

PAULA BRANDÃO MIQUELETTO

Caracterização de comunidades microbianas relacionadas ao metabolismo de hidrocarbonetos leves presentes em amostras de solo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Valéria Maia de Oliveira

São Paulo
2010

RESUMO

MIQUELETTO, P. B. **Caracterização de comunidades microbianas relacionadas ao metabolismo de hidrocarbonetos leves presentes em solos de bacia sedimentar.** 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Solos ou sedimentos superficiais apresentam hidrocarbonetos gasosos em quantidades altamente variáveis e que nem sempre são facilmente entendidos quanto à sua origem, evolução e ocorrência na crosta terrestre. Acredita-se que as formações superiores de um reservatório de óleo podem ser detectáveis indiretamente utilizando-se bactérias no solo capazes de degradá-los. O presente estudo teve como objetivo caracterizar comunidades microbianas envolvidas com o metabolismo de hidrocarbonetos leves em duas amostras de solo fornecidas pela Petrobrás, uma de área não petrolífera (Solo Np) e outra de área petrolífera (Solo P), através da construção de bibliotecas de fragmentos do gene RNAr 16S de bactérias e arqueias e de genes catabólicos que codificam a subunidade alfa de enzimas monooxigenases solúveis (SDIMO). A comunidade microbiana do Solo Np apresentou elevada ocorrência dos grupos bacterianos Firmicutes e Alphaproteobacteria e da ordem de arqueias Methanosarcinales. No Solo P foi observada grande abundância de representantes do filo bacteriano Actinobacteria e do grupo Crenarchaeota I.1b do domínio Archaea. A análise de diversidade dos genes catabólicos indicou a formação de duas OPF's (Família Protéica Operacional) no solo Np e cinco na amostra de solo P, sendo que sequências relacionadas à enzima Eteno Monooxigenase foram detectadas apenas nesta última. A maior parte dos clones se mostrou filogeneticamente mais próxima de sequências de enzimas de bactérias não cultivadas provenientes de amostras ambientais. Análises de cromatografia gasosa dos hidrocarbonetos de cadeia curta realizadas logo após a coleta detectaram maiores níveis de metano no solo P e maiores níveis de etano e propano no solo Np. A técnica de PCR quantitativo (*Real Time PCR*) empregada para a quantificação das populações bacterianas foi bem sucedida em quantificar o número de cópias do gene rRNA 16S das comunidades, mas não foi eficiente em quantificar os genes degradadores de gases leves presentes no solo, demonstrando uma baixa abundância destes genes nas amostras de solo analisadas.

Palavras-chave: Gases leves. Solo. Enzimas Monooxigenases Solúveis. Comunidades Microbianas. Bibliotecas gênicas.

ABSTRACT

MIQUELETTO, P. B. **Characterization of microbial communities involved in short-chain alkane metabolism in soil samples.** 2010. 86 p. Master Thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The contents of gaseous hydrocarbons in sub-surface soil and sediment occur in highly variable amounts and, in spite of their simple chemical composition, the origin and occurrence of such compounds on the surface of the Earth are not entirely understood. The upper formations of oil reservoirs may produce gas leaking which is supposed to be indirectly detectable through soil bacteria populations capable of consuming it. The goal of the present work was to characterize microbial communities involved in short-chain alkane metabolism in two soil samples received from Petrobras. Sedimentary basin soil sample was named as “P soil” and the other one as “Np soil”. Three clone libraries were constructed for each sample, one 16S rRNA gene library for each of the Domains Bacteria and Archaea, and one for the catabolic gene coding for the soluble di-iron monooxygenase (SDIMO) enzyme alpha subunit. Microbial community of Np soil presented high occurrence of Firmicutes and Alphaproteobacteria groups and the Methanosarcinales archaeal order. In P soil high abundance of the bacterial phylum Actinobacteria and Crenarchaeota group I.1b from Archaea Domain were observed. The analysis of the catabolic genes revealed the occurrence of two Operational Protein Families (OPF) in Np soil and five in P soil. Clones related to the Ethene monooxygenase group (EtnC) were detected only in the latter, which also presented higher values of richness and diversity. The sequences from soil samples were more closely related to each other than to reference sequences. Short-chain hydrocarbon measures performed just after samples were collected showed higher levels of methane and lower levels of ethane and propane in the P soil sample in comparison to the Np soil sample. A real-time PCR method was applied in order to quantify bacterial populations in soil samples. The Np soil sample presented higher numbers of rRNA 16S gene copies. The technique was not successful in yielding the catabolic gene quantification, suggesting that such genes occur in very low abundance in the soil samples under study.

Keywords: Light Hydrocarbons. Soil. Soluble Monooxygenase Enzymes. Microbial Communities. Gene Libraries.

INTRODUÇÃO

Reconhecidos como substrato que sustenta o crescimento microbiano, os hidrocarbonetos atuam tanto como alvo como produto do metabolismo (VAN HAMME et al., 2003). Todos os solos ou sedimentos superficiais apresentam hidrocarbonetos gasosos em quantidades altamente variáveis (SANTOS, 2004), e desde os primeiros anos do século XX sabe-se que os micro-organismos são encontrados em associação com os hidrocarbonetos no solo (SHENNAN, 2006). As bactérias degradadoras de hidrocarbonetos apresentam, portanto, uma distribuição ubíqua no ambiente (HAMAMURA et al., 1999). Dentre estas bactérias, um grande número é capaz de utilizar alcanos gasosos e líquidos como substratos para o seu crescimento (BLEVINS e PERRY, 1972). *n*-Alcanos são oxidados aos álcoois primários ou secundários correspondentes por monooxigenases através de oxidação monoterminal, oxidação biterminal ou oxidação subterminal (STEPHENS e DALTON, 1986). Devido à sua ampla especificidade de substratos, as alcano-monooxigenases são capazes de degradar co-metabolicamente vários hidrocarbonetos clorados, e, conseqüentemente, bactérias que oxidam alcanos têm sido intensivamente estudadas para uso potencial em biorremediação (WACKETT et al., 1989).

Além disto, baseado no princípio de que hidrocarbonetos leves escapam de campos de óleo e gás para a superfície da Terra, e que estas concentrações elevadas de hidrocarbonetos criam condições favoráveis para o desenvolvimento de populações altamente especializadas na degradação destes compostos (WAGNER et al., 2002), estas bactérias poderiam ser utilizadas como indicadores biológicos indiretos da presença de reservas de petróleo, oferecendo grande potencial de aplicação tecnológica na indústria de exploração.

O presente trabalho tem como objetivo investigar comunidades microbianas (bactérias e arqueias) presentes em amostras de solo envolvidas com a degradação e produção de hidrocarbonetos de cadeia curta (C1 – C4). Isso será feito relacionando os resultados das análises moleculares das comunidades microbianas com dados cromatográficos dos sedimentos de área petrolífera, assim como sedimento proveniente de área não petrolífera. Com isso pretendemos gerar uma análise mais detalhada com relação ao metabolismo dos hidrocarbonetos leves no solo.

CONCLUSÕES

O solo desempenha funções fundamentais ao ecossistema através de processos mediados por micro-organismos, incluindo a transformação de matéria orgânica e de compostos tóxicos e a ciclagem de nutrientes (DORAN e ZEISS, 2000). Como representam os maiores catalisadores dos processos no solo, tais organismos podem servir como indicadores do status e da produtividade de um ambiente (HARTMANN et al., 2009).

No presente trabalho foi visto que a amostra de solo P, proveniente de região de bacia sedimentar (área petrolífera) apresentou alta abundância do filo bacteriano Actinobacteria e do grupo de arqueias Crenarchaeota I.1b, ambos conhecidos por representarem organismos adaptados à ambientes com baixo nível de nutrientes. A análise dos genes catabólicos que codificam regiões de enzimas monooxigenases solúveis demonstrou que sequências relacionadas ao grupo de enzimas degradadoras de eteno (eteno monooxigenase) ocorrem apenas nessa amostra.

Na amostra de solo Np, proveniente de área não petrolífera foi observada a presença de comunidade microbiana com estrutura semelhante àquela encontrada em biodigestores, com elevada ocorrência do filo bacteriano Firmicutes, especialmente a ordem Clostridiales, e elevada abundância de arqueias metanogênicas. A classe Alfabroteobacteria, que possui representantes com capacidade de degradação de metano, também apresentou uma contribuição considerável entre os membros da comunidade nesta amostra. Os genes catabólicos analisados apresentaram diversidade relativamente baixa, sendo agrupados em apenas dois clados principais. A diversidade observada pode estar relacionada às condições de incubação em que foi mantida essa amostra de solo. O ambiente anaeróbico gerado no recipiente contribuiu para o aumento considerável dos níveis de metano e pode ter favorecido somente os organismos relacionados ao metabolismo desse gás, contribuindo dessa maneira para a diminuição da diversidade total.

De maneira geral, a análise dos genes funcionais revelou diversidade similar entre as duas amostras, pois a maior parte das sequências analisadas está claramente distante filogeneticamente de outras sequências de SDIMO's descritas previamente. Essa observação indica a possibilidade dessas sequências representarem novos membros dessa família de enzimas.

Com relação à análise dos solos utilizada como ferramenta para prospecção de petróleo foi concluído que a metodologia de construção e análise de bibliotecas de genes RNAr 16S é útil para gerar informações acerca dos filos, classes e ordens dominantes na comunidade dos solos, mas não é suficiente para identificar os grupos degradadores em nível de espécies. A análise de bibliotecas de genes catabólicos representa, em teoria, uma técnica mais apropriada para esse objetivo, pois é focada na amplificação de populações relacionadas ao metabolismo de hidrocarbonetos de cadeia curta, componentes do gás natural. Entretanto, o presente estudo revelou que a maioria dos genes catabólicos recuperados nas bibliotecas das amostras de solo correspondem a genes potencialmente novos, não relacionados com aqueles encontrados em espécies conhecidas de bactérias, o que dificultou a inferência do grupo microbiano que carrega o gene de degradação de alcanos de cadeia curta nas amostras. Esta é uma limitação frequentemente encontrada nos estudos de diversidade em amostras ambientais, ou seja, a grande complexidade das comunidades microbianas naturais e a falta de informações de seqüências de genes catabólicos nas bases de dados não possibilitam a identificação e quantificação precisas das populações responsáveis por funções chaves de interesse.

Os níveis dos gases presentes nas amostras detectados por cromatografia gasosa não indicaram uma anomalia geoquímica como seria esperado para uma área com presença de reserva petrolífera (Solo P), conforme relatado na literatura. Para tal finalidade seriam necessárias análises comparativas de diversos pontos da região de bacia sedimentar ou até mesmo análises de amostras provenientes de diversas bacias. Técnicas quantitativas para grupos de genes específicos, como o PCR em tempo real, podem oferecer uma ferramenta mais apropriada para detectar abundância significativa de populações microbianas degradadoras em regiões petrolíferas, no entanto o método precisa ser otimizado para se tornar viável para quantificação de grupos que ocorrem em baixa abundância no ambiente.

REFERÊNCIAS*

- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-402, 1997.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W., SCHLEIFER, K. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 143-169, 1995.
- ASHRAF, W.; MIHDIR, A.; MURRELL J. C. Bacterial oxidation of propane. **FEMS Microbiology Letters**, v. 15; n. 122, p. 1-6, 1994.
- AYTON, J. et al. *Crenarchaeota* affiliated with group 1.1b are prevalent in coastal mineral soils of the Ross Sea Region of Antarctica. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 689–703, 2010.
- BEGON, M.; HARPER, J. L.; TOWNSEND, C. R. **Ecology**: Individuals, populations, and communities. 3rd ed. Malden (Massachusetts): Blackwell Science, 1996. p. 829–830.
- BLANQUET, S. H. et al. Assessing the role of alkane hydroxylase genotypes in environmental samples by competitive PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 1392–1403, 2005.
- BLEVINS, W. T.; PERRY, J. J. Metabolism of propane, *n*-propylamine, and propionate by hydrocarbon-utilizing bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 112, p. 513–518, 1972.
- BONCH-OSMOLOVSKAYA, E. A. et al. Radioisotopic, culture-based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6143-51, 2003.
- BOURNE, D. et al. Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. **The ISME Journal**, v. 2, p. 350–363, 2008.
- BUCKLEY, D. H.; SCHMIDT, T. M. Environmental factors influencing the distribution of rRNA from Verrucomicrobia in soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, p. 105–112, 2001.
- CHEN, H. et al. Spatial variations on methane emissions from Zoige alpine wetlands of Southwest China. **Science of the total Environment**; n. 409, p. 1097-1104, 2009.
- CLEMENTINO, M. et al. Archaeal diversity in naturally occurring and impacted environments from a tropical region. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 141-151, 2006.
- COLEMAN, N. V.; BUI, N. B.; HOLMES, A. J. Soluble di-iron monooxygenase gene diversity in soils, sediments and ethane enrichments. **Environmental Microbiology**, v. 8, p. 1228-1239, 2006.
- CONRAD, R. Soil Microorganisms as Controllers of Atmospheric Trace Gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO) **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 4, p. 609–640, 1996.
- COOLEY, R. B. et al. Kinetic characterization of the soluble butane monooxygenase from *Thauera butanivorans*, formerly ‘*Pseudomonas butanovora*’. **Microbiology**, v. 155, p. 2086–2096, 2009.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DIMITRIU, P. A. et al. Microbial diversity of a meromictic soda lake in Washington, U 1 SA: spatial and temporal. **Applied and Environmental Microbiology**, 2008. doi:10.1128/AEM.00455-08.

EWING, B. et al. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p.175–185. 1998.

FERREIRA, J. C. Modelo de Circulação de Águas Meteóricas nas Bacias da Margem Continental Brasileira. **Boletim de Geociências da Petrobrás**, Rio de Janeiro, v. 7, p. 147-156, 1993.

FIERER, N. et al. Toward an Ecological Classification of Soil Bacteria **Ecology**, v. 88, n. 6, p. 1354–136, 2007.

GALVÃO, T. C.; MOHN, W. M.; LORENZO, V. Exploring the microbial biodegradation and biotransformation gene pool. **TRENDS in Biotechnology**, v. 23, n. 10, 2005.

GINKEL, C. G.; WELTEN, H. G. J; DE BONT, J. A. M. Oxidation of Gaseous and Volatile Hydrocarbons by Selected Alkene-Utilizing Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 2903-2907, 1987.

HAMAMURA, N. et al. Diversity of Butane Monooxygenases among Butane-Grown Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 4586-4593, 1999.

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemical Biology**, v. 5, p. 245-249, 1998.

HARAYAMA, S.; KASAI, Y.; HARA, A. Microbial communities in oil-contaminated seawater. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, p. 205–214, 2004.

HARTMAN, M. et al. Bacterial, archaeal and eukaryal community structures throughout soil horizons of harvested and naturally disturbed forest stands. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 3045–3062, 2009.

HATZENPICHLER, R. et al. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. **PNAS**, v. 105, n. 6, p. 2134–2139, 2007.

HENDRICKSON, E. L. et al. Functionally distinct genes regulated by hydrogen limitation and growth rate in methanogenic Archaea.. **PNAS**, v. 104, n. 21, 2007.

HINRICHS, K. U. et al. Biological formation of ethane and propane in the deep marine subsurface. **PNAS**, v. 103, p. 14684–14689, 2006.

HOLMES, A. J; COLEMAN, N. V. Evolutionary ecology and multidisciplinary approaches to prospecting for monooxygenases as biocatalysts. **Antonie van Leeuwenhoek** , v. 94, p. 75–84, 2008.

HUGENHOLTZ, P. et al. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 366-76, 1998.

INSAM, H.; WETT, B. Control of GHG emission at the microbial community level. 699–706. **Waste Management**, v. 28, p. 699–706, 2008.

- JANSSEN, P. H. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries. of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1719–1728, 2006.
- KENDALL, M. M. et al. Diversity of *Archaea* in Marine Sediments from Skan Bay, Alaska, Including Cultivated Methanogens, and Description of *Methanogenium boonei* sp. nov **Applied And Environmental Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 407–414, 2007.
- KHMELENINA, V.N.; TROTSSENKO, Y.A. Aerobic methanotrophic bacteria of cold ecosystems. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, p. 15-26, 2005.
- KLEIN, D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. **TRENDS in Molecular Medicine**, v. 8, p. 257-260, 2002.
- KNIEMEYER, O. et al. Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. **Nature**, v. 449, p. 898–901, 2007.
- KOK, M. et al. The *Pseudomonas oleovorans* alkBAC operon encodes two structurally related rubredoxins and an aldehyde dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 5442–5451, 1989.
- KOTANI, T. et al. Gene structure and regulation of alkane monooxygenases in propane-utilizing *Mycobacterium* sp. TY-6 and *Pseudonocardia* sp. TY-7. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, p. 184–192, 2006.
- KRAMER, C.; GLEIXNER, G. Soil organic matter in soil depth profiles: distinct carbon preferences of microbial groups during carbon transformation. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 425–433, 2008.
- KRAUSE, L. et al. Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas. **Journal of Biotechnology**, v. 136, p. 91-101, 2008.
- KROBER, M. et al. Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. **Journal of Biotechnology**, v. 142, p. 38–49, 2009.
- KUHN, E.; BELLICANTA, G. S.; PELLIZARI, V. H. et al. New *alk* genes detected in Antarctic marine sediments. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 669–673, 2009.
- KUMAR, S. et al. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA. **Bioinformatics**, v. 17, n. 1244-1245, 2001.
- LANE, D. et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **PNAS**, v. 82, n. 20, p.6955-9, 1985.
- LEAHY, J. G. et al. Evolution of the soluble diiron monooxygenases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 449-479, 2003.
- LEE, C. et al. Quantitative analysis of methanogenic community dynamics in three anaerobic batch digesters treating different wastewaters. **Water Research**, v. 43, p. 157 – 165, 2009.
- LEHTOVIRTA, L. E. et al. Soil pH regulates the abundance and diversity of Group1.1c Crenarchaeota. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 70, p 367–376, 2009.

- LI, H. et al. Phylogenetic Diversity of the Archaeal Community in a Continental High-Temperature, Water-Flooded Petroleum Reservoir. **Current Microbiology**, v. 55, p 382-388, 2007.
- LI, H. et al. Molecular phylogenetic diversity of the microbial community associated with a high-temperature petroleum reservoir at an offshore oilfield. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 60, p. 74-84, 2007.
- LIU, R. et al. Comparison of archaeal and bacterial community structures in heavily oil-contaminated and pristine soils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 108, n. 5, p. 400–407, 2009.
- LLOYD, K. G. et al. An Anaerobic Methane-Oxidizing Community of ANME-1b Archaea in Hypersaline Gulf of Mexico Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7218–7230, 2006.
- MAGOT, M.; OLLIVIER, B.; PATEL, B. K. C. Microbiology of petroleum reservoirs. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 77, p. 103-116, 2000.
- MARTINI, A. M. et al. Genetic and temporal relations between formation waters and biogenic methane: Upper Devonian Antrim Shale, Michigan Basin, USA. **Geochimical Cosmochimica Acta**, v. 62, n. 10, p. 1699–1720, 1998.
- MCDONALD, I. R.; KENNA, E. M; MURRELL, J. C.. Detection of Methanotrophic Bacteria in Environmental Samples with the PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 116–121, 1995.
- MCLEE, A. G.; KORMENDY, A. C.; WAYMAN, M. Isolation and characterization of n-butane-utilizing microorganisms. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 1191-5, 1972.
- MONTERO, B. et al. Evolution of microorganisms in thermophilic-dry anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3233-3243, 2008.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-50, 1987.
- MUYZER, G.; VAN DER KRAAN, G. M. Bacteria from hydrocarbon seep areas growing on short-chain alkanes. **Trends in Microbiology**, 2008. In press.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION-NCBI. Genbank [Database]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Cited from: 10 jun. 2010.
- NELSON, A. K. et al. Archaeal Diversity and the Prevalence of *Crenarchaeota* in Salt Marsh, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 4211-4215, 2009.
- NICOL, G. W. et al. Primary succession of soil Crenarchaeota across a receding glacier foreland. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 337–347, 2005.
- OCHSENREITER, T. et al. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 787–797, 2003.

ORPHAN, V. J. et al. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblage associated with high temperature petroleum reservoirs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 700-711, 2000.

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

PARKES, R. J. et al. Biogeochemistry and biodiversity of methane cycling in subsurface marine sediments (Skagerrak, Denmark). **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1146-1161, 2007.

PAUSS, A. et al. Continuous measurement of dissolved H₂ in an anaerobic reactor using a new hydrogen/air fuel cell detector. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 35, p. 492-501, 1990.

PHILLIPS, W. E.; PERRY, J. J. Metabolism of n-Butane and 2-Butanone by *Mycobacterium vaccae*. **Journal of Bacteriology**, v. 120, n. 2, p. 987-989, 1974.

POLLARD, D. J.; WOODLEY, J. M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. **Trends Biotechnology**, v. 25, p. 66-73, 2007.

POWELL, S. N. et al. Using Real-Time PCR to Assess Changes in the Hydrocarbon-Degrading Microbial Community in Antarctic Soil During Biorremediation. **Microbial Ecology**, v. 52, p. 523-532, 2006.

PUTKINEN, A. et al. Archaeal rRNA diversity and methane production in deep boreal Peat. **FEMS Microbial Ecology**, v. 70, p. 87-98, 2009.

QUIRINO, B. F. et al. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. **Microbiological Research**, v. 164, p. 59-70, 2009.

RICE, D. D. Controls, habitat, and resource potential of ancient bacterial gas. In VIALLY, R. (Ed.) **Bacterial Gas**. Paris: Editions Technip, 1992. p. 91-118.

ROJO, F. Degradation of alkanes by bacteria. **Environmental Microbiology**; v. 11, p. 2477-90, 2009.

RÖLING, W. F. M.; HEAD, I. M.; LARTER, S. R. The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 5, p. 321-328, 2003.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANDAA, R. A.; ENGER, E.; TORSVIK, V. Rapid Method For Fluorometric Quantification Of Dna In Soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 30, n. 2, p. 265-268, 1998.

SANTOS, E. V. Geoquímica de gases: uma nova tecnologia em avaliação de sistemas petrolíferos. **Boletim de Geociências da Petrobrás**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 2, p. 357-383, 2004.

SAZINSKY, M. H.; LIPPARD, S. J. Product Bound Structures of the Soluble Methane Monooxygenase Hydroxylase from *Methylococcus capsulatus* (Bath): Protein Motion in the r-Subunit. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, p. 5814-5825, 2005.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a Computer Program for Defining Operational Taxonomic Units and Estimating Species Richness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1501-1506, 2005.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. A statistical toolbox for metagenomics: assessing functional diversity in microbial communities. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 34, doi:10.1186/1471-2105-9-34, 2008.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Towards a Census of Bacteria in Soil. **PLoS Computational Biology**, v. 2, n. 92, 2006.

SCHUMACHER, D. Surface Geochemical Exploration for Petroleum. **Organic Geochemistry**, v. 23, n. 368, 1995.

SEI et al. Monitoring of alkane-degrading bacteria in a sea-water microcosm during crude oil degradation by polymerase chain reaction based on alkane-catabolic genes. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 517-522, 2003.

SHEN, F. et al. Molecular detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monooxygenase gene from *Gordonia* spp. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, p. 53-59, 2010.

SHENNAN, J. L. Utilisation of C2-C4 gaseous hydrocarbons and isoprene by microorganisms. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 237-256, 2006.

SIDDIQUE, T. et al. Biodegradation of Short-Chain *n*-Alkanes in Oil Sands Tailings under Methanogenic Conditions. **Environmental Science & Technology**, v. 40, p. 5459-5464, 2006.

SLUIS, M. K. et al. Molecular analysis of the soluble butane monooxygenase from '*Pseudomonas butanovora*'. **Microbiology**, v. 148, p. 3617-3629, 2002.

SONG, M. et al. Methanogenic population dynamics assessed by real-time quantitative PCR in sludge granule in upflow anaerobic sludge blanket treating swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 23-28, 2010.

STEINBERG, L. M.; REGAN, J. M. Phylogenetic Comparison of the Methanogenic Communities from an Acidic, Oligotrophic Fen and an Anaerobic Digester Treating Municipal Wastewater Sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6663-6671, 2008.

STEPHENS, G. M.; DALTON, H. The role of the terminal and subterminal oxidation pathways in propane metabolism by bacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 132, p. 2453-2462, 1986.

STREGER, S. et al. Degradation of Hydrohalocarbons and Brominated Compounds by Methane- and Propane-Oxidizing Bacteria. **Environmental Science & Technology**, v. 33, p. 4477-4482, 1999.

SWAVING, J.; DE BONT, J. A. M. Microbial transformation of epoxides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 19-26, 1998.

THOMPSON, J. D. et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

TREUDE, T. et al. A. Consumption of Methane and CO₂ by Methanotrophic Microbial Mats from Gas Seeps of the Anoxic Black Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 7, p. 2271–2283, 2007.

VAN BEILEN, J. et al. Rubredoxins Involved in Alkane Oxidation. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 6, p. 1722–1732, 2002.

VAN BEILEN, J. et al. Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment. **Oil & Gas Science and Technology**, v. 58, n. 4, p. 427-440, 2003.

VAN BEILEN, J. et al. Analysis of *Pseudomonas putida* alkane degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the *alk*-genes. **Microbiology**, v. 147, p. 1621–1630, 2001.

VAN HAMME et al. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 503–549, 2003.

VISSCHER, P. T.; CULBERTSON, C. W.; OREMLAND, R. S. Degradation of trifluoroacetate in oxic and anoxic sediments **Nature**, v. 369, p. 729-731, 1994.

VOORDOUW, G. et al. Characterization of 16S rRNA genes from oil field microbial communities indicates the presence of a variety of Sulfate-Reducing, Fermentative, and Sulfide-Oxidizing Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1623-1629, 1996.

WACKETT, L. P. et al. Survey of microbial oxygenases: trichloroethylene degradation by propaneoxidizing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 2960–2964, 1989.

WAGNER et al. Case Histories of Microbial Prospection for Oil and Gas, Onshore and offshore in Northwest Europe, in Surface exploration case histories: Applications of geochemistry, magnetics, and remote sensing,. **SEG Geophysical References Series**, v. 11, p. 453-479, 2002.

WENTZEL et al. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 1209–1221, 2007.

YOUSSEF, N. et al. Comparison of Species Richness Estimates Obtained Using Nearly Complete Fragments and Simulated Pyrosequencing-Generated Fragments in 16S rRNA Gene-Based. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 5227-5236, 2009.

YOUSSEF, N.; ELSHAHED, M. S. Diversity rankings among bacterial lineages in soil. **The ISME Journal**, v. 3, p. 305–313, 2009.

ZHANG, H. et al. Gemmatimonas aurantiaca gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1155–1163, 2003.

ZHOU, J.; BRUNS M. A.; TIEDJE, J. M. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 316–322, 1996.