microbiano utilizando.	19
3.3.1 Reparo das extremidades dos fragmentos para clonagem em vetor fosmideo	19
3.3.2 Seleção do tamanho dos insertos	20
3.3.3 Eluição dos fragmentos reparados do gel	21
3.3.4 Clonagem dos insertos em vetor fosmídeo.....	21
3.3.5 Reação de ligação	22

3.3.6	Reação de empacotamento	23
3.3.7	Preparo do inóculo de células EPI300-T1 ^R	23
3.3.8	Infecção das células EPI300-T1 ^R	24
3.3.9	Cultivo dos clones bacterianos e extração do DNA fosmidial	24
3.3.10	Digestão do DNA fosmidial	25
3.3.11	Análise das digestões por eletroforese em campo pulsado.....	26
3.4	Preparação dos macroarranjos dos “pools” de DNA	26
3.4.1	Extração e quantificação dos “pools” de DNA fosmidial	26
3.4.2	Construção do macroarranjo dos “pools” de DNA dos fosmídeos	27
3.4.3	Reação de PCR com oligonucleotídeos específicos	28
3.4.4	Hibridização dos macroarranjos	29
3.4.5	Identificação dos clones.....	30
3.5	PCR de sequenciamento dos clones positivos	30
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	Análise do DNA metagenômico	32
4.2	Diversidade bacteriana do consórcio	33
4.3	Prospecção gênica.....	41
5.	CONCLUSÕES	47
6.	LITERATURA CITADA	48

PROSPECÇÃO GÊNICA E DIVERSIDADE BACTERIANA DE UM CONSÓRCIO DEGRADADOR DE ÓLEO DIESEL.

RESUMO - A estratégia de clonagem e sequenciamento do gene *16S rRNA* é uma das técnicas moleculares que permite estimar e comparar a diversidade microbiana de diferentes amostras ambientais. O objetivo deste trabalho foi estimar a diversidade de microrganismos pertencentes ao Domínio Bactéria em um consórcio degradador de óleo diesel, por meio do sequenciamento parcial do gene *16S rRNA*, assim como desenvolver uma nova metodologia de rastreamento em bibliotecas metagenômicas. O consórcio bacteriano foi obtido através de solo enriquecido com óleo diesel. O DNA metagenômico foi extraído com o auxílio do kit Fast DNA spin Kit for soil (Bio101-Quantum Biotechnologies) e amplificado por uma reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com os oligonucleotídeos iniciadores FD1 e RD1 específicos para o gene *16S rRNA*. Os produtos de PCR foram clonados em vetor pGEM T Easy (Promega) e transformados em células competentes de *Escherichia Coli* DH5α. O sequenciamento parcial dos clones foi feito com oligonucleotídeos universais do vetor. Para a prospecção gênica foi utilizado membranas de nylon com “pools” de DNA de todas as placas. A biblioteca obtida gerou 431 clones. Os clones obtidos apresentaram similaridade com o filo Proteobacteria, com representantes das classes Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria. O gênero *Pseudomonas* apresentou-se com maior frequência de clones na biblioteca. O “software” DOTUR foi usado para determinar o número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs). A curva de extinção indicou que os 431 clones sequenciados foram suficientes para estimar a diversidade bacteriana do consórcio. A metodologia testada baseada em “pools” de DNA foi eficiente na detecção e isolamento do gene *Alk* na biblioteca metagenômica.

Palavras chave: biorremediação, consórcio microbiano, *16S rRNA*, metagenoma

GÊNICA PROSPECTION AND GENETIC DIVERSITY OF A BACTERIAL CONSORTIUM DEGRADED DIESEL OIL

SUMMARY- Cloning and sequencing of *16S rRNA* gene it is one of the molecular techniques that permits estimate and compare the microbial diversity of different environmental samples. The aim of this work was estimate the diversity of microorganisms that belong to Bacteria domain in a consortium specialized in diesel oil degradation, through partial sequencing of *16S rRNA* gene, as well as develop a new methodology for screening libraries in metagenomics. This consortium was obtained through enrichments achieved using diesel oil in soil samples. The metagenomic DNA was obtained using Fast DNA spin Kit for soil (Bio 101-Quantum Biotechnologies) and amplified by PCR (Polymerase chain reaction) with FD1 and RD1 oligonucleotides, which are specific for *16S rRNA* gene. The PCR products were cloned into pGEM-T-Easy vector (Promega) and *Escherichia coli* DH5 α was used as the host cell for recombinant DNAs. The partial clones sequencing was obtained using universal primers of the vector. For the exploration of gene were used nylon membranes with Pools of DNA from all plates. The library generated from 431 clones. All clones sequenced showed similarity with the phylum Proteobacteria, distributed in Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria classes. The *Pseudomonas* genus was the most abundant genus found in the metagenomic library. The DOTUR software was used to assigns sequences to operational taxonomic units (OTUs). Using the OTUs composition data, rarefaction curves were made to show that 431 sequences were enough to obtain a satisfactory coverage of diversity of the microbial consortium. The test methodology based on Pools of DNA isolation was effective in detecting the gene *Alkb* Library metagenomics.

keywords: bioremediation, microbial consortium, *16S rRNA*, metagenomics

1. INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os maiores produtores de petróleo do mundo. De acordo com Agência Nacional do Petróleo (ANP) no ano de 2008 foi produzido aproximadamente 96.371.606 milhões de metros cúbicos (m³). Consequentemente, aumentaram as preocupações relacionadas aos riscos de derrame e contaminação ambiental, principalmente dos solos e águas subterrâneas. Os postos de combustíveis destacam-se na lista entre os maiores potenciais de contaminação de solos e águas, contribuindo com 77% dos registros de áreas contaminadas (CETESB, 2007).

O óleo diesel é uma mistura complexa de alcanos e compostos aromáticos que frequentemente são reportados como contaminantes de solo através de derrames acidentais (GALLEGO et al., 2001). Com a finalidade de restaurar a qualidade do solo contaminado, várias técnicas estão sendo empregados no processo de remoção de hidrocarbonetos, entre elas os processos físicos e químicos como incineração e lavagem do solo. Entretanto, uma das melhores estratégias para o tratamento de solos contaminados é utilização de microrganismos capazes de degradar compostos tóxicos através de um processo denominado biorremediação (BENTO et al., 2005). Esta técnica promove a remoção de poluentes de ambientes naturais e a conversão destes em substâncias inertes, usando microrganismos endógenos previamente isolados de áreas contaminadas (BAMFORTH & SINGLETON, 2005). É uma medida necessária e eficiente na remoção de determinados poluentes que afetam a saúde humana e a qualidade ambiental.

Um grupo variado de microrganismos destacam-se no processo de decomposição hidrocarbonetos derivados do petróleo, incluindo as bactérias representadas pelos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Paracoccus*, *Burkholderia*, *Microbacterium* e *Gordonia*, além de vários fungos dos gêneros *Cunninghamella*, *Phanerochaete*, *Fusarium*, *Candida*, *Penicillium*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Aspergillus*, *Bjerkandera* e *Chrysosporium*. No entanto, à obtenção de

consórcios microbianos, têm-se mostrado mais efetivos na degradação destes compostos (JACQUES et al. 2007).

Diversas ferramentas genéticas estão sendo usadas para caracterizar comunidades microbianas de vários ambientes sem a necessidade de cultivo (KOWALCHUK et al. 2004), entre elas, o sequenciamento do gene *16S rRNA*. Formado por uma estrutura primária regida de regiões que se alternam entre áreas conservadas e variáveis, o gene *16S rRNA* permite a investigação de amplo espectro na determinação das relações filogenéticas (LUDWIG & SCHLEIFER, 1994). A acurácia da inferência filogenética é dependente não somente do número de bases comparadas, mas também das regiões da molécula que são comparadas (HURST, et al. 2002). Com isso, o sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* representa uma importante ferramenta para análise de diversidade de comunidades bacterianas em amostras ambientais. O uso desta técnica tem demonstrado ótimos resultados no âmbito de estimar e comparar comunidades bacterianas de diferentes amostras e ambientes (KUSKE et al. 1997; PEREIRA et al. 2006; SILVEIRA et al. 2006; VAL-MORAES, et al. 2009).

Nos últimos 50 anos, produtos derivados do metabolismo secundário microbiano têm sido utilizados para fins médicos, industriais e agrícolas, incluindo antibióticos, drogas anticancerígenas, compostos antifúngicos, agentes imunossupressivos, inibidores enzimáticos, agentes antiparasíticos, herbicidas, inseticidas e promotores de crescimento.

A necessidade de um maior conhecimento e compreensão da diversidade de comunidades microbianas de ambientes impactados inclui, entre outros, benefícios econômicos e estratégicos, relacionados à descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos para a biorremediação de áreas poluídas. O objetivo deste trabalho foi estimar a diversidade de microrganismos pertencentes ao Domínio Bactéria em um consórcio degradador de óleo diesel, por meio do sequenciamento parcial do gene *16S rRNA*, assim como desenvolver uma nova técnica de rastreamento em bibliotecas metagenômicas por meio de macroarranjos de DNA.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diversidade microbiana do solo e análise molecular por abordagem metagenômica

O solo é um importante reservatório de carbono orgânico, onde os procariotos são componentes essenciais no sistema de decomposição do solo (WHITMAN et al. 1998). Além disso, ele é o maior desafio de todos os ambientes naturais para os microbiologistas, no que diz respeito ao tamanho das comunidades microbianas e a sua diversidade de espécies presentes (DANIEL, 2005). Entre os microhabitats em que os microrganismos do solo podem ser encontrados estão os microporos e agregados de vários tamanhos e composição encontrados na superfície do solo (RANJARD et al. 2001).

O número de microrganismos e suas biomassas coletivas variam dentro e entre os diferentes tipos e condições de solos (WHITMAN et al. 1998), sendo os procariotos os mais abundantes organismos, com 4×10^7 células em um grama de solo de floresta e 2×10^9 células em solos cultivados (DANIEL, 2005), variando de 1.000 a 10.000 de espécies desconhecidas (TORSVIK, et al. 1990).

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (MYERS, 1996; SCHIMEL, 1995). Devido à vasta diversidade, às grandes populações e à longa história evolutiva, os microrganismos vêm contribuindo fortemente para a riqueza e complexidade das interações entre os organismos do solo, incluindo desde simbioses altamente específicas a mutualismos difusos (BEARE et al. 1995). Tais organismos são componentes essenciais no processo de decomposição do solo, no qual resíduos de plantas e animais são degradados em matéria orgânica, liberando nutrientes na cadeia alimentar. Evidências demonstram que os microrganismos naturais são

filogeneticamente mais diversos que o obtido pelas análises de sequências de linhagens cultivadas (HUGENHOLTZ et al. 1996).

Os benefícios científicos esperados de um maior conhecimento sobre a diversidade microbiana são extensos (COLWELL, 1997; HUNTER-CEVERA, 1998), entre outros, a melhor compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes terrestres e o conhecimento das suas interações com outros componentes da biodiversidade, como as plantas e animais.

A diversidade microbiana do solo durante muitos anos tem sido explorada baseada no cultivo e isolamento de espécies microbianas (DANIEL, 2004). O isolamento e cultivo de microrganismos é o método tradicional para a caracterização microbiana, mas somente uma pequena parcela variando de 0,1% a 1,0% bactérias do solo são cultiváveis utilizando métodos padrão de cultivo (TORSVIK, et al. 2002).

Na década de 1980 microbiologistas ambientais perceberam que somente uma pequena parcela dos organismos microscopicamente observáveis de uma amostra ambiental era capaz de formar colônias em meios de cultivo (TRINGE et al. 2005). KELLENBERGER (2001) observou que em 1 g de solo contêm cerca de 10^7 células, entretanto, apenas 0,1% destas puderam ser cultivadas em laboratório, mostrando que 99,9% da diversidade genética daquela população foi perdida por dificuldades de isolamento.

Estima-se que menos de 10% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (STALEY, 1998). A abordagem do cultivo limitou, seriamente, a avaliação taxonômica e filogenética como estimativa da diversidade microbiana, devido à falha de cultivo da maioria dos microrganismos pelos métodos convencionais (PACE, 1997).

Entretanto, técnicas de biologia molecular aplicada ao estudo do meio ambiente têm contribuído significativamente para um grande avanço do conhecimento sobre a diversidade microbiana em amostras ambientais. Para contornar as limitações oferecidas pelo método padrão de cultivo, métodos moleculares baseados no isolamento e análise de ácidos nucléicos sem a necessidade do cultivo dos microrganismos têm sido desenvolvidos. Estes métodos independentes do isolamento e

cultivo de microrganismos tendem a substituir métodos tradicionalmente baseados nestas técnicas para a realização de levantamentos e comparação da composição, diversidade e estrutura de comunidades microbianas (HUGENHOLTZ, et al. 1996).

A metagenômica destaca-se por ser um novo campo de pesquisa desenvolvido ao longo da última década para elucidar os genomas de organismos não cultiváveis, tendo como objetivo compreender melhor a ecologia microbiana global, além de impulsionar processos biotecnológicos para demandas de novos aditivos, enzimas e biomoléculas (SCHMEISSER, et al. 2007).

O termo metagenôma foi primeiramente definido por HANDELSMAN et al. (1998) como sendo o montante total genômico de uma determinada microbiota em um ambiente específico. Esta envolve a extração direta, clonagem, e análise de todos os genomas de um ambiente, proporcionando assim o acesso a todas as comunidades microbianas, incluindo tanto os microrganismos facilmente cultiváveis quanto os não cultiváveis (HANDELSMAN et al. 1998).

A facilidade de acesso ao conteúdo total genético trouxe varias abordagens de estudo para metagenômica. A princípio, o foco principal da metagenômica foi uma melhor compreensão da biodiversidade através da análise de DNA de amostras ambientais (DUPRE et al. 2007). A clonagem e o sequenciamento do gene *16S rRNA*, usado desde os primórdios da microbiologia molecular, a partir do DNA extraído diretamente de amostras ambientais como solo, águas dos oceanos e biofilmes contribuiu para um entendimento mais aprofundado da diversidade e da função das comunidades bacterianas destes ambientes (TRINGE et al. 2005).

No que diz respeito à biotecnologia, a metagenômica veio como uma ferramenta alternativa no âmbito de proporcionar recursos para a descoberta de novas enzimas, compostos químicos e isolamento de genes para o uso em biotecnologia (SCHMEISSER, et al. 2007).

2.2 Prospecção gênica em bibliotecas metagenômicas

A prospecção de genes ainda é um dos grandes desafios para os pesquisadores. A parte crítica deste advento está justamente no processo de seleção de genes de interesse dentre os milhares de clones contidos em uma biblioteca genômica.

As bibliotecas metagenômicas podem ser acessadas para a identificação de um ou mais clones de interesse basicamente por meio de análise funcional de atividade enzimática e baseada em sequências de DNA (figura 1). Enquanto a primeira é mais utilizada para estudos biotecnológicos, este último é provavelmente a abordagem mais expressiva no que diz respeito à identificação de genes funcionais (SCHMEISSER et al. 2007).

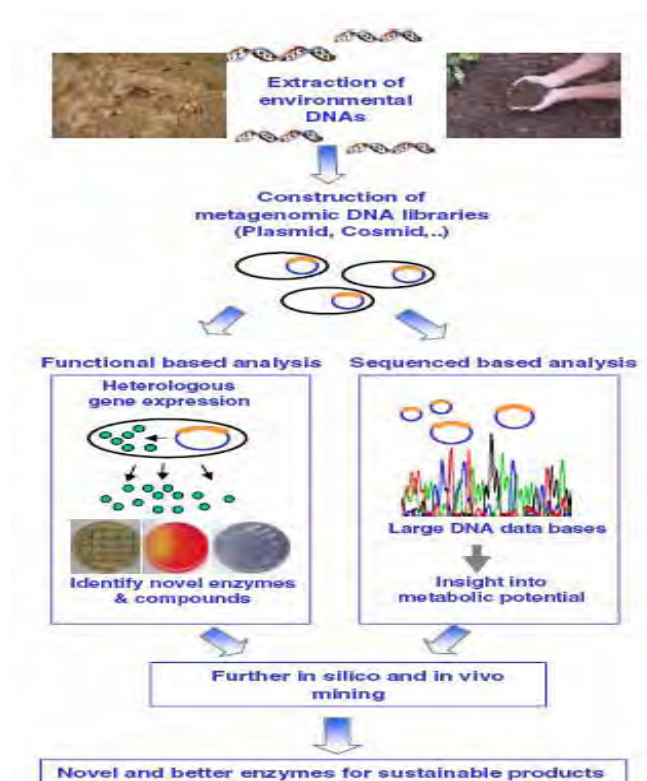


Figura 1: Identificação de novos genes em amostras ambientais. Estratégia baseada na atividade funcional e sequências de DNA (SCHMEISSER et al. 2007)

Na estratégia funcional os clones de interesse são selecionados de acordo com a atividade enzimática desejada através da indução da expressão gênica em meios de cultura específicos (OKUTA et al. 1998). Entretanto, a seleção baseada na atividade funcional gênica tem apresentado algumas limitações, como a dificuldade de algumas enzimas não serem expressas na forma ativa pelas células hospedeira, principalmente em *Escherichia coli* (TERAMOTO, et al. 1999). Além disso, muitos genes necessitam de um sistema complexo para a expressão, dos quais não podem ser satisfeitas pela clássica célula hospedeira de *E. coli* (SCHMEISSER et al. 2007). Diante disso, algumas alternativas como o uso de *Streptomyces lividans* e *Pseudomonas putida* estão sendo testadas como hospedeiros alternativos para este tipo de estudo (MARTINEZ et al. 2004).

Pela abordagem baseada em sequências de DNA, a biblioteca genômica é rastreada utilizando sondas confeccionadas a partir de regiões conservadas ou por meio de oligonucleotídeos degenerados caso haja baixa homologia entre os genes buscados (FERRER, et al. 2005). Uma técnica muito conhecida pelos biólogos moleculares, a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), tem demonstrado eficiência na triagem de bibliotecas para a identificação e isolamento de clones de interesse dentro de uma biblioteca (ISRAEL, 1993; MUNROE et al. 1995). Mas quando se trata da prospecção em milhares de clones, esta técnica se torna limitada.

Entretanto, uma das mais promissoras tecnologias de rastreamento para identificar clones contendo genes alvo em uma biblioteca metagenômica são os microarranjos de DNA, que oferecem uma abordagem eficaz para caracterizar muitos clones de forma rápida e segura (SEBAT et al. 2003). Ela tem sido empregada com grande sucesso na análise de expressão gênica de culturas puras de microrganismos (RICHMOND et al. 1999). Pesquisas recentes mostram que simples modificações e ou adaptações neste tipo de tecnologia em microarranjos podem auxiliar na descoberta de novas metodologias. Utilizando clones de fosmídeos, PARK et al. (2008) provaram que este tipo de análise pode ser adaptada como uma eficiente ferramenta de busca por genes específicos em uma biblioteca metagenômica. A técnica foi nomeada de microarranjos metagenômicos (MGA).

Isso mostra o quanto esta área tem se expandindo em busca de novas alternativas e meios viáveis para o rastreamento em bibliotecas metagenômicas.

2.3 O gene *16S* como marcador molecular

Os RNAs que compõem os ribossomos (rRNAs) estão entre as macromoléculas mais conservadas evolutivamente de todos os sistemas de vida (ATLAS, 1997). Três tipos de rRNA são comuns em ribossomos de procariotos e eucariotos: o 16S (exclusivo de procarioto), 18S (exclusivo de eucarioto), 23S e 5S rRNAs. Baseado na diferença entre os tamanhos, eles foram denominados como subunidade menor (SSU) para os rRNAs 16S e 18S, e subunidade maior (LSU) para o 23S rRNAs (HURST, et al. 2002).

O gene *16S rRNA* é composto por um conjunto de aproximadamente 1550 nucleotídeos (WOESE et al. 1983). Certos atributos deste gene podem favorecê-lo como cronômetros moleculares. As sequências que codificam o rRNA são dotadas de regiões altamente conservadas (WOESE, 1987). Além disso, estas regiões conservadas estão alternadas entre 9 regiões variáveis (V1 a V9) (figura 2).

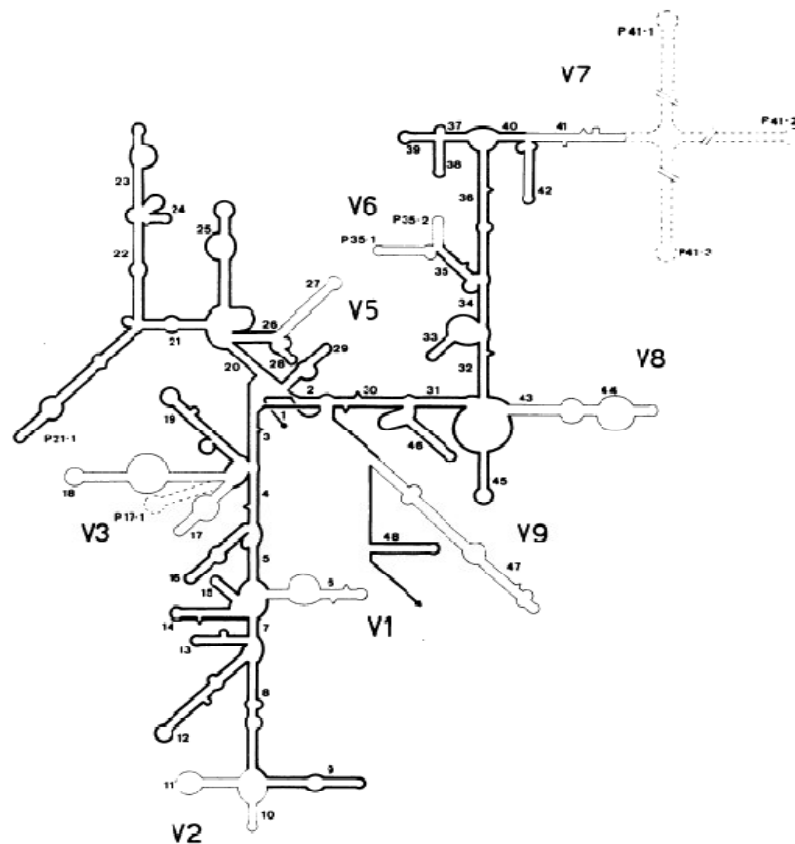


Figura 2: Modelo da estrutura secundária do rRNA. As linhas mais escuras representam regiões mais conservadas e as linhas mais finas representam regiões variáveis (V1 a V9) (DAMS et al. 1988).

A região correspondente a V4 não é encontrada em procariotos. Estas regiões variáveis são utilizadas para determinação de filogenia entre os procariotos (WOESE et al. 1983). Com base nestes conhecimentos, o gene *16S rRNA* vem sendo amplamente utilizado na elucidação da diversidade e filogenia dos microrganismos. Este marcador é tão seguro e aceito pela comunidade científica que um banco de dados específicos para o gene *16S rRNA*, o Ribosomal Database Project (RDP) foi criado e encontra-se disponível para pesquisa e consulta. Atualmente, o banco conta com 856.341 sequências de rRNAs depositadas (COLE, et al. 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do consórcio microbiano

O consórcio microbiano estudado neste trabalho foi desenvolvido e cedido gentilmente pela pesquisadora Dra Maria Benincasa Vidotti do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP.

O solo utilizado para a obtenção do consórcio foi extraído de sítios de contaminação permanente em uma antiga fábrica de lubrificantes localizados em Ribeirão Preto - SP. O local onde as amostras de solo foram coletadas é uma área que recebe este tipo de contaminação a pelo menos quinze anos. Foram coletadas amostras simples ao acaso, com profundidade de 0-20 cm e em zigue-zague, sendo estas reunidas e homogeneizadas resultando em uma amostra composta. Do montante de solo coletado (aproximadamente 500 gramas), 1g foi adicionado a 50 mL de meio mineral BUSHNELL-HAAS BROTH (B.H.B) (Bushnell & Haas, 1941) estéril composto por (g/L): MgSO_4 , 0,2; KH_2PO_4 , 1,0; CaCl_2 , 0,02; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1; KNO_3 , 1; FeCl_3 , 0,05 e mantidos por 12 horas a temperatura de 30° C com agitação de 150 rpm. Após o período de agitação, as suspensões ficaram em repouso por 1 hora para a decantação da parte sólida. Para o enriquecimento, uma alíquota de 500 µL do sobrenadante foi inoculada em 50 mL de meio de cultivo B.H.B estéril contendo 0,1% (v/v) de óleo diesel, esterilizados em autoclave, como única fonte de carbono. O consórcio foi obtido a partir do sétimo dia de desenvolvimento da cultura.

3.1.1 Extração de DNA metagenômico do consórcio

A extração do DNA metagenômico do consórcio microbiano foi realizada utilizando-se FastDNA® SPIN Kit for soil (BIO 101-QUANTUM BIOTECHNOLOGIES), seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. As condições para o uso foram: O método consiste em lisar os microrganismos presentes nas amostras, colocando-se

500 mg de solo em tubos com sílica e adicionando-se 978 μ L de tampão de fosfato de sódio (pH 8,0) e 122 mL de tampão MT. A suspensão foi agitada vigorosamente pelo FastPrepR FP120 (BIO 101 – SAVANT) a velocidade de 5,5 m/s e, posteriormente, o tubo foi centrifugado a 14.000 xg, por 1 minuto, a temperatura ambiente.

O sobrenadante foi coletado, transferido para um novo tubo estéril e a ele foram adicionados 250 μ L de uma solução de precipitação de proteínas, misturando-se cuidadosamente a amostra por inversão por 10 vezes. Em seguida, a solução foi centrifugada a 14.000 xg, por 5 minutos, a 25°C para precipitação do sedimento formado. O sobrenadante foi coletado, transferido para um tubo estéril de 15 mL e a ele adicionado 1 mL do Binding Matrix Superior. A amostra foi misturada por inversão durante 2 minutos e, posteriormente, o tubo foi deixado em repouso por 3 minutos, a temperatura ambiente. Deste, foram removidos 500 μ L do sobrenadante e o restante foi misturado em um agitador de tubos. Todo o volume desta solução foi transferido para um tubo com filtro e este foi centrifugado a 14.000 xg, por 1 minuto, a temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e, novamente, repetiu-se à centrifugação por 1 minuto. Adicionaram-se 500 μ L de solução de lavagem de sais e etanol nomeada pelo fabricante de SEWS-M ao filtro e este foi centrifugado a 14.000 xg, por 3 minutos, a temperatura ambiente, para precipitação dos fragmentos de DNA. O DNA foi eluído adicionando-se no filtro 50 μ L da solução DES contendo água estéril ausente de DNase, e centrifugado a 14.000 xg, por 2 minutos, a temperatura ambiente. Ao final, as amostras foram mantidas a -20°C.

3.1.2 Quantificação do DNA

A quantificação foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 μ g/mL). A eletroforese foi realizada em uma cuba modelo Horizon 58 com uma alíquota de 3 μ L de DNA adicionada de 3 μ L de tampão de carregamento [0,025% (p/v) de azul de bromofenol e 50% de glicerol (v/v)] e conduzida em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3), a 100

V. Foi aplicado ao gel uma alíquota de plasmídeo pGEM (APPLIED BIOSYSTEMS) com concentração conhecida (50 ng/μL) em diferentes volumes para comparar a intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídio e cálculo da concentração do material.

A visualização do DNA foi realizada sob luz UV e a imagem foi documentada em um fotodocumentador (BIO RAD – GEL DOC 1000), através do software Quantity One^R (BIO RADTM, HERCULES, CA, USA). Para avaliar a contaminação por proteína, o DNA também foi quantificado em Biophotometer (EPPENDORF) e o critério de avaliação foi baseado nos resultados obtidos pela relação dos comprimentos de onda 260/280.

3.1.3 Determinação do tamanho do DNA por eletroforese em campo pulsado

Para determinar o tamanho real do DNA extraído, as amostras foram analisadas por eletroforese de campo pulsado em gel de agarose para campo pulsado 1% (p/v). A eletroforese foi realizada em uma cuba modelo CHEF MAPPER 3 (BIO-RAD) e conduzida em tampão TEB 0,5X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3), a 6 V por 20 horas. Foram usados como padrões de tamanho molecular os seguintes marcadores: 1 Kb plus DNA ladder (Fermentas) , Lambda *EcoRI* + *HindIII* (Promega).

3.2 Construção da biblioteca metagenômica de 16s rDNA para análise da biodiversidade

3.2.1 Amplificação do gene 16S rRNA

O gene *16S rRNA* dos microrganismos presentes na amostra do consórcio foi amplificado por reação de PCR utilizando o conjunto de iniciadores fD1 (posição 8 – 27) e rD1 (posição 1524 - 1540) do gene *16S rRNA* em *Escherichia coli* estirpe K12, de acordo com WEISBURG, et al. (1991) e as condições acrescidas das seguintes modificações: Tampão PCR 1X [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl], 200 μ M de cada dNTP, 2 mM de $MgCl_2$, 1,25 U de Taq DNA Polimerase, 5 pmols de cada iniciador, 35 nanogramas de DNA metagenômico e água ultra pura completando o volume final de 50 μ L na reação. Para isso, foi utilizado o termociclador, MJ Research Inc., modelo PTC - 200 com o seguinte programa: 94°C por 2 min, 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 55°C por 50 seg, 72°C por 2 min e 72°C por 5 min. Os “amplicons” gerados foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,5 μ g mL⁻¹ de brometo de etídeo, tampão TBE (Tris 89 mM; Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2.5 mM, pH 8,3) e visualizado em um fotodocumentador Gel Doc 1000, com luz UV (Bio Rad, USA).

3.2.2 Eluição dos produtos de PCR

O produto de PCR foi submetido a uma eletroforese preparativa em gel de agarose de baixo ponto de fusão 1,0% (p/v) em tampão TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA). A cuba foi esterilizada em fluxo laminar sob luz UV, por 15 minutos. A região do gel contendo insertos de tamanho 1,5 kilobases (Kb) foi marcada e cortada com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sendo depositada em tubos de 1,5 mL, aproximadamente 400 mg de gel/tubo. A recuperação dos fragmentos de DNA do gel de agarose foi realizada com a utilização do GENECLEAN® Kit (Q-BIOGENE), de

acordo com a descrição do fabricante. O DNA obtido foi analisado em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TBE 1X, adicionado de brometo de etídio (0,5 µg/mL), com a finalidade de quantificação e visualização da qualidade deste DNA recuperado. A quantificação foi realizada com o uso do software Quantity One (BIO RAD™, HERCULES, CA, USA), por comparação de intensidade das bandas na presença de concentrações conhecidas. O DNA obtido também foi analisado em espectrofotômetro NanoDrop ND-100 para a determinação da concentração e pureza da amostra.

3.2.3 Clonagem em vetor pGEM® T Easy

A clonagem dos fragmentos de *16S rDNA* amplificados da amostra do consórcio foi feita de forma aleatória utilizando-se o kit comercial vetor pGEM® -T (Promega) específico para clonagem de fragmentos de PCR de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.4 Transformação das células competentes

Na etapa de transformação, foram utilizadas células competentes de *E. coli* DH5α (HANAHAN, 1983), células estas gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal. Todo o procedimento realizado seguiu as instruções fornecidas pelo manual do fabricante do vetor pGEM® T Easy (Promega).

3.2.5 Coleta de clones transformantes

As colônias transformantes foram coletadas aleatoriamente com o auxílio de palitos de madeira esterilizados por autoclavagem. Os clones foram organizados em placas do tipo ELISA de 96 poços preenchidas com 100 µL de meio líquido LB

acrescido de 100µg/mL de ampicilina e incubados durante a noite em estufa B.O.D. a 37°C durante 22 horas. No dia seguinte foram adicionados 100 µL de glicerol 40% (v/v) estéril às culturas. As placas foram então seladas com adesivos e armazenadas a -80°C.

3.2.6 Cultivo dos clones bacterianos e extração do DNA plasmidial

O DNA dos clones foram extraídos segundo SAMBROOK, et al. 1989, com modificações como a introdução de filtros para a purificação DNA. Os clones foram cultivados em 1 mL de meio CG (Circle Grow), acrescido de 100 µg/mL ampicilina. Em seguida, foram submetidos a uma agitação contínua de 240 rpm à 37°C° durante 22 horas. Após o crescimento, os clones foram centrifugados durante 6 minutos, 20C°, a 3220 xg, sendo o sobrenadante descartado e a placa invertida em papéis absorventes durante 5 minutos. Foram colocados 240 µL de solução GET (Glicose 50mM; Tris- HCl 25 mM (pH 8); EDTA 10 mM) em cada poço. A placa foi agitada vigorosamente até que todas as células ficassem totalmente ressuspensas de forma homogênea. Centrifugou-se a 3220 xg por 6 minutos, a 20°C. Novamente os sobrenadantes foram descartados e a placa colocada invertida em papel para a secagem. A cada poço foram adicionados uma solução de GTE/RNase composta por 80 µL de solução GET e 5 µg de Ribonuclease A e as amostras ressuspensas por agitação vigorosa. Transferiu-se 60µL do ressuspensado para uma micro placa de 250 µL e a elas foram adicionadas 60 µL de solução de lise (NaOH 0,2 N; SDS 1%). A placa foi selada e invertida 10 vezes, incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugada por 30 segundos a 50 xg. Foi adicionado 60 µL de acetado de potássio 3M pH 5,2, misturando-as novamente por inversão. Novamente centrifugou-se a placa a 50 xg por 30 segundos, a 20°C para a deposição do material e em seguida incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, o adesivo foi removido e a placa colocada em uma estufa numa temperatura de 90°C, durante exatamente 30 minutos. Logo depois, a placa foi

resfriada sobre o gelo, durante 10 minutos, e centrifugada a 3220 xg por 6 minutos a 20°C.

O sobrenadante obtido foi colocado em um filtro (PVDF – 0,2 µm – Millipore) fixado no topo de uma microplaca de fundo em V de 250 µL de polipropileno, verificando se os poços estavam realmente alinhados para que um clone não se misture a outro durante o processo de filtração, e centrifugado a 3220 xg por 6 minutos, a 20°C. Ao filtrado foi adicionado 110 µL de isopropanol absoluto, sendo a solução invertida por 20 vezes. O material foi centrifugado a 3220 xg por 45 minutos e o sobrenadante descartado, deixando a placa invertida durante cinco minutos em papel absorvente; 200 µL de etanol 70% gelado foram adicionados centrifugando novamente as amostras. Os sobrenadantes foram descartados e a placa colocada invertida em papel.

Para secagem do precipitado formado, a placa foi deixada durante 1 hora em temperatura ambiente e em seguida cada amostra de DNA foi ressuspensa em 40 µL de água milli-q autoclavada.

A quantificação das amostras foi realizada segundo o item 3.1.2

3.2.7 Reação de restrição dos clones para detecção dos insertos

Para a validação da clonagem, o DNA plasmidial de 12 clones, escolhidos aleatoriamente, foram submetidos a uma reação de restrição com a enzima *EcoRI* (Biolabs). As condições utilizadas foram: 200 ng de DNA plasmidial; 1U de enzima, tampão 1X em um volume final de 15 µL. A reação foi incubada a 37°C durante 1 hora. Os fragmentos foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1%.

3.2.8 Sequenciamento dos clones

O sequenciamento parcial dos fragmentos de DNA 16S rRNA clonados foram realizadas em microplacas nas seguintes condições: 0,7 DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare); 10 pmols do oligonucleotídeo iniciador T7 promoter sequencing iniciador (20-mer); 3 µL tampão 5X (400 mM Tris-HCl pH 9; 10 mM MgCl₂); 120 ng de DNA e água Milli-Q esterilizada para completar um volume de 10 µL. As placas foram seladas com um adaptador de silicone e levadas ao termociclador seguindo o programa: 40 ciclos (96°C por 30 segundo, 50°C por 15 segundos e 60°C por 2 minutos). Após a reação de sequenciamento, os fragmentos de DNA foram precipitados e os ddNTPs marcados por fluorescência não incorporados foram retirados por sucessivas lavagens.

Para a precipitação do DNA amplificado marcado pela PCR de sequenciamento foram adicionados 80 µL de isopropanol 75% (v/v) às amostras; as placas foram agitadas, cuidadosamente, em vortex por alguns segundos, incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugadas a 20°C por 45 minutos, a 3220 xg. Os sobrenadantes foram descartados e 150 µL de etanol 70% (v/v) foram adicionados às amostras. As placas foram centrifugadas por 10 minutos na mesma temperatura e força centrífuga descrita anteriormente, e os sobrenadantes foram descartados. As placas foram secas durante 30 minutos no fluxo laminar na ausência de luz. Para a aplicação no sequenciador, as amostras foram ressuspensas em 9 µL de Hi-Di Formamide (ABI PRISM), submetidas à desnaturação por 5 minutos, a 95°C. O sequenciamento foi realizado em um aparelho de capilar modelo 3700 DNA Analyzer ABI Prism.

3.2.9 Análises das sequências

Após o sequenciamento, os eletroferogramas foram analisados com o auxílio do programa Phred/Phrap (EWING et al. 1998a; EWING & GREEN, 1998b) usado na

detecção da confiabilidade de cada base sequenciada e formação dos contigs, respectivamente. Com o auxílio de outro programa, ContGEN, foram selecionadas somente aquelas sequências que apresentaram mais de 400 bases com qualidade Phred ≥ 20 . Regiões iniciais contendo sequências de vetores foram extraídas com o auxílio do módulo de análise de sequências da ferramenta OC Identifier (CANTÃO et al. 2007). Todas as sequências foram inseridas no banco de dados metagenômico do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (<http://lbmp.fcav.unesp.br/metagenoma>). Primeiramente, as sequências foram comparadas com Banco Internacional de Genes, National Center for Biotechnology Information (NCBI), usando a ferramenta BLASTN (ALTSCHUL et al. 1997) com o objetivo de identificar as sequências distintas, baseado no “Gene IDs”. As sequências distintas foram comparadas com o banco de dados de genes ribossomais do Ribosomal Database Project II (COLE, et al. 2009), por meio do programa *Classifier* (WANG, et al. 2007). Para as análises das relações filogenéticas, as sequências distintas foram alinhadas usando o programa ClustalX 1.83 (THOMPSON et al. 1997). A árvore filogenética foi construída com o auxílio do programa Mega 4 (TAMURA et al. 2007) usando o algoritmo do vizinho mais próximo neighbor-joining (SAITOU & NEI, 1987) e o modelo de substituição de nucleotídeo Kimura 2-P (KIMURA, 1980). O resultado do alinhamento também serviu para construir uma matriz de distâncias, usando o programa DNAdist (FALSENSTEN, 1989), e esta matriz foi utilizada como entrada de dados para o programa DOTUR (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2005) para análise de suficiência amostral da diversidade.

3.2.10 Números de acesso das sequências de nucleotídeos

Todas as sequências de 16S rDNA obtidas neste estudo foram cadastradas no Banco Internacional de Genes (GenBank) e receberam os seguintes números de acesso: FJ978048 a FJ978478.

3.3 Construção da biblioteca metagenômica a partir de DNA do consórcio microbiano utilizando.

3.3.1 Reparo das extremidades dos fragmentos para clonagem em vetor fosmideo

O Kit utilizado na montagem da biblioteca metagenômica é o “CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit com pCC2FOS™ Vector”, fabricado pela empresa EPICENTRE® Biotechnologies. As reações descritas seguem as condições sugeridas pelo fabricante do Kit de clonagem.

A reação de reparo das extremidades do DNA metagenômico, obtido de amostras consórcio, foi realizada para que este pudesse ser ligado ao vetor, que vem aberto no sítio de restrição da enzima *Sma*I, cujo corte gera extremidade abrupta, fez-se necessário realizar o reparo das extremidades do inserto.

Uma combinação das enzimas T4 DNA polimerase (bacteriófago T4) e Klenow DNA polimerase (*E. coli*) foi utilizada para o preenchimento de terminais nos fragmentos de DNA, através da incorporação de nucleotídeos complementares livres em terminais 3' da dupla fita de DNA. Adicionalmente, a atividade exonucleásica 3'→5' da T4 DNA polimerase degrada extremidades protuberantes nos terminais 3'.

Para cada amostra contendo até 22 µg de DNA metagenômico, em um volume de 50 µL, foram acrescentados 8 µL de 10X tampão de reparo (EPICENTRE), 8 µL de uma mistura de dNTPs, 8 µL de ATP 10 mM e 4 µL de enzima de reparo (EPICENTRE). A reação foi mantida a temperatura ambiente por 45 minutos e em seguida a 75°C, por 20 minutos, para inativação das enzimas. Os tubos foram estocados a 4°C até serem utilizados.

3.3.2 Seleção do tamanho dos insertos

Uma vez que os fragmentos de DNA metagenômico foram reparados, os mesmos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para separação por tamanho dos fragmentos e posterior recuperação.

A seleção do tamanho do DNA foi feita através de eletroforese preparativa em gel de agarose de baixo ponto de fusão 1% (p/v), isento de brometo de etídio. A cuba de eletroforese foi previamente descontaminada com exposição a luz UV por 15 minutos.

Uma alíquota de 20 µL, aproximadamente 20 ng de DNA metagenômico, foi aplicada no gel e ao lado 100 ng do marcador de 36 Kb “T7 control DNA” (EPICENTRE). A amostra foi aplicada em um poço largo do gel. A eletroforese foi conduzida em tampão TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA) isento de brometo de etídio, a voltagem constante 30 V por 14 horas.

Após a eletroforese, foi realizado um corte vertical no gel de agarose resultando duas porções de gel, uma contendo os insertos a serem recuperados e outra com o marcador e a amostra comparativa para corar. A porção do gel que continha o marcador foi corada com brometo de etídio e observada sob um transiluminador. O padrão de bandejamento serviu como guia para obtenção dos insertos na porção não corada do gel, colocando-se as duas partes do gel lado a lado. A região do gel contendo insertos de tamanho desejado, em torno de 30 Kb foi marcada e cortada com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sendo depositada em tubos de 1,5 mL, com aproximadamente 400 mg de gel/tubo. Os pedaços de agarose que continham o DNA de tamanho selecionado foram armazenados a 4°C até o momento do uso. O restante do gel foi corado, visualizado em luz UV e documentado em fotodocumentador, através do software Quantity OneR (BIO RAD™, HERCULES, CA, USA).

Foram realizados experimentos para recuperação de fragmentos de DNA entre 20 e 45 Kb, aproximadamente.

3.3.3 Eluição dos fragmentos reparados do gel

Os tubos contendo os fragmentos de gel de agarose foram incubados em banho-maria a 65°C durante 15 minutos. Cada amostra teve seu volume igualado a 500 µL, completando o volume com TE (10:1) pH 8,0, quando necessário. O tampão da enzima gelase (10 µL) e a enzima gelase (3µL) foram adicionados aos tubos. As amostras foram incubadas em banho-maria a 45°C por 1 hora. Em seguida, a reação foi submetida a 70°C por 15 minutos para inativação da enzima. O material foi centrifugado a 14.000 *xg* por 10 minutos para precipitação do material insolúvel. Cuidadosamente, foram transferidos 95% (v/v) do sobrenadante para um tubo novo. Adicionou-se 1/10 de volume de Acetado de sódio 3 M (pH 7,0) seguido de 2 volumes de etanol absoluto. A precipitação se deu a temperatura ambiente por 10 minutos. O tubo foi centrifugado a 14.000 *xg* por 30 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% (v/v) e centrifugado 14.000 *xg* por 15 minutos a 4°C. O DNA precipitado foi ressuspensionado num volume total de 40 µL e quantificado em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL). A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 1X, a voltagem constante de 90 V por 1 hora.

3.3.4 Clonagem dos insertos em vetor fosmídeo

O vetor usado na clonagem possui 8.181 pares de bases (Figura 3). É fornecido pronto para uso, linearizado no sítio de restrição único da enzima *Sma*I e desfosforilado.

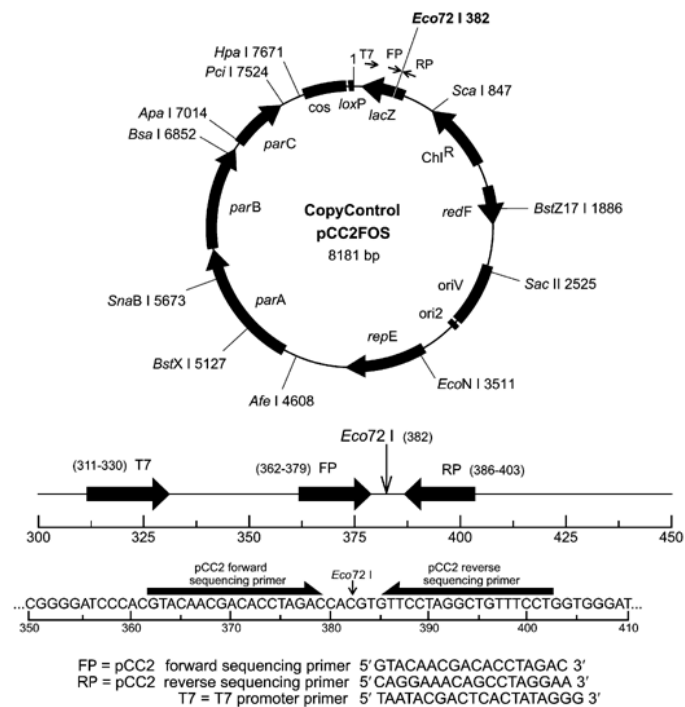


Figura 3. Esquema ilustrativo apresentando características do vetor pCC2FOSTM (EPICENTRE).

3.3.5 Reação de ligação

A ligação foi efetuada mantendo uma relação de concentração de insertos de DNA metagenômico com vetor na proporção [1:10], relação esta exigida pelo kit. Para o cálculo da razão molar foi utilizada a seguinte fórmula:

$$mi = \frac{Ti \cdot mv}{10 \cdot Tv} \quad \text{onde: } mi = \text{massa do inserto}$$

$Ti = \text{tamanho do inserto}$

$mv = \text{massa do vetor}$

$Tv = \text{tamanho do vetor}$

A reação foi executada em um volume de 20 μL contendo 2 μL de inserto DNA metagenômico ($\pm 0,2 \mu\text{g}$, $\pm 30 \text{ Kb}$), 1 μL de vetor pCC2FOS, 2 μL de tampão fast-link ligation buffer 10X (EPICENTRE), 1 μL de ATP 10 mM, 1 μL da enzima fast link DNA ligase (EPICENTRE) e 13 μL de H_2O Milli-Q estéril. A reação foi mantida a temperatura ambiente (25°C) por 3 horas e depois a 70°C por 10 minutos para inativação da enzima. Os fosmídeos ligados ao inserto foram armazenados a -20°C .

3.3.6 Reação de empacotamento

Um tubo de extrato de empacotamento com 50 μL foi retirado do freezer -80°C , e mantido no gelo por 5 minutos. Ao material ligado foi adicionado 25 μL de extrato de empacotamento. As amostras foram agitadas cuidadosamente e incubadas em um termociclador à 30°C por 90 minutos. Passado esse período, foram adicionados mais 25 μL do restante de extrato de empacotamento e novamente incubadas a 30°C por mais 90 minutos. Em seguida, foi adicionado 500 μL de tampão de diluição de fagos [10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2] e 25 μL de clorofórmio. Os tubos foram agitados por inversão e estocados a 4°C .

3.3.7 Preparo do inóculo de células EPI300-T1^R

Um dia antes da realização da reação de empacotamento, uma colônia isolada de células EPI300-T1^R crescida em placas com meio Luria Bertani (LB) suplementado com 10 mM MgSO_4 , foi inoculada em 50 mL de meio LB também suplementado com 10 mM MgSO_4 , ficando sob agitação de 250 rpm overnight a 37°C . No dia da reação de empacotamento, 50 mL LB suplementado com 10 mM MgSO_4 foi inoculado com 5 mL das células cultivadas anteriormente durante a noite e cultivado sob a mesma agitação a 37°C até atingir a densidade ótica a 600 nm entre 0,8 e 1,0. A densidade ótica foi determinada no “Biophotometer” (EPPENDORF). As amostras foram mantidas a 4°C .

até o momento do uso.

3.3.8 Infecção das células EPI300-T1^R

Cada 10 µL da solução com os fosmídeos empacotados foi misturado, em condições estéreis, a uma alíquota de 100 µL de células EPI300-T1^R. Os tubos foram gentilmente agitados e incubados em banho a 37°C por 20 minutos. Após esse período, os 110 µL de cada um dos tubos foi aplicado em placa contendo meio de cultura LB com cloranfenicol (12,5 µg/mL). As placas foram incubadas overnight em uma B.O.D a 37°C.

Os clones foram coletados e estocados conforme o item 3.2.5.

3.3.9 Cultivo dos clones bacterianos e extração do DNA fosmidial

O DNA fosmidial dos clones selecionados foram extraídos segundo SAMBROOK et al., (1989). Os clones da biblioteca metagenômica foram inoculados (10 µL) em 3 mL de meio CG adicionado de 12,5 µg/mL de cloranfenicol em tubos de 15 mL, sendo submetidos a uma agitação contínua de 240 rpm à 37°C° durante 22 horas. O crescimento bacteriano foi centrifugado a 15294 xg por 6 minutos e em seguida descartado o sobrenadante. A cada tubo adicionou-se 100 µL de solução I (50 mM glucose; 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0), submetendo-os a agitação vigorosa por 2 minutos.

Adicionou-se 150 µL da solução II (0,2 NAOH; 1% de SDS) fresca. Os tubos foram invertidos 5 vezes para a mistura e incubados 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de solução III gelada (5 M de acetado de potássio (60 mL); ácido acético glacial (11,5 mL); água (28,5 mL)) e em seguida agitou-se o tubo vigorosamente para dispersar a solução III por todo o material viscoso formado. Incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente. Os tubos foram

centrifugados a 12000 xg por 8 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e a esses foram adicionados um igual volume de fenol: clorofórmio (1:1). Misturou-se os tubos no vórtex por alguns segundos, centrifugando novamente a 12000 xg por 5 minutos a 4°C. Novamente o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionando 2,5 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaOAc 3 M pH 5,2. Deixou-se as amostras a – 80°C durante 30 minutos para melhor precipitação do DNA.

Os tubos foram centrifugados a 13000 xg por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e os tubos invertidos no papel absorvente durante 5 minutos para permitir a drenagem de todo fluido restante de etanol. O precipitado formado foi lavado com 1 mL de etanol 70% e seco a temperatura ambiente por 1 hora.

O DNA resultante foi ressuscendido em 35 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) contendo RNase (20 µg/mL). As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Em seguida foram estocadas à -20°C. A quantificação do DNA dos fosmídeos foi realizado seguindo as mesmas condições do item 3.1.2.

3.3.10 Digestão do DNA fosmidial

Clones escolhidos ao acaso foram utilizados em análises de restrição. Para digestão com a enzima *Bam*HI (PROMEGA), em tubos de 1,5 mL foram adicionados 2 µg de DNA fosmidial, 2 µL de tampão 10X e (PROMEGA), 1 µL da enzima de restrição *Bam*HI (20 U/µL), completando-se o volume com água destilada estéril para 20 µL. O material foi incubado a 37°C por 1 hora.

Para digestão com a enzima *Hind*III (PROMEGA), em tubos de 1,5 mL foram adicionados 15 µg de DNA fosmidial, 2 µL de tampão 10X (PROMEGA), 0,5 µL da enzima de restrição *Hind*III (20 U/µL), completando-se o volume com água destilada estéril para 20 µL. O material foi incubado a 37°C por 1 hora. A escolha das enzimas foi devido ao fato destas serem consideradas como enzimas de cortes frequentes.

3.3.11 Análise das digestões por eletroforese em campo pulsado

As digestões foram analisadas por eletroforese em campo pulsado “Pulse Field” em gel de agarose 1% (p/v). A eletroforese foi realizada em uma cuba modelo CHEF MAPPER 3 (BIO-RAD) e conduzida em tampão TEB 0,5X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3), a 6 V por 20 horas. O programa utilizado separa fragmento que variam entre os tamanhos de 10 a 100 Kb. Foram usados como padrões de tamanho molecular os seguintes marcadores: 1 Kb plus DNA ladder (LIFE TECHNOLOGIES), T7 control DNA (EPICENTRE) de 36 Kb, marcador 8 – 48 Kb (BIO-RAD) e Lambda *EcoR*I + *Hind*III (PROMEGA).

O tamanho aproximado dos foscídeos e seus respectivos insertos de DNA metagenômico foram estimados pelo “software” DNA frag Version 3.03 (SCHAFFER; SEDEROFF, 1981).

3.4 Preparação dos macroarranjos dos “pools” de DNA

3.4.1 Extração e quantificação dos “pools” de DNA fosmidial

Os clones da biblioteca metagenômica foram inoculados (10 µL) em 1 mL de meio CG adicionado de 12,5 µg/mL de cloranfenicol, em placas de cultivo de bactérias (Mega Titer, 96 wells, 2,5 mL). As placas foram incubadas com agitação de 300 rpm, a 37°C, por 22 horas. Após a incubação, as placas foram centrifugadas por 10 minutos, a 3220 xg x g, a 20°C. O sedimento foi lavado por ressuspensão em 240 µL de solução GTE, agitação em vórtex por 2 minutos e centrifugação a 3220 xg a 20°C, por 10 minutos. O pelete bacteriano da placa toda foi novamente ressuspensionado em 100 µL solução GTE e todos (96 clones) reunidos em uma única amostra conjunta, em um tubo de 15 mL, resultando assim em uma amostra composta de 9,6 mL. Do volume final retirou-se 1 mL para a extração de DNA. Este procedimento foi realizado para todas as placas obtidas na biblioteca metagenômica do consórcio microbiano.

O “pool” de DNA fosmidial de cada placa foi obtido com o auxílio do GFX Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare), e as condições de extração foram de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido foi quantificado de acordo com o item 3.1.2.

O tubo de 15 mL contendo o restante dos 96 clones de cada placa da biblioteca foi centrifugado por 10 minutos, a $4000 \times g$, a 20°C e o pelete estocado a -20°C .

3.4.2 Construção do macroarranjo dos “pools” de DNA dos fosmídeos

O macroarranjo dos “pools” de DNA da biblioteca metagenômica do consórcio microbiano foi construído com a utilização de um sistema de “Slot Blot” (Life Technologies). O DNA dos clones da biblioteca metagenômica foi fixado em uma membrana de nylon carregada positivamente (Zeta Probe Blotting Membranes, BIO-RAD) de acordo com o procedimento descrito a seguir.

Um volume final de 0,5 mL contendo aproximadamente 200 ng de DNA, acrescido de NaOH (0,4 M) e EDTA (10 mM) foi aquecida a 100°C por 10 minutos e mantida em gelo até o momento do uso. Uma membrana de nylon com dimensões $12 \times 8 \text{ cm}^2$ previamente umedecia por imersão em água Milli-Q foi colocada no equipamento de Slot Blot. O equipamento foi montado e aplicou-se uma pressão negativa (vácuo) ao sistema, certificando-se sempre de que todos os componentes estão bem vedados sob ação do vácuo, evitando assim a contaminação entre os poços. Ainda sob ação do vácuo os poços foram lavados com água Milli-Q e posteriormente as amostras previamente aquecidas foram aplicadas. Após a sucção completa das amostras pelo sistema, a cada poço foi aplicado 0,5 mL de uma solução de NaOH 0,4 M. Manteve-se o vácuo até certificar-se que toda a solução de NaOH houvesse passado pela membrana. Após esta etapa, o vácuo foi desfeito, a membrana retirada do equipamento e lavada em solução 2X SSC [1,8% de NaCl (p/v) e 1,5% de ácido cítrico (p/v)]. A seguir, o DNA aplicado foi fixado à membrana utilizando-se o aparelho Ultraviolet Crosslinker (CL-508), através de exposição a 120.000 microjoules por cm^2 por 30 segundos. A membrana também foi seca em forno a 70°C por duas horas.

3.4.3 Reação de PCR com oligonucleotídeos específicos

Os oligonucleotídeos testados (Tabela 1) para a prospecção dos genes nas amostras de DNA obtidas a partir do consórcio microbiano, foram elaborados com base no trabalho realizado por Luz et al. 2004.

Tabela 1: Lista dos oligonucleotídeos e referências dos organismos utilizados neste trabalho

Gene	Produto PCR (Kb)	Organismos referências (Número de acesso no GenBank)	Referência
Alcano monooxigenase			
Pp <i>alkB</i> -F	0,87	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 29347 (X65936)	VAN BEILEN et al. 2001
Rh <i>alkB1</i> -F2	0,642	<i>Rhodococcus</i> sp. Q15 (AF388181)	WHYTE et al. 2002
Rh <i>alkB2</i> -F1	0,552	<i>Rhodococcus</i> sp. Q15 (AF388182)	WHYTE et al. 2002
Ac <i>alkM</i> -F	0,496	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP-1 (AJ002316)	RATAJCZAK et al. 1998
Naphtaleno dioxigenase			
<i>ndoB</i> -F	0,642	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 17484 (M23914)	KURKELA et al. 1988
Tolueno dioxigenase			
<i>todC1</i> -F	0,56	<i>Pseudomonas putida</i> F1 (J04996)	ZYLSTRA and

GIBSON 1989

**Cathecol 2,3
dioxigenase**

<i>xyIE-F</i>	0,834	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 33015 (M65205)	NAKAI et al. 1983
<i>cat23 1a-F</i>	0,405- 0,408	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 33015 (M64747)	LARAMÉE et al. 2000

Para todos os oligonucleotídeos foi feita uma avaliação do gradiente da temperatura de pareamento, tendo como base a temperatura padrão descrita por LUZ et al. (2004) de 60°C e um gradiente de 7°. A reação de PCR foi realizada de acordo com Luz et al. (2004) acrescidas de modificações: Tampão PCR 1X [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl], 200 µM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 1,25 U de Taq DNA Polimerase, 15 pmols de cada iniciador, 90 ng de DNA metagenômico e água ultra pura completando o volume final de 50 µL na reação.

3.4.4 Hibridização dos macroarranjos

Para a prospecção gênica nos macroarranjos de DNA realizou-se a hibridização destes com as sondas previamente sintetizadas. Tal procedimento foi realizado utilizando-se o “Kit Amersham AlkPhos Direct Labeling and Detection System with CDP-*Star* (GE Healthcare)”, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante no manual do produto.

Após a aplicação do reagente de detecção CDP-*Star* as membranas foram envoltas em filme plástico PVC e expostas em filme revelação HyperfilmTM ECL (GE Healthcare) por diferentes períodos. A revelação foi realizada com Fixador e Revelador GBX (Kodak). As imagens foram captadas com auxílio de um “scanner” (HP Photosmart C3180) e foram convertidos em extensão “TIFF” monocromática 16 bits.

3.4.5 Identificação dos clones

Após a identificação da placa, partiu-se para a identificação do possível clone contendo o gene de interesse. A placa selecionada foi crescida em meio CG adicionado de 12,5 µg/mL de cloranfenicol durante 22 horas a 37 °C sob uma agitação de 250 rpm. A extração do DNA foi realizada através da lise celular por fervura. A metodologia foi seguida de acordo com as condições sugeridas pelo fabricante da membrana de nylon (BIO-RAD). O pelete bacteriano dos clones foram ressuspensionado em 500 µL de solução contendo NaOH (0,4 M), EDTA (10 mM) e aquecidos a 100 °C durante 15 minutos. Os tubos foram centrifugados a 14.000 xg por 6 minutos a 20 °C. Em seguida, estes foram transferidos ao gelo, o sobrenadante coletado e transferido para membrana. O sistema de transferência para membrana foi o mesmo descrito no item 3.4.2.

As hibridizações também foram realizadas de acordo com a descrição do item 3.4.4.

3.5 PCR de sequenciamento dos clones positivos

O sequenciamento do produto de PCR dos clones seguiu as seguintes condições: 0,5 µL de DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare); 5 pmols do oligonucleotídeo iniciador; 80 ng de DNA em um volume final de 10 µL. As condições no termociclador foram: 40 ciclos de 95 °C por 20 seg, 53,2 °C por 1 min., 60 °C por 2 min.

Para a precipitação do DNA de sequenciamento foram adicionados 80 µL de isopropanol 75% (v/v) às amostras; as placas foram agitadas, cuidadosamente, em vórtex por alguns segundos, incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugadas a 20 °C por 30 minutos, a 4000 x g. Os sobrenadantes foram descartados e 150 µL de etanol 70% (v/v) foram adicionados às amostras. As placas foram centrifugadas por 10 minutos na mesma temperatura e força centrífuga descrita

anteriormente, e os sobrenadantes foram descartados e esse procedimento foi repetido. As placas foram secas durante 30 minutos no fluxo laminar na ausência de luz.

Para a aplicação no sequenciador, as amostras foram ressuspendidas em 9 µL de Hi-Di Formamide (ABI PRISM), submetidas à desnaturação por 5 minutos, a 96°C.

Os “amplicons” foram sequenciados em um sequenciador de capilar modelo 3700 DNA Analyzer ABI Prism (Applied Biosystems).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise do DNA metagenômico

A análise eletroforética em gel de agarose 0,8% permitiu avaliar o padrão de concentração e tamanho aproximado do DNA metagenômico (figura 4). A concentração estimada de DNA, avaliada através da comparação de intensidades de concentrações conhecidas, foi de 12.500 ng, em um volume final de 50 μ L. Resultado este satisfatório, levando em consideração que são necessários 20.000 ng de DNA para a confecção da biblioteca metagenômica. As amostras extraídas mostraram qualidade satisfatória, livre de contaminações por RNA. O resultado adquirido pelo biofotômetro foi de 1,87 na relação 260/280, indicando ausência de contaminação de proteínas nas amostras.

A eletroforese em campo pulsado permitiu com grande exatidão determinar o perfil real de tamanho do DNA extraído do consórcio (Figura 5). Os resultados obtidos comparados com os padrões de tamanho molecular usados na corrida mostram fragmentos com tamanhos variados entre 4 Kb a 21Kb. Uma pequena porção do DNA apresentou fragmentos acima de 21 Kb.

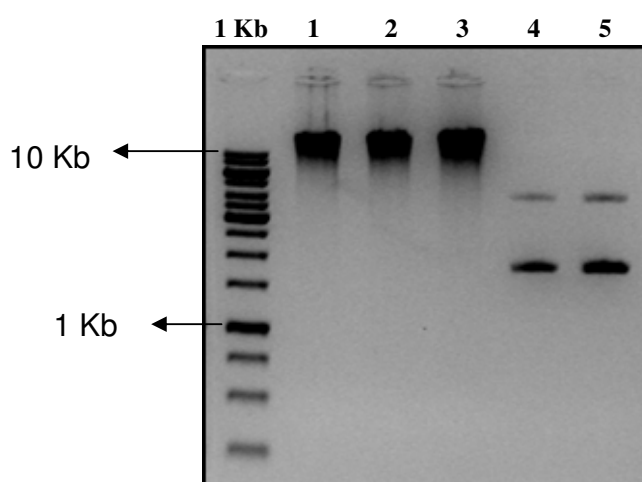


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 0,8% da extração de DNA metagenômico do consórcio. 1, 2 e 3 repetições do DNA metagenômico do consórcio. 4 e 5 pGEM com 50 e 100ng de DNA respectivamente.

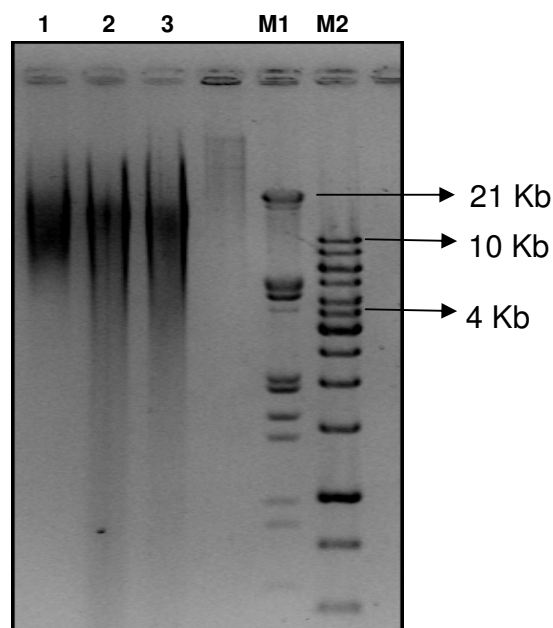


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 0,8% da extração de DNA metagenômico do consórcio. 1, 2 e 3 repetições do DNA metagenômico do consórcio. M1; M2 1 Kb DNA ladders fermentas.

4.2 Diversidade bacteriana do consórcio

A amplificação do gene *16S rRNA* com os iniciadores fD1/rD1 gerou fragmentos de aproximadamente 1,5 Kb, tamanho já esperado, os quais foram utilizados para a construção da biblioteca metagenômica (figura 6).

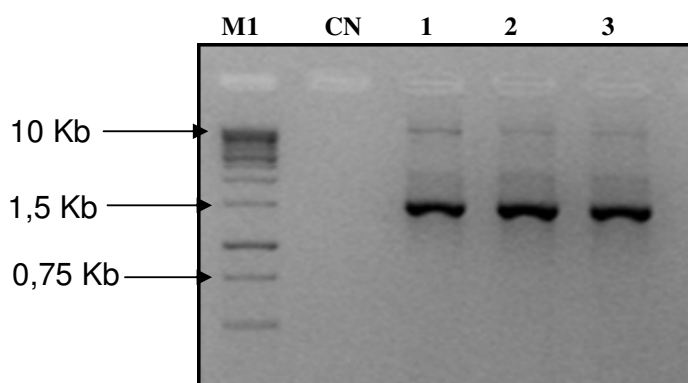


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação do gene 16S rRNA. (CN) Controle negativo; (1, 2 e 3) repetições do produto de PCR do 16S rDNA; (M1) 1 Kb DNA ladders (fermentas).

A digestão do DNA plasmidial com a enzima *EcoRI* de 12 clones escolhidos aleatoriamente confirmaram a presença do fragmento de DNA 16S rDNA na maioria deles. Dos clones testados, 10 tiveram o fragmento de 1,5 Kb liberado, ou seja, 83% continham o inserto de DNA indicando assim que a clonagem foi bem sucedida (figura 7). Apenas os clones 9 e 11 não apresentaram o fragmento.

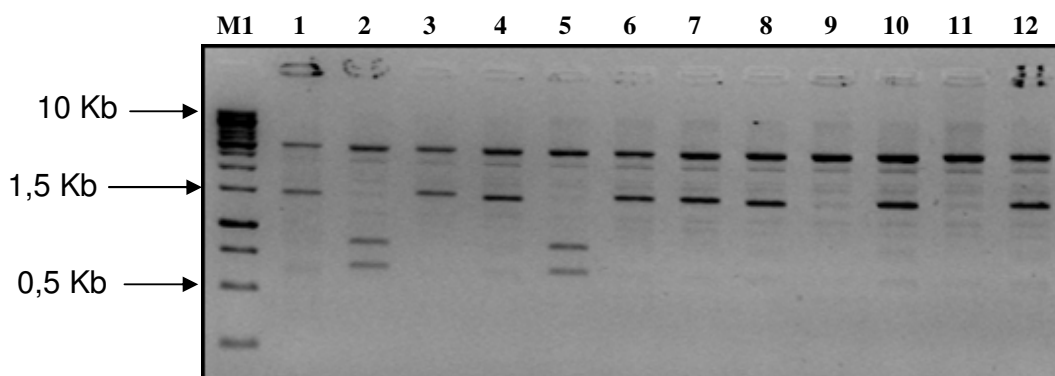


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 1% da restrição dos clones da biblioteca de 16S rDNA com a enzima *EcoRI*. (1 a 12) clones digeridos; (M1) 1 Kb DNA Ladder (Fermentas).

O número total de clones obtidos na biblioteca foi de 480, dos quais para este estudo, 431 sequências apresentaram qualidade para análise e identificação dos grupos filogenéticos. Seguindo a proposta do Manual *Bergey's Trust* que classifica os níveis taxonômicos em Domínio, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie, a classificação empregada pelo programa *Classifier* agrupou as sequências da biblioteca da seguinte maneira: 1 filo, 3 classes, 5 ordens, 8 famílias e 11 gêneros. Todas as sequências pertencem ao filo Proteobacteria, onde 419 (97,2%) estão distribuídas entre três diferentes classes Alpha, Beta e Gammaproteobacteria e o restante com 12 sequências (2,8%) não houve classificação em nível de classe.

Dentre as três classes identificadas, as Gammaproteobacteria compreenderam o grupo de maior representatividade, com 49,8% dos clones, seguida das Alphaproteobacteria com 44,8% e as Betaproteobacteria com 5,4% (Figura 8 e 9). Em trabalho semelhante, LAFORTUNE et al. (2009) caracterizou a diversidade bacteriana através de métodos dependentes e independentes de cultivo de um consórcio com potencial em degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e observou que 85% dos microrganismos apresentaram similaridade com Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria, com maior diversidade para o primeiro grupo. STACH et al. (2002) que avaliaram a diversidade microbiana de uma cultura enriquecida de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos encontrou um padrão próximo aos encontrados neste estudo. O táxon Proteobacteria é considerado como um dos maiores e mais diversos filo do domínio bactéria, ocorrendo nos mais diversos ambientes, contando com aproximadamente 528 gêneros descritos (GARRITY, et al. 2004). Além disso, os integrantes deste filo são considerados como microrganismos eficientes na degradação de hidrocarbonetos, incluindo componentes aromáticos, alifáticos e outros (ATLAS, 2005).

A comparação das 431 sequências de 16S rDNA da biblioteca do consórcio com as cadastradas no banco internacional de genes (NCBI), mostrou que 55 sequências são distintas, representando 12% do montante de clones sequenciados. Essa distinção foi baseada pela comparação com os códigos das sequências cadastradas no banco conhecidos como "Gene IDs". Cada sequência distinta foi definida como uma unidade

taxonômica operacional (OTU) (figura 8 e 9).

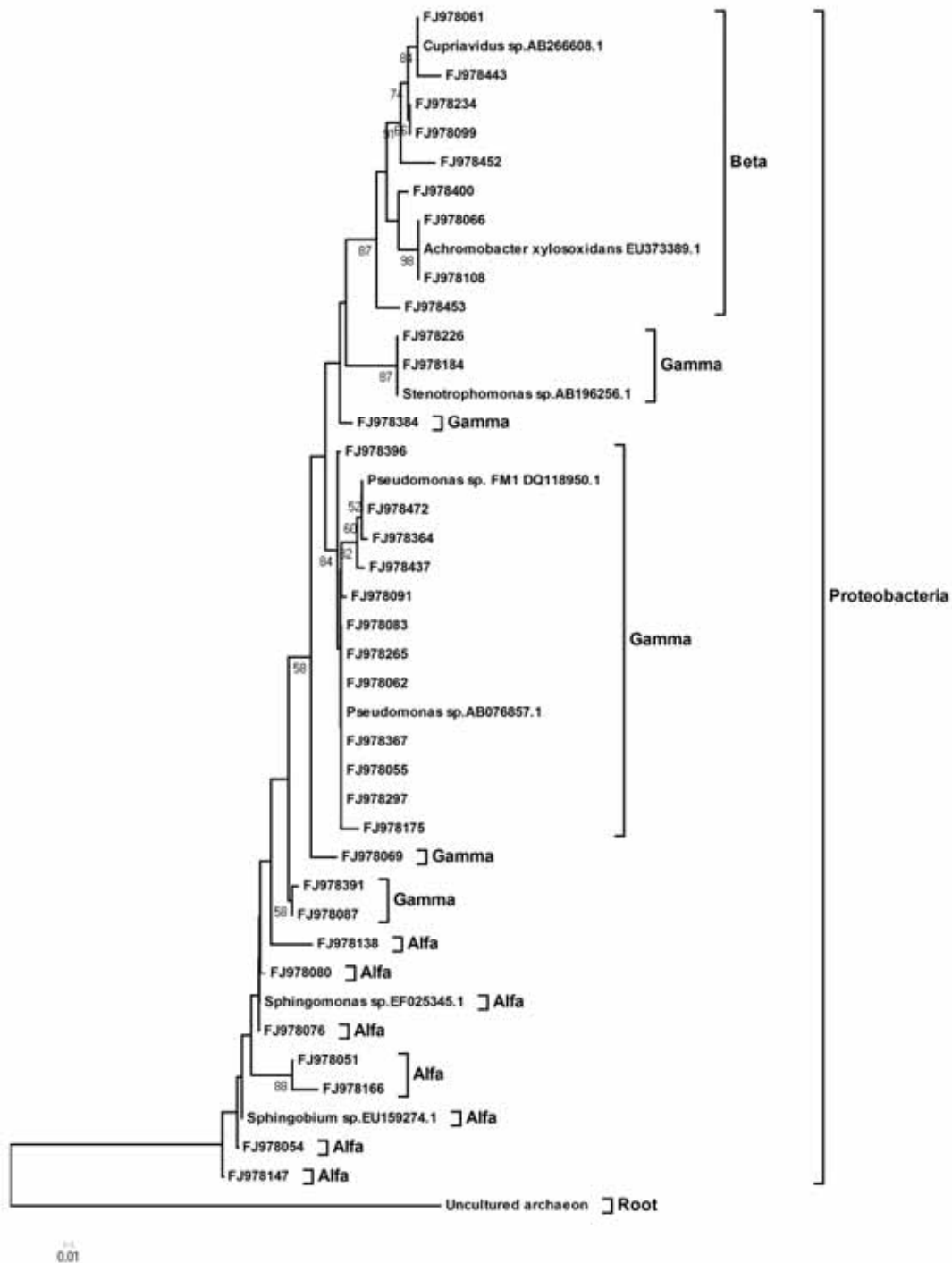


Figura 8: Dendrograma do agrupamento hierárquico baseada na sequência do gene *16S rRNA*, mostrando as posições filogenéticas dos clones em relação as sequências já depositadas no banco de dados.

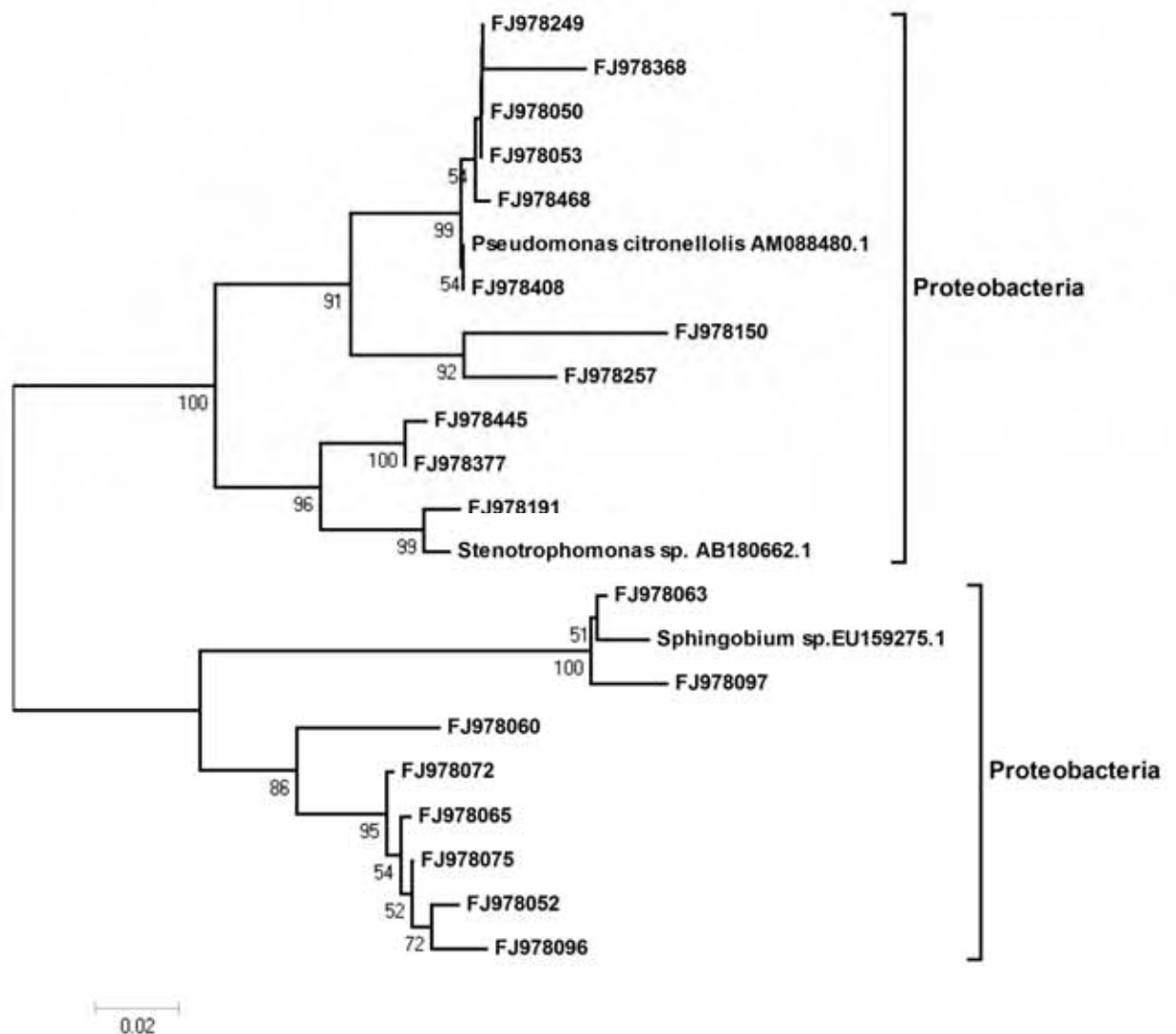


Figura 9: Dendrograma do agrupamento hierárquico baseada na sequência do gene *16S rRNA*, mostrando as posições filogenéticas dos clones em relação as sequências já depositadas no banco de dados.

As cinquenta e cinco sequências distintas identificadas foram então comparadas com o banco de dados de sequências de 16S rDNA RDP II (Ribossomal Database Project) com um índice de confiabilidade de 95% e tiveram similaridade com os respectivos gêneros: *Variovax*, *Flavimonas*, *Stenotrophomonas*, *Cupriavidus*, *Sphingomonas*, *Bosea*, *Bordetella*, *Thermomonas*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*,

Parvibaculum, e *Sphingobium*. Os últimos três gêneros se apresentaram, respectivamente, como os táxons com maiores frequências quanto ao número de clones da biblioteca (figura 10).

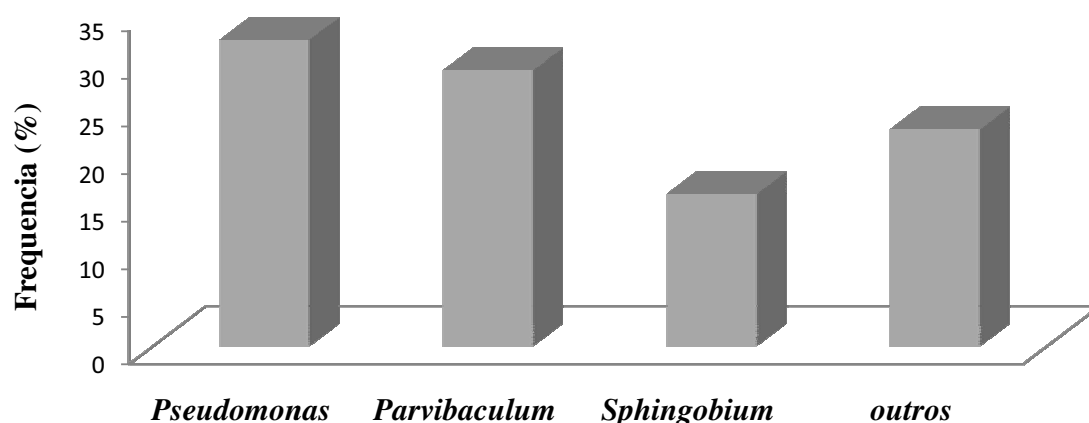


Figura 10: Frequência dos gêneros presentes na biblioteca metagenômica do consórcio.

Todos os gêneros identificados neste trabalho já foram relatados na literatura como microrganismos envolvidos em processos de degradação de hidrocarbonetos.

O grupo *Pseudomonas* foi o gênero com maior frequência na biblioteca com 32,2% de clones totais. Este resultado corrobora, com os inúmeros trabalhos que descrevem a frequência deste gênero em solos contaminados (HIGASHIOKA, et al. 2009; PIRÔLLO, 2008), assim como a sua eficiente capacidade na degradação de hidrocarbonetos (WHYTE et al. 1997, OBUEKWE, et al. 2008, BISHNOI, et al. 2009). Além disso, um grande número espécies de *Pseudomonas* são capazes de utilizar hidrocarbonetos do petróleo como fonte de carbono, tendo em vista estudos que reportaram este potencial (WHYTE et al. 1997; YUSTE et al. 2000; DINKLA et al. 2001). WUNSCHÉ et al. (1995), em um estudo realizado com solo exposto durante anos a contaminação de hidrocarbonetos, observaram a dominância do gênero *Pseudomonas* entre os microrganismos presente naquele ambiente, mais especificamente, a espécie *P. boxihidrogena*.

O segundo grupo que apresentou elevada frequência foi representada pelo gênero *Parvibaculum* com frequência de 29%. Este percentual é justificável, levando em consideração que este grupo de microrganismos possa ter sido beneficiado pela presença de biosurfactantes produzidos pelos membros do consórcio. BENTO et al. (2004), mostrou que isolados obtidos a partir de solos contaminados por óleo diesel são grandes produtores de biosurfactantes e observou que a produção se torna mais eficiente quando os microrganismos desenvolvem-se juntos na forma de consórcio. O diesel e o óleo cru são considerados excelentes fontes de carbono para a produção de biosurfactantes por microrganismos (ILORI et al. 2005), sendo as *Pseudomonas* grandes produtoras de biosurfactantes (RAHMAN & GAKPE, 2008). Em contrapartida, os membros do gênero *Parvibaculum* são conhecidos por utilizarem este tipo de composto como fontes de carbono e energia (SCHLEHECK et al. 2003). Segundo SCHLEHECK et al. (2000) o surfactante LAS (Alquilbenzeno linear sulfonado) disponibilizado como única fonte de carbono e energia foi facilmente degradado e assimilado pelo isolado *Parvibaculum lavamentivorans* DS-1.

O software DOTUR permitiu determinar o número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs). O resultado também foi usado para a construção da curva de rarefação. O desenho de curvas de rarefação é uma forma de saber se a amostragem foi suficiente para revelar a diversidade total de uma comunidade (ROESCH, et al. 2007). Neste trabalho foram testadas duas curvas de rarefação representadas por 97% e 90% de similaridade como critério de agrupamento (figura 11). A análise do gráfico mostra uma ascendência inicial das duas curvas tendendo ao platô próximo das 60 unidades taxonômicas observadas para a curva representando 97% de similaridade. Por outro lado, a curva com critério de agrupamento com 90% de similaridade atingiu seu platô próximo das 20 unidades taxonômicas. Estes resultados revelam que o número de clones de 16S rDNA sequenciados chegou próximo do número total de indivíduos da comunidade bacteriana amostrada.

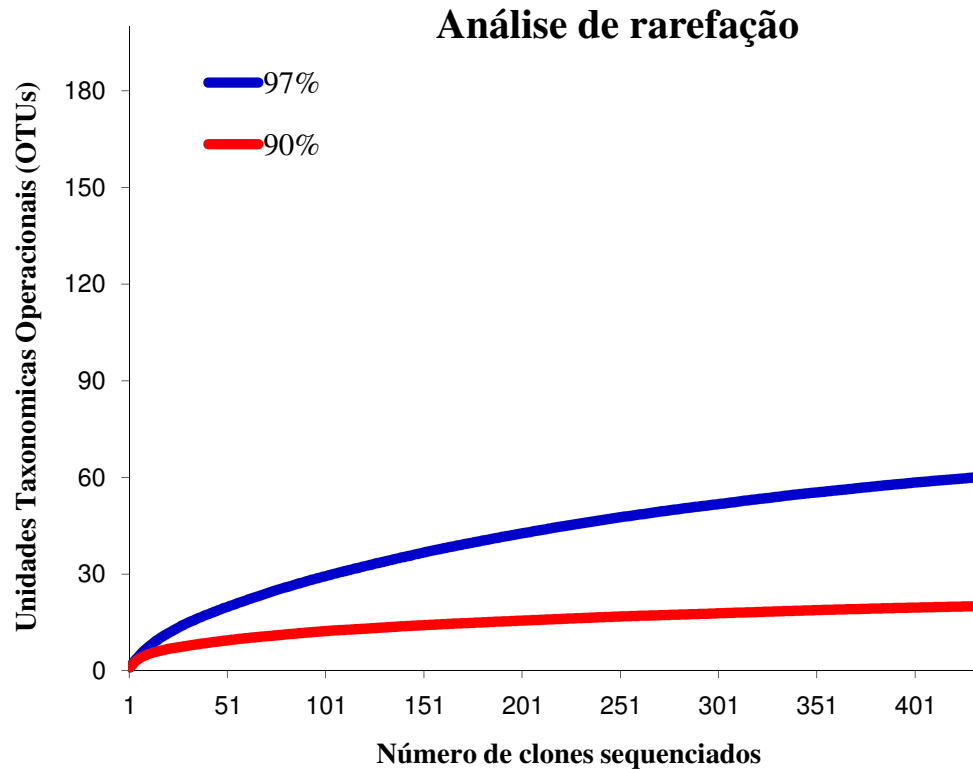


Figura 11: Curvas de rarefação calculadas pelo programa DOTUR usando 97% e 90% de similaridade para o agrupamento das sequências 16S rDNA da biblioteca de clones do consórcio

Estes resultados condizem com os resultados observados pela comparação das sequências dos clones com o banco de genes do National Center for Biotechnology Information (NCBI), onde o número de táxons distintos foi de 55. A correlação dos dados obtidos pela comparação com o banco de internacional de genes somado aos dados gerados pelo DOTUR confirma que a proximidade da estimativa da diversidade de microrganismos no consórcio foi atingida. STACH et al. (2002) comparando a diversidade microbiana em dois sistemas de culturas, concluiu que o sistema de biofilme apresentou três vezes mais diversidade de bactérias cultiváveis do que a cultura enriquecida, e atribuiu isto ao fato de que a baixa diversidade da cultura

enriquecida está relacionada a consequente dominância de um pequeno número de espécies de bactérias. Segundo DIAZ-RAVINA et al. (1996), a eliminação de espécies sensíveis a um determinado distúrbio, favorece o aumento das populações de outros microrganismos tolerantes, com maior capacidade de competição e adaptação, resultando assim em uma alteração na composição das espécies do local. Isso indica que a pressão seletiva exercida ao enriquecimento pela adição de óleo diesel pode ter sido um fator determinante na predominância e frequência de determinados táxons identificados no consórcio.

A identificação de microrganismos que utilizam hidrocarbonetos como fonte de carbono ou que apresentam tolerância aos contaminantes, tem sido relatada em locais com diferentes históricos de contaminação com hidrocarbonetos de petróleo e em diversos tipos de solos (RICHARD & VOGEL, 1999; VAN BEILEN et al. 2002; WIDADA et al. 2002). A habilidade em degradar e ou utilizar hidrocarbonetos como substratos vem sendo descrita para uma grande variedade de gêneros de bactérias. FLOODGATE (1984), listou 25 gêneros de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos isolados de ambiente marinho. O predomínio dos gêneros observados neste estudo é confirmado pelos resultados de WIDADA et al. (2001) que, caracterizando a diversidade dos solos de diferentes regiões do mundo, identificaram, através de análises de sequências do gene *16S rRNA*, uma vasta gama de gêneros de bactérias aquáticas e terrestres relacionadas a degradação de hidrocarbonetos de petróleo. RICHARD & VOGEL (1999), estudando a comunidade microbiana de um consórcio bacteriano degradador de óleo diesel no solo, identificaram dois grupos de bactérias das quais fazem parte do gênero *Pseudomonas* e *Achromobacter*.

Isto pode estar relacionado com a maior facilidade de adaptação destes microrganismos em ambiente extremos, sendo menos sensíveis aos derivados de petróleo. A tolerância e predominância destes gêneros bacterianos em ambientes contaminados com compostos de hidrocarbonetos podem estar associadas a vias metabólicas específicas que envolvem diferentes genes e enzimas as quais transformam complexas moléculas contidas no petróleo em intermediários comuns das suas rotas catabólicas. Vários são os genes envolvidos na via metabólica de

degradação dos hidrocarbonetos e entre estes muitos já foram caracterizados para um grupo extenso e diversificado de microrganismos, os quais são capazes de decompor uma imensa gama de compostos que formam o petróleo, incluindo os alcanos (SMITS et al. 2002; WHYTE et al. 2002; TAKEI et al. 2008), tolueno (PARALES et al. 2000), hidrocarbonetos poliaromáticos (WHYTE et al. 1997).

Este trabalho permitiu a identificação de representantes potencialmente exploráveis em processos biotecnológicos de biorremediação, envolvendo a degradação de hidrocarbonetos, estejam na forma de isolados ou em associações como um consórcio. Embora não tenha sido identificado nenhum novo grupo de microrganismos, em processos de decomposição de resíduos de hidrocarbonetos, foi possível quantificar em termos amostrais a representação dos táxons mais significativos encontrados.

4.3 Prospecção gênica

A biblioteca metagenômica obtida a partir destes fragmentos gerou 4224 clones, ou seja, 44 placas contendo cada uma 96 clones. Devido ao grande número de clones obtidos, foi-se necessário criar uma nomenclatura para estas placas. A biblioteca recebeu o nome CRP (consórcio Ribeirão Preto) e as placas foram numeradas de 1 a 44. Os clones estão estocados em ultrafreezer e fazem parte da coleção de bibliotecas metagenômicas do LBMP sob supervisão da Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos.

O perfil de restrição permitiu estimar e avaliar o tamanho dos fragmentos clonados (figura 12 e 13). Todos os clones apresentaram sítios de restrição para as duas enzimas testadas demonstrando perfis e tamanhos diferentes.

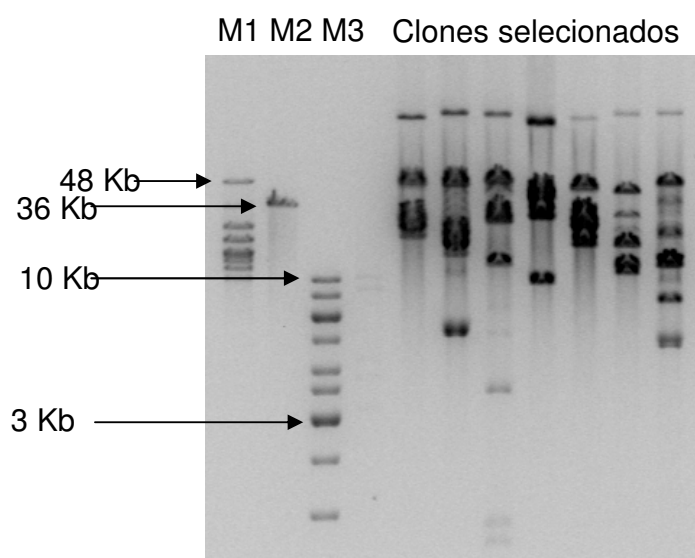


Figura 12: Eletroforese em campo pulsado em gel de agarose 1% representando o perfil de restrição da enzima *Bam*HI. (M1) GeneRuler™ DNA Ladder, High Range (fermentas); (M2) DNA 36Kb (Epicentre); (M3) 1 Kb DNA ladders (fermentas).

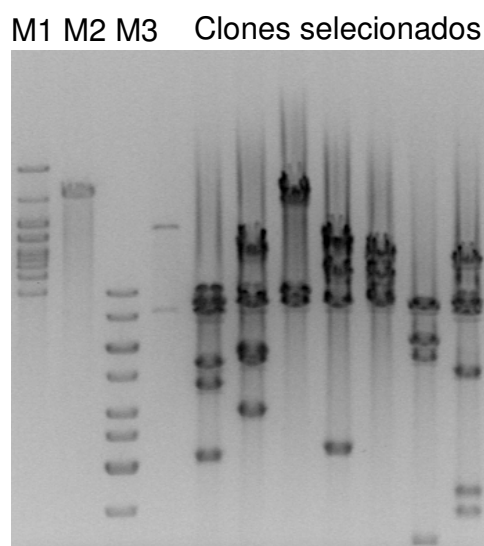


Figura 13: Eletroforese em campo pulsado em gel de agarose 1% representando o perfil de restrição da enzima *Hind*III. (M1) GeneRuler™ DNA Ladder, High Range (fermentas); (M2) DNA 36Kb (Epicentre); (M3) 1 Kb DNA ladders (fermentas).

Segundo a análise do programa DNAfrag os valores estimados dos fragmentos clonados variaram entre 30 e 38 Kb. A análise dos perfis de digestão, somada a estimativa dos tamanhos dos insertos, além de determinar a diferença entre os clones, validou a biblioteca metagenômica, mostrando que existe uma variação de tamanhos entre os fragmentos clonados.

Partindo para a prospecção gênica dentro da biblioteca, para cada reação de PCR referente aos oligonucleotídeos sugeridos, utilizou-se o DNA metagenômico do consórcio como “template”. Para os oligonucleotídeos AlkM, NDO e Todc1 não houve amplificação em nenhuma das 12 temperaturas testadas. Já nos iniciadores Alkb2, XylE, Alkb1 e Cat 2,3 as amplificações obtidas não estavam de acordo com o esperado, além disso algumas apresentaram bandas inespecíficas. O único perfil gerado compatível com o número de pares de bases esperado foi referente ao oligonucleotídeo Alkb, com uma amplificação próxima de 0,9 Kb. Dentre as temperaturas de pareamento

testadas, cinco foram bem sucedidas e são elas: 52,9°C, 53,2°C, 54°C, 55,2°C e 56,8°C. Entretanto, a que apresentou um perfil melhor de amplificação foi a temperatura de 53,2, que foi padronizada para todas as outras reações realizadas após este teste. O perfil eletroforético de cada reação pode ser observado na figura 14.

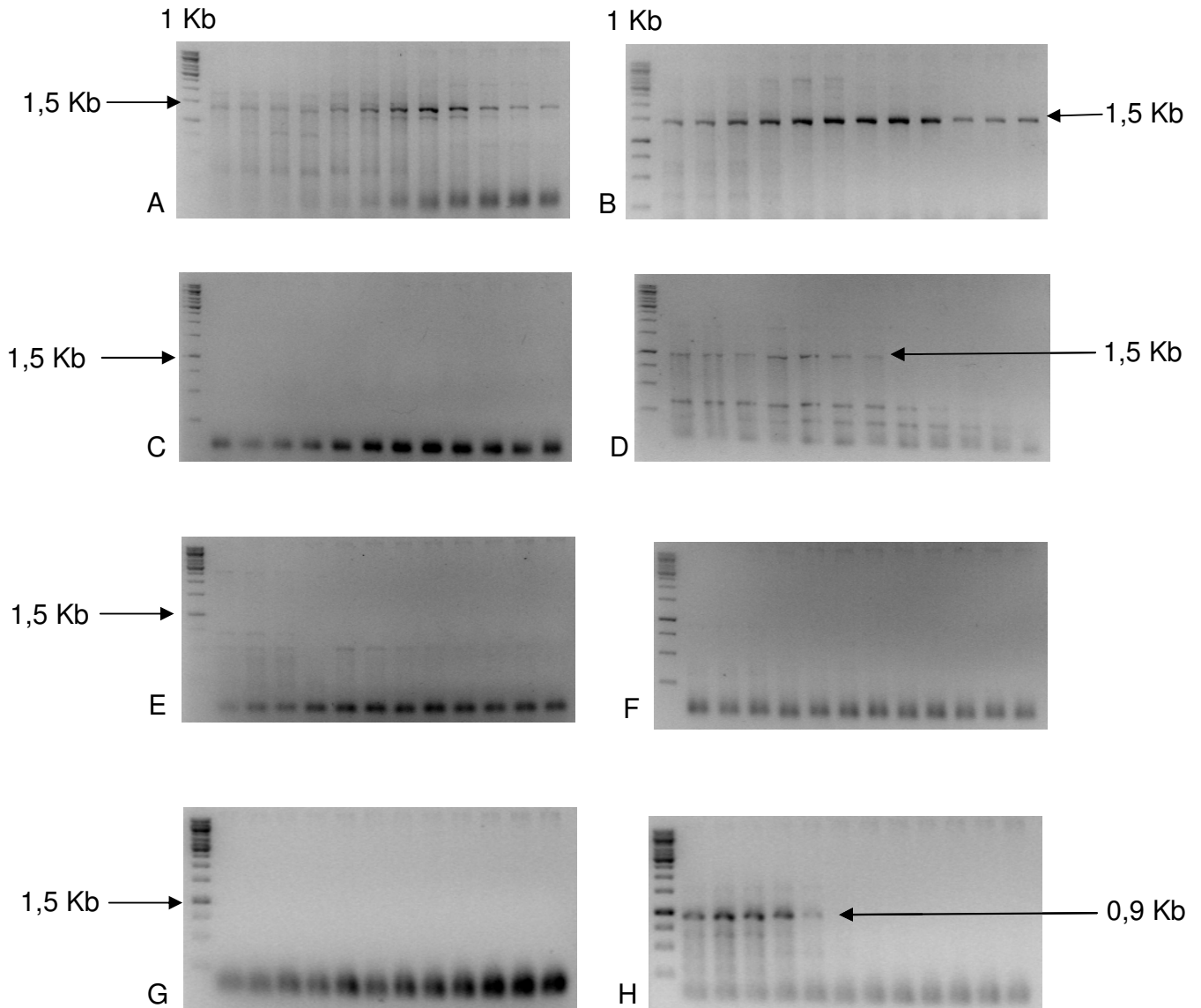


Figura 14: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% dos produtos de PCR gerados pelos seguintes oligonucleotídeos: (A) Rh *AlkB2* ; (B) *XylE*; (C) Ac *alkM*; (D) Rh *Alkb1*; (E) *cat 2,3*; (F) *ndoB*; (G) *todC1*; (H) Pp *alkB*. (1 Kb) Padrão de tamanho molecular 1 Kb DNA ladders (fermentas).

Como o objetivo deste trabalho foi testar uma nova metodologia de rastreamento em bibliotecas metagenômicas, optou-se em trabalhar apenas com o oligonucleotídeo cujo perfil eletroforético foi obtido conforme o esperado. Por isso, a sonda confeccionada e utilizada no rastreamento da biblioteca foi baseada nos produtos de PCR referentes aos iniciadores do gene *Alkb* (figura 14 H), amplificados a partir do DNA metagenômico do consórcio.

Seguindo a indicação do fabricante, foi necessário 100 ng de produto de PCR para a confecção da sonda. As membranas ficaram hibridizando a uma temperatura de 55°C em um período de 16 horas. Após as lavagens da membrana e revelação em filme foi possível identificar os “pools” de DNA das placas que apresentaram similaridade com a sonda através da sensibilização do filme (figura 15). A imagem obtida revelou sinal positivo em todos os pools plotados na membrana, inclusive no controle positivo. Entretanto, o sinal emitido entre os Pools demonstrou intensidades de fluorescência diferentes, com Pools de maior intensidade e outros de menor.

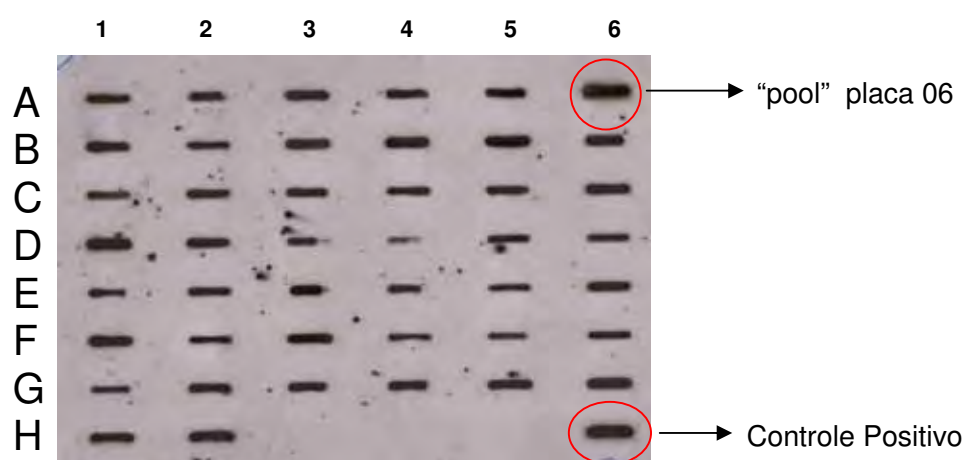


Figura 15: Hibridização dos “pools” de DNA utilizando como sonda produto de PCR do gene *Alkb*. Representação dos “pools” de todas as 44 placas da biblioteca do consórcio. (A) “pools” das placas 1 a 6; (B) de 7 a 12; (C) de 13 a 18; (D) de 19 a 24; (E) de 25 a 30; (F) de 31 a 36; (G) de 37 a 42; (H) de 43 a 44. Os espaços de H3, H4 e H5 não foram plotados nenhum material. H6 DNA metagenômico do consórcio microbiano

Devido ao aparecimento de sinal em todos os “pools” de DNA, o critério de escolha para o desmembramento e análise individual dos clones foi baseado na intensidade do sinal. Com exceção do controle positivo, o sinal com maior intensidade de fluorescência foi obtido pelo “pool” referente a placa 06. Sendo assim, esta placa foi escolhida para posterior análise individual dos clones. Os procedimentos para identificação foram os mesmos utilizados para o rastreamento entre as placas. Ao final das análises foi possível identificar seis clones positivos para a sonda sintetizada pelo conjunto de primers *Alkb* (figura 16). Dentre estes, em três clones houve sensibilização do filme com baixa intensidade e para o restante um sinal mais intenso foi obtido.

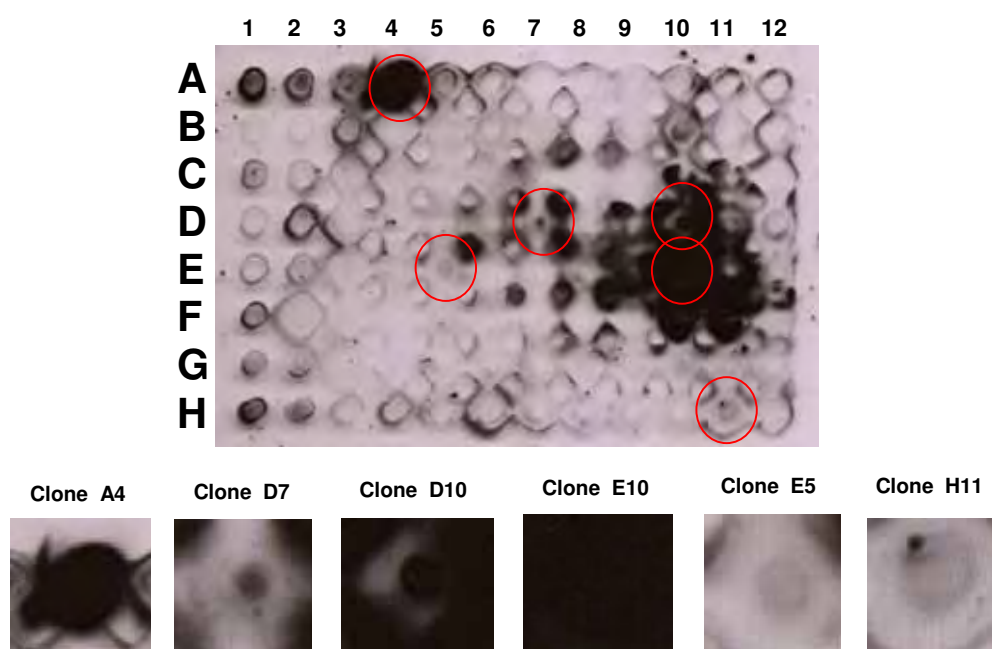


Figura 16: Membrana hibridizada contendo o material genético dos 96 clones da placa 06 do consórcio. Sonda confeccionada a partir do produto de PCR do gene *Alkb*. Abaixo as imagens ampliadas dos clones suspeitos.

Todos os clones tidos como possíveis hospedeiros do gene *Alkb* foram selecionados e submetidos a uma reação de PCR. Dos seis clones suspeitos apenas dois apresentaram amplificação positiva, sendo eles os clones A4 e E10. Os fragmentos gerados na reação foram próximos de 0,9 Kb, se assemelhando aos resultados obtidos pela amplificação do DNA metagenômico. As sequências do produto de amplificação

dos dois clones quando comparadas com o banco internacional de genes (NCBI) apresentaram similaridade com a enzima alceno hidrolase referente ao gene *Alkb* de *Pseudomonas aeruginosa* (AJ633607.1) (figura 17).

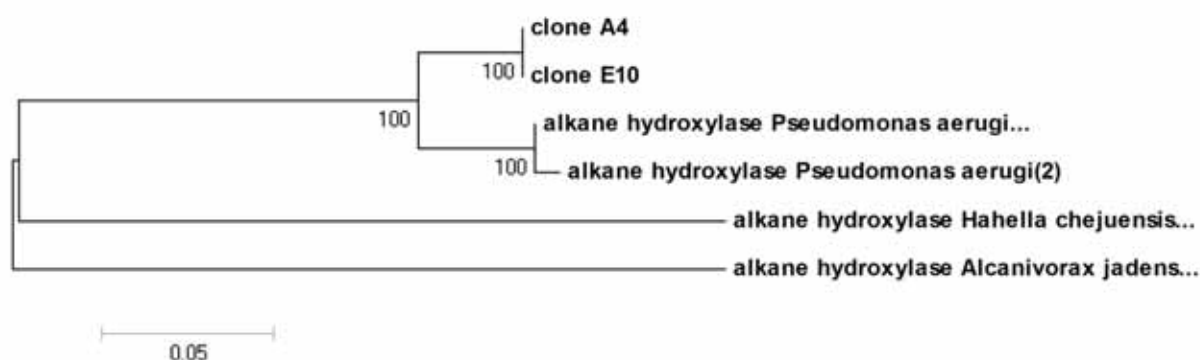


Figura 17: Dendrograma do agrupamento hierárquico baseada na sequência do *gene AlkB*, mostrando as posições filogenéticas dos clones positivos para alceno hidrolase em relação as sequências já depositadas no banco de dados.

Entretanto, o alinhamento entre as sequências dos clones A4 e E10 resultou em uma similaridade de 100%, sugerindo que os genes são iguais para ambos os clones rastreados. Provavelmente os fragmentos clonados provem do mesmo organismo. De acordo com o agrupamento representado pela árvore filogenética, a enzima hidrolase alceno identificada na biblioteca demonstrou ser relativamente diferente das outras enzimas conhecidas.

Estes resultados confirmam a presença do gene codificador para a enzima hidrolase alceno em ambos os clones. Embora não tenha sido possível determinar, pelo sequenciamento parcial do gene, de que os clones guardam um novo gene referente a esta classe de enzima, a técnica foi apropriada para a seleção de genes em bibliotecas metagenômicas.

5. CONCLUSÕES

- 1 O consórcio estudado demonstrou predominância do filo Proteobacteria, destacando as classes Alpha, Beta e Gamma.
- 2 Os clones com maior predominância da biblioteca tiveram similaridade com os gêneros *Pseudomonas*, *Parvibaculum* e *Sphingobium* respectivamente.
- 3 O sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* junto as análises do software DOTUR foi capaz de estimar a diversidade das comunidades bacterianas do consórcio.
- 4 A nova técnica testada foi apropriada para o rastreamento de genes em bibliotecas metagenômicas.
- 5 Através desta nova metodologia foi possível identificar dois clones contendo o gene *Alkb* na placa 06 da biblioteca metagenômica do consórcio.

6. LITERATURA CITADA

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. Disponível em: http://www.anp.gov.br/petro/desenvolvimento_dados.asp. Acesso em 05 de fev. 2009.

ASTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997.

ATLAS, M. R. Microbiol degradation of petroleum hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Hooken, 80:723-736, 2005.

BAMFORTH, S.M & SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80:723–736, 2005.

BISHNOI. K.; SAIN, U.; KUMAR, R.; SINGH, R.; BISHNOI, NR. Distribution and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated sites of Hisar (India). *Indian J. Exp. Biol.*; 3:210-217, 2009.

BEARE, M. H. et al. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. *Plant Soil.* 170:5-22, 1995.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER JR, W. T. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiological Research* 160:249-255, 2005.

BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour. technol.*, 96:1049-1055, 2005.

BUSHNELL, L. D., & HAAS, H. F. Utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *J. Bacteriol.*, 41:653-673, 1941.

CANTÃO, M. E., FERREIRA, J. E., LEMOS, E. G. M. Optimal clone identifier for genomic shotgun libraries: OC Identifier tool. *Genetics and Molecular Research*. 6:743-755, 2007.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Disponível em:

http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov_07.pdf.

Acesso em 05 de Fev. 2009.

COLE, J. R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A. S.; MCGARRELL, D. M.; MARSH, T.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucl. Acids Res.* 37:141-145, 2009.

COLWELL, R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18:302-307, 1997.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. *Nature*. 3:470-478, 2005.

DIAZ-RAVINA, MONTSERRAT & BAATH, ERLAND. Development of Metal Tolerance in Soil Bacterial Communities Exposed to Experimentally Increased Metal Levels. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2970-2977, 1996.

DINKLA, I.J.T., GABOR, E.M., JANSSEN, D.B. Effects of iron limitation on the degradation of toluene by *Pseudomonas* strains carrying the TOL (pWWO) plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3406–3412, 2001.

EWING, B. & GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities, *Genome Res.* 8:186–194. 1998a.

EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M.C., GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment, *Genome Res.* 8:175–185, 1998b.

FALSENSTEN, J. PHYLIP-Phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics*, 5:164-166, 1989.

FERRER, M.; ABARCA, F. M.; N, P. Golyshin3Mining genomes and ‘metagenomes’ for novel catalysts *Current Opinion in Biotechnology*, 16:588–593, 2005.

FLOODGATE, G. The fate of petroleum in marine ecosystems. In: Atlas, R.M. *Petroleum microbiology*. New York: Macmillan, p. 355-398, 1984.

GALLEGO, J.R., LOREDO, J., LLAMAS, J.F., VAZQUEZ, F., SANCHEZ, J., Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation*. 12:325–335, 2001.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. Taxonomic outline of the Prokaryotes. *Bergey’s manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Release 5.0 New York: Springer, 2004. <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline>.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580. 1983.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 5:245-249, 1998.

HIGASHIOKA, Y.; KOJIMA, H.; SATO, S.; FUKUI, M. Microbial community analysis at crude oil-contaminated soils targeting the 16S ribosomal RNA, *xylM*, *C23O*, and *bcr* genes. *J. Appl. Microbiol.* 105:1364-5072, 2009.

HUGENHOLTZ, P.; PACE, N. R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends Biotechnol.* 14:190-197, 1996.

HURST, C.J.; CRAWFORD, R.L.; KNUDSEN, G.R.; MCINERNEY, M.J.; STETZENBACH, L.D.; *Manual of Environmental Microbiology*. 2nd ed. Washington, DC, ASM Press, 2002. 1138.

HUNTER-CEVERA. The value of microbial diversity. *Curr Opin Microbiol.* 1:278-285, 1998.

ILORI, M. O.; AMOBI, C. J.; ODOCHA, A. C. Factors affecting the production of oil degrading *Aeromonas* sp. Isolated from a typical environment. *Chemosphere*, 7:985-992, 2005.

ISRAEL, D. I. A PCR-based method for high stringency screening of DNA libraries. *Nucleic Acids Research*. 21:2627-2631, 1993.

JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; ANTONIOLLI, Z.I.; CAMARGO, F.A.O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Cienc. rural*. 37:1192-1201, 2007.

KELLENBERGER, E. Exploring the unknown: the silent revolution of microbiology. EMBO Rep, 2:5-7, 2001.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16:111-120, 1980.

KOWALCHUK, G. A.; DE BRUIJN, F. J.; HEAD, I.M.; AKKERMANS, A. D.; VAN ELSAS, J. D. (Eds.) (2004). Molecular microbial ecology manual (2nd ed., vols. 1 and 2). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

KURKELA, S.; LEHVASAIHO, H.; PALVA, E.T.; TEERI, T.H. Cloning, nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain NCIB9816. Gene, 73:355–362, 1988.

KUSKE, C.R.; BARNS, S.M.; BUSCH, J.D. Diverse Uncultivated Bacterial Groups from Soils of the Arid Southwestern United States That Are Present in Many Geographic Regions. Appl. Environ. Microbiol. 63:3614-3621, 1997.

LAFORTUNE, ISABELLE.; JUTEAU, PIERRE.; DÉZIEL, ERIC.; LÉPINE, FRANÇOIS.; BEAUDET, RÉJEAN.; VILLEMUR, RICHARD. Bacterial Diversity of a Consortium Degrading High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in a Two-Liquid Phase Biosystem. Microb. Ecol. 57:455-468, 2009.

LANGER, M.; GABOR, E.M.; LIEBETON, K.; MEURER, G.; NIEHAUS, F.; SCHULZE, R.; ECK J.; LORENZ, P. Metagenomics: An inexhaustible access to nature's diversity. Biotechnol. J. 1:815–821, 2006.

LARAMÉE, L.; LAWRENCE, J.R.; GREER, C.W. Molecular analysis and development of 16S rRNA oligonucleotide probes to characterize a diclofop-methyl-degrading biofilm consortium. Can. J. Microbiol. 46:133–142, 2000.

LUDWIG, W & SCHLEIFER, K. H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. FEMS Microbiol. Rev. 15:155-173, 1994.

LUZ, A.P.; PELLIZARI, V.H.; WHYTE, L.G.; GREER, C.W. A survey of indigenous microbial hydrocarbon degradation genes in soils from Antarctica and Brazil. Can. J. Microbiol. 50: 323–333, 2004.

MARTINEZ, A. Genetically modified bacterial strains and novel bacterial artificial chromosome shuttle vectors for constructing environmental libraries and detecting heterologous natural products in multiple expression hosts. Appl Environ Microbiol. 70:2452–2463, 2004.

MYERS, N. Environmental services of biodiversity. Proc. Natl. Acad. Sci.. 93:2764-2769, 1996.

MUNROE, D. J; LOEBBERT, R; BRIC, E. Systematic screening of an arrayed cDNA library by PCR. Proceedings of the National Academy of Sciences. 92:2209 – 2213, 1995.

NAKAI, C.; KAGAMIYAMA, H.; NAZAKI, M.; NAKAZAWA, T.; INOUE, S.; EBINA, Y.; NAKAZAWA, A. Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene. J. Biol. Chem. 258:2923–2928, 1983.

OBUEKWE, C.O.; AL-JADI, Z.K.; AL-SALEH, E.S. Comparative hydrocarbon utilization by hydrophobic and hydrophilic variants of *Pseudomonas aeruginosa*. J. appl. microbiol. 105:1876–1887, 2008.

OKUTA, A.; OHNISHI, K.; HARAYAMA, S. PCR isolation of catechol 2,3-dioxygenase gene fragments from environmental samples and their assembly into functional genes *Gene*. 212:221–228, 1998.

PARK, S. J.; KANG, C. H.; CHAE, J. C.; RHEE, S. K. Metagenomemicroarray for screening of fosmid clones containing Specific genes. *FEMS Microbiol Lett*. 1–7, 2008.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*. 276:734-740, 1997.

PARALES, R.E.; DITTY, J.L.; HARWOOD, C.S. Toluene-Degrading Bacteria Are Chemotactic towards the Environmental Pollutants Benzene, Toluene, and Trichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol*. 66:4098-4104, 2000.

PEREIRA, R.M.; SILVEIRA, E.L.; SCAQUITTO, D.C.; PEDRINHO, E.A.N.; VAL-MORAES, S.P.; WICKERT, E; CARARETO-ALVES, L.M; LEMOS, E.G.M. Molecular Characterization Of Bacterial Populations Of Different Soils. *Braz. j. microbiol.*. 37:439-447, 2006.

PIRÔLLO, P.S.; MARIANO, A.P.; LOVAGLIO, R.B.; COSTA, S.G.V.A.O.; WALTER, V.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J. Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site M. *Journal of Applied Microbiology*. 105:1484–1490, 2008.

RAHMAN, P. K. S. M.; GAKPE, E. Production, characterization and applications of biosurfactantes- Review. *Biotechnology*. 2:360-370, 2008.

RANJARD, L.; RICHAUME, A. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Res Microbiol*, 152:707-716, 2001.

RATAJCZAK, A.; GEIBDÖRFER, W.; HILLEN, W. Alkane hydroxylase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 is encoded by *alkM* and belongs to a new family of bacterial integral-membrane hydrocarbon hydroxylases. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1175–1179, 1998.

RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *International Biodeterioration & Biodegradation*, London. 44:93-100, 1999.

RICHMOND, C.S.; GLASNER, J. D.; MAU, R.; JIN, H.; BLATTNER, F. R. Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* 27:3821–3835, 1999.

ROESCH, L.F.W., PASSAGLIA, L.M.P.; BENTO, F.M.; TRIPLETT, E.W.; CAMARGO, F.A.O.; Diversidade De Bactérias Diazotróficas Endofíticas Associadas A Plantas De Milho.. *R. Bras. Ci. Solo*, 31:1367-1380, 2007

SAITOU, N & NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. *Mol. biol. evol.*, 4:406-425, 1987.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHIMMEL. Ecosystem consequences of microbial diversity and community structure. *Ecol. Stud.* 113:239-254, 1995.

SCHLEHECK D.; DONG, W.; DINGER, K.; HEINZLE, E.; COOK, A. M. An α -Proteobacterium Converts Linear Alkylbenzenesulfonate Surfactants into Sulfophenylcarboxylates and Linear Alkyldiphenyletherdisulfonate Surfactants into Sulfodiphenylethercarboxylates. *Applied and environmental microbiology*. p. 66:1911–1916, 2000.

SCHLEHECK, D.; LECHNER, M.; SCHONENBERGER, R.; SUTER, M. J. F.; COOK, A. M. Desulfonation and Degradation of the Disulfodiphenylethercarboxylates from Linear Alkyldiphenyletherdisulfonate Surfactants. *Applied and environmental microbiology*. 69:938–944, 2003.

SCHLOSS, P.D. & HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:1501-1506, 2005.

SCHMEISSER, C.; STEELE, H.; STREIT, W. R. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:955–962, 2007.

SEBAT, J. L.; COLWELL, F. S.; CRAWFORD, R. L. Metagenomic profiling: microarray analysis of an environmental genomic library. *Appl Environ Microbiol* 69:4927–4934, 2003.

SILVEIRA, E.L.; PEREIRA, R.M.; SCAQUITTO, D.C.; PEDRINHO, E.A.N.; VAL-MORAES, S.P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L.M.; LEMOS, E.G.M. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. *Pesq. Agropec. Bras.* 41:1507-1516, 2006.

SMITS, T.H.M.; BALADA, S.B.; WITHOLT, B.; VAN BEILEN, J.B. Functional Analysis of Alkane Hydroxylases from Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *J. bacteriol.* 184:1733-1742, 2002.

STACH, J.E.M.; BURNS, R. G. Enrichment versus biofilm culture: a functional and phylogenetic comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial communities. *Environ. Microbiol.* 4:169–182, 2002.

STALEY, J. *Microbial Diversity and the Biosphere.*, 1998.

TAKEI, DAISUKE.; WASHIO, KENJI.; MORIKAWA, MASAOKI. Identification of alkane hydroxylase genes in *Rhodococcus* sp. strain TMP2 that degrades a branched alkane. *Biotechnol Lett.* 30:1447-1452, 2008.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. & KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molec. Biol. Evol.*, 24:1596-1599, 2007.

TERAMOTO, M.; FUTAMATA, H.; HARAYAMA, S.; WATANABE, K. Characterization of a high-affinity phenol hydrolase from *Comamonas testosteroni* R5 gene cloning, and expression in *Pseudomonas aeruginosa* PA01c. *Mol. Gen. Genet.* 262:552-558, 1999.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876- 4882, 1997.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:782-787, 1990.

TORSVIK, V.; DAAE, F. L.; SANDAA, R. A.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:240–245 2002.

TRINGE, S. G., RUBIN, E. M. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. *Nature Reviews Genetics*, 6:805–814. 2005.

VAL-MORAES, S. P.; GHINI, R.; VALARINI, M.J.; LEMOS, E. G. M; CARARETO-ALVES, L. M. Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. *Revista Ciência Agronômica.* 40:7-16, 2009.

VAN BEILEN, J.B., PANKE, S., LUCCHINI, S., FRANCHINI, A.G., RÖTHLISBERGER, M., AND WITHOLT, B. Analysis of *Pseudomonas putida* alkane degradation gene

clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the *alk*-genes. Microbiology-UK, 147:1621–1630, 2001.

VAN BEILEN, J.B.; SMITS, T.H.M.; WHYTE, L.G.; SCHORCHT, S.; RÖTHLISBERGER, M.; PLAGGEMEIER, T.; ENGESSER, K.H., WITHOLT, BERNARD. Alkane hydroxylase homologues in Gram positive strains. Environ. Microbiol. 11:676-682, 2002.

WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M.; COLE, J. R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Appl. Environ. Microbiol. 73:5261–5267, 2007.

WEISBURG, W.G., BARNS, S.M., PELLETIER, D.A., LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173:697–703, 1991.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95, 6578–6583, 1998.

WHYTE, L.G.,; BOURBONNIERE, L.; GREER, C.W.; Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Psychrotrophic *Pseudomonas* Strains Possessing Both Alkane (*alk*) and Naphthalene (*nah*) Catabolic Pathways. Appl. Environ. Microbiol. 63:3719-3723, 1997.

WHYTE, L. G.; SMITS, T. H. M.; LABBE, D.; WITHOLT, B.; GREER, C. W.; VAN BEILEN, J. B. Gene Cloning and Characterization of Multiple Alkane Hydroxylase Systems in *Rhodococcus* Strains Q15 and NRRL B-16531. Appl. Environ. Microbiol. 68:5933-5942, 2002.

WIDADA, J.; NOJIRI, H.; KASUGA, K.; YOSHIDA, T.; HABE, H.; OMORI, T.,. Molecular detection and diversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from geographically diverse sites. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58:202-209, 2002.

WOESE, C. R.; Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51:221-271, 1987.

WUNSCH, L.; BRÜGGEMANN, L.; BABEL, W. Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: An approach to assess population changes after hydrocarbon pollution. FEMS Microbiol. Ecol. 17:295-305, 1995.

YUSTE, L.; CORBELLA, M.E.; TURIGANO, M.J.; KARLSON, U.; PUYET, A.; ROJOA, F. Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. FEMS Microbiol. Ecol. 32:69-75, 2000.

ZYLSTRA, G.J.; GIBSON, D.T. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. J. Biol. Chem. 264:14 940 – 14 946, 1989.