

BRUNO KAROLSKI

METAGENÔMICA COMPARATIVA E  
PERFIL METABÓLICO *IN SILICO* DE SOLOS  
NO MUNICÍPIO DE CUBATÃO, SP

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Marie-Anne Van Sluys

Versão original

São Paulo  
2013

## RESUMO

KAROLSKI, B. **Metagenômica comparativa e perfil metabólico *in silico* de solos do município de Cubatão, SP.** 2013. 203 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Cubatão, o maior polo industrial da América Latina também já foi uma das cidades mais poluídas do mundo. Os 30 anos de intensa atividade industrial vêm pressionando o meio ambiente com substâncias tóxicas e afetando gravemente a saúde da população. Dentre as substâncias contaminantes mais importantes da região estão os derivados de petróleo como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos. Conhecidos como BTEX, eles são produzidos e utilizados em larga escala e a contaminação ocorre frequentemente através de vazamentos. Nos solos, devido à sua solubilidade em água, essas substâncias podem se espalhar por longas distâncias a partir do ponto afetado contaminando locais afastados. Já foi comprovada a capacidade de procariotos de sobreviver em locais contaminados com BTEX e até utilizá-los como fonte de carbono. Os procariotos adaptados catabolizam os contaminantes transformando-os em substâncias menos tóxicas e até mesmo eliminando-os do ambiente, capacidade de grande interesse econômico e ambiental. Nessa linha, nossa proposta visa o estudo das comunidades microbianas de solos afetados e não afetados por BTEX. Para isso foi utilizada a metagenômica como abordagem de estudo identificando-se diferenças qualitativas e quantitativas nas estruturas microbianas de três diferentes locais do município de Cubatão, sendo um deles afetado diretamente por BTEX. Pelo método utilizado e aqui desenvolvido, foi possível identificar um panorama metabólico geral identificando-se genes relevantes e o potencial de degradação de hidrocarbonetos aromáticos de procariotos conhecidos e desconhecidos, revelando melhor o potencial metabólico dos procariotos dos solos identificados. Os resultados apresentados podem contribuir para um melhor entendimento da dinâmica *in situ* de uma comunidade microbiana afetada por BTEX assim como melhorar o conhecimento sobre a comunidade microbiana de um local altamente impactado como Cubatão.

**Palavras-chave:** BTEX. Microbiologia. Compostos aromáticos. Metagenômica. Cubatão.

## ABSTRACT

KAROLSKI, B. **Comparative metagenomics and metabolic soil profiling in Cubatão County, SP**. 2013. 203 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Cubatão is the largest industrial site in Latin America and was in the past one of the most polluted cities in the world. Thirty years of intense industrial activity has damaged the environment with toxic substances and has severely affected the inhabitants' health. Among the contaminants found in the region, the petroleum derivatives benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes are the most important. Known collectively as BTEX, they are produced and used at a large scale and environment contamination frequently occurs. Because it is highly soluble in water, when in soil BTEX can spread long distances from the original contamination site, thus affecting large areas. Some microorganisms are known to live in contaminated environments and use contaminants such as BTEX as a unique carbon source for energy production. They catabolize contaminants into less dangerous products or even eliminate them from environment, a feature which has great commercial and environmental interest. We therefore compared the microbial communities in soils which were affected and un-affected by BTEX contamination. For this, we used a metagenomics approach and developed a comparison method to identify microorganisms and degradation potential of soils studied. We found qualitative and quantitative differences in microbial structures from three different sites in Cubatão County, one of which is contaminated with BTEX. We constructed a metabolic overview identifying important genes, degradation potential and microorganisms related to BTEX degradation. The results presented here could contribute to understanding the *in situ* dynamics of a BTEX affected microbial community as well as improving our knowledge of the microbial community of Cubatão, a highly environmentally impacted place.

**Keywords:** BTEX. Environmental microbiology. Aromatic compounds. Metagenomics. Cubatão.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Importância dos organismos procariotos

Os micro-organismos procarióticos, grupo de seres vivos microscópicos, unicelulares e desprovidos de membrana nuclear, são a primeira e mais abundante forma de vida do planeta. Segundo Whitman e colaboradores, estima-se que no planeta existam entre  $4,5 \times 10^{30}$  e  $6,4 \times 10^{30}$  procariotos acumulando uma massa de carbono estimada entre 350 e 550 Pg (1 Pg=  $1 \times 10^{15}$  gramas) (WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998). Esta forma de vida está espalhada pelos mais diversos ambientes no planeta habitando tanto locais onde há outras formas de vida quanto locais extremos como ambientes de gelo eterno localizados na Antártica (RIVKINA et al., 2000) e fontes hidrotermais nas profundezas dos oceanos com temperatura aproximada de 350 °C (JANNASCH; MOTTTL, 1985). A grande variabilidade metabólica encontrada nos procariotos é uma das características que confere ao grupo a capacidade de sobreviver nos mais variados ambientes. A ampla gama de substâncias orgânicas e inorgânicas utilizadas para a produção de energia confere a capacidade de colonização e modificação de diferentes habitats. A atividade procariótica também é essencial para diversos ciclos biogeoquímicos como os ciclos do nitrogênio, oxigênio, carbono e enxofre.

Além da ubiquidade, o que por si só confere ao grupo importância ímpar, os procariotos são considerados o grupo mais diverso do planeta estando muito acima de qualquer outro grupo de seres vivos. O número de espécies de procariotos estimada ainda é controversa, mas está na ordem de  $10^5$  a  $10^7$  (WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998). Whitman e colaboradores estimaram também a abundância dos procariotos em diferentes ambientes, mostrada na **Tabela 1**

**Tabela 1** – Estimativa da abundância de procariotos em diferentes ambientes

<b>Ambiente</b>	<b>Número de células procarióticas x 10<sup>28</sup></b>
<i>Ambientes aquáticos</i>	12
<i>Oceano profundo</i>	355
<i>Solo (superfície)</i>	26
<i>Subsolo</i>	25-250
<i>Total</i>	415-640

Fonte: (WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998).

## 1.2 Histórico da classificação em procariotos

Apesar de ser o maior grupo de seres vivos existentes, os procariotos não eram conhecidos até o século XVIII. Serem microscópicos, extremamente simples e não disporem de informações fósseis são fatores que contribuíram para esse anonimato. Inicialmente os organismos procariotos foram tratados como formas pleiotrópicas do mesmo organismo. A primeira classificação dos procariotos aconteceu nesse século a partir de observações morfológicas das células que levavam em consideração os diferentes formatos (ROSSELLO-MORA; AMANN, 2001).

O grande avanço no estudo dos organismos procariotos aconteceu com o advento da cultura *in vitro* no século XIX (ROSSELLO-MORA; AMANN, 2001). Por meio de uma cultura pura, a morfologia tanto das células quanto das colônias pôde ser melhor estudada. Quando comparadas, diferenças suficientes foram observadas para o início de uma classificação. Os primórdios da identificação microbiana foram baseados em observações fenotípicas como morfologia, temperatura e pH de crescimento, (KAMPFER; GLAESER, 2012) e apesar de serem observações básicas, foram o suficiente para a criação de seis gêneros procarióticos dentro do reino *Plantae* em 1872 (SCHLEIFER, 2009).

No final do século XIX e início do século XX, muitas publicações com a descrição de diversos gêneros bacterianos apareceram. Estas publicações descreviam ecologia, morfologia e bioquímica dos organismos identificados. Em 1909 houve a primeira tentativa de uma relação genealógica entre os procariotos. Outras formas de classificação surgiram até que em 1923 foi publicada a primeira edição do Bergey's Manual a qual continha a primeira chave de identificação de procariotos (ROSSELLO-MORA; AMANN, 2001). Esta edição e edições subsequentes deste manual tentaram

unificar a classificação bacteriana, que por falta de uma regra geral, contato entre os pesquisadores e divergências na nomenclatura, muitas vezes acabava por identificar com nomes diferentes um mesmo procarioto. Exemplo disso foi o caso da *Pseudomonas stutzeri* que também era classificado como *Bacillus denitrificans* II em 1895 (VAN NIEL; ALLEN, 1952).

O crescente uso de características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas para a identificação dos procariotos levou ao surgimento da taxonomia numérica, um tipo de classificação baseada em um grande número de características tanto morfológicas quanto metabólicas. Possuía um caráter qualitativo e gerava uma quantidade muito grande de dados comparáveis. Características como pigmentação, local da inserção de flagelo, utilização de fontes de carbono, utilização de aminoácidos e suscetibilidade a antibióticos eram considerados para essa classificação. Cada uma dessas características apresentavam diversos subitens chegando a dezenas de critérios de classificação (MOORE et al., 2010; VALDERRAMA et al., 1991). A taxonomia numérica tinha como objetivo agrupar bactérias que apresentavam características semelhantes possibilitando uma análise taxonômica mas não filogenética dos procariotos. O uso da taxonomia numérica foi facilitada pelo desenvolvimento computacional e possibilidade de análises multivariadas, o que permitiu a comparação do grande número de dados (ROSSELLO-MORA; AMANN, 2001; SCHLEIFER, 2009).

Na década de 1960 com o aumento do conhecimento das propriedades do DNA e desenvolvimento de técnicas de biologia molecular as características genéticas passaram também a ser utilizadas como critérios de classificação juntamente com as características morfológicas, o que abriu novas portas na classificação dos procariotos (GUPTA; GRIFFITHS, 2002).

O método clássico de comparação do material genético entre diferentes organismos é a comparação do conteúdo G+C presente no genoma. Essa comparação consiste em uma medida indireta deste conteúdo por meio da desnaturação do material genético. Genomas ricos em G+C tendem a desnaturar a temperaturas mais altas, enquanto genomas pobres desnaturam a temperaturas mais baixas (MARMUR; DOTY, 1962). Portanto, diferentes pontos de desnaturação de genomas poderiam ser utilizados como informação para diferenciação de espécies. Com a evolução das observações a respeito dos conteúdos G+C em diferentes genomas, foi estabelecido que dois procariotos que compartilham 90% de conteúdo G+C podem ser classificados dentro do mesmo gênero e se o compartilhamento for maior que 95%, eles podem ser

considerados da mesma espécie (ROSSELLO-MORA; AMANN, 2001). Apesar de ser uma característica utilizada até hoje na composição do conjunto de dados para identificação procariótica, o conteúdo G+C não é suficientemente robusto para sustentar uma classificação mais precisa (MOORE et al., 2010).

O refinamento da técnica de conteúdo G+C se deu pelo desenvolvimento de uma nova técnica: a hibridação de ácidos nucleicos, DNA-DNA e DNA-RNA. Esta técnica é baseada na capacidade de desnaturação e renaturação dos ácidos nucleicos. Quando aquecidos a temperaturas por volta de 100 °C, as moléculas de DNA têm sua dupla-fita separada e, em condições controladas, podem ter suas fitas religadas. Quando as moléculas de DNA de dois organismos diferentes são misturadas, desnaturadas e em seguida renaturadas, pode ocorrer a formação de moléculas híbridas, com maior ou menor complementariedade, dependendo do quão similar as sequências de DNA dos organismos são.

Duas taxas são calculadas com base na homologia das moléculas de DNA e na temperatura de renaturação da técnica de hibridação de ácidos nucleicos. A RBR, que reflete a taxa de moléculas híbridas formadas, e a  $\Delta T_m$ , que corresponde à variação entre a temperatura de renaturação da dupla-fita híbrida e da dupla-fita não híbrida (ROSSELLO-MORA; AMANN, 2001). Para que um procarioto pertença à mesma espécie de acordo com a técnica de hibridação de ácidos nucleicos, é preciso que ele apresente pelo menos 70% de RBR e  $\Delta T_m$  de até 5 °C (WAYNE, 1988). Um problema do método é que ele depende da escolha de um organismo de referência, que precisa ser próximo filogeneticamente do organismo a ser identificado. A técnica de hibridação DNA-DNA ainda é válida e é atualmente uma das melhores para identificação de espécies. Ela pode teoricamente ser aplicada a qualquer procarioto e é um método de identificação de espécies não conhecidas. (GORIS et al., 2007; ROSSELLO-MORA; AMANN, 2001).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular e seu uso para a determinação das relações filogenéticas entre os procariotos passou-se a uma busca constante por características genéticas que auxiliassem no refinamento da classificação dos procariotos. A descoberta dos genes que codificam para as subunidades ribossômicas foi uma importante ferramenta para esse fim.

O ribossomo é a organela celular envolvida na tradução das informações do DNA em proteínas. É constituído por três subunidades de diferentes tamanhos, o que pode ser evidenciado por ultracentrifugação. Nos seres procarióticos as subunidades

encontradas são a 5S, 16S e 23S codificadas por genes específicos de tamanhos aproximados de 120, 1650 e 3300 nucleotídeos respectivamente (ROSSELLO-MORA; AMANN, 2001).

A primeira abordagem para a classificação dos procariotos a partir de estudos do gene que codifica para a subunidade 16S ou SSU rRNA foi realizada por Woese e colaboradores na década de 1970. Eles também iniciaram o banco de dados de sequências desse gene em diferentes organismos. Este gene se mostrou muito propício à classificação procariótica, pois é encontrado em todos os seres vivos, apresenta considerável quantidade de informação genética e é conservado entre as espécies (SCHLEIFER, 2009). Por não ser propenso a transferências laterais e apresentar variação em sua sequência de organismo para organismo, ele se mostrou efetivo também para o cálculo de distâncias evolutivas. As variações encontradas nesses genes refletem a própria evolução do organismo sendo pouco afetado por pressões seletivas (WOESE, 1987).

A classificação de um organismo baseada no gene SSU rRNA ocorre a partir da comparação da sequência de nucleotídeos desse gene com a sequência de outros organismos. Sequências mais similares identificam organismos mais próximos evolutivamente. Para que dois organismos pertençam à mesma espécie deve haver 97% de identidade entre as sequências, e para que pertençam ao mesmo gênero, 95% de identidade (TINDALL et al., 2010). Essas porcentagens foram definidas baseadas na técnica de hibridação de DNA-DNA. Foi observado que organismos da mesma espécie, que compartilhavam valor igual ou maior do que 70% na técnica de hibridação, apresentavam valores de 97% de similaridade nas sequências de seus SSU rRNAs.

A facilidade de sequenciamento e rapidez na identificação dos procariotos determinaram a técnica da comparação da sequência de genes SSU rRNA como um dos melhores e mais abrangentes métodos de classificação procariótica. No entanto, uma das críticas recorrentemente feita a esse método é a sua baixa para identificação de espécies (GUPTA; GRIFFITHS, 2002; ROSSELLO-MORA; AMANN, 2001; SCHLEIFER, 2009; TINDALL et al., 2010). Na época em que as árvores filogenéticas baseadas na sequência do SSU rRNA foram iniciadas, existiam poucas ramificações e a separação entre os diferentes grupos era melhor visualizada. Com cada vez mais sequências ribossomais adicionadas aos bancos de dados, os ramos das árvores filogenéticas foram sendo preenchidos e a classificação dos organismos foi ficando cada vez mais difícil e imprecisa (GUPTA; GRIFFITHS, 2002). Começaram a surgir

casos de espécies diferentes com sequências de genes SSUrRNA com semelhanças maiores do que 97%, causando imprecisões nas classificações, como demonstrado pelo método de hibridação DNA-DNA, que apresenta maior resolução para definição de espécies procarióticas. Fox e colaboradores mostraram claramente a imprecisão do método de SSU rRNA quando compararam as espécies *Bacillus psychrophilus* e *Bacillus globisporus*. O resultado para o método SSU rRNA foi de 99,8% de identidade entre as duas espécies, sugerindo que esses dois organismos poderiam ser agrupados como uma mesma espécie. Já o método de hibridação de DNA mostrou uma taxa de hibridação de apenas 50%, o que significa que esses dois organismos claramente não pertencem à mesma espécie (FOX; WISOTZKEY; JURTSUK, 1992).

Gupta e Griffiths (2002) ainda questionam a classificação de 90% a 95% das bactérias em somente quatro grupos, como indicado pelas análises do gene SSU rRNA, e indicam que esse resultado deve ser reflexo da baixa resolução desse método.

Outro fato que pode ser decisivo para a identificação de espécies, pelo método de SSU rRNA, é a variação das diferentes cópias do gene no mesmo genoma. As diferentes cópias ribossomais podem ter variações de 1% a 2%, e às vezes até mais, o que pode dificultar uma classificação mais precisa do procarioto (SCHLEIFER, 2009).

Os procariotos compõem um grupo muito diverso e sua classificação ainda é controversa. O avanço das técnicas de biologia molecular, estão possibilitando um maior conhecimento desses organismos, porém em muitos casos, esse conhecimento está colocando à prova métodos de classificação que outrora cumpriam bem seu papel. A cada novo aporte de informação nos bancos de dados, novas falhas são descobertas, assim, o desenvolvimento de técnicas mais precisas é necessário.

### **1.3 A presente identificação e classificação microbiana**

Para todos os fins, desde a pesquisa básica até a aplicada, a classificação dos organismos procarióticos é de extrema importância para a comunicação entre as partes. Para esta finalidade, o sistema de classificação e a nomenclatura de Linneu foram adotados para identificação e filogenia desses organismos, nos mesmos moldes estabelecidos para outros grupos de seres vivos (MOORE et al., 2010). A nomenclatura se mostra adequada para a identificação de procariotos, mas é necessária a definição de melhores critérios e parâmetros para que se estabeleça a filogenia dos procariotos.

O conceito de espécie dentro dos organismos procariotos é bastante questionável. Antes do surgimento das técnicas moleculares, por volta da década de 1950, a identificação de espécies era realizada com base em observações morfológicas de organismos isolados, o que culminava em uma classificação que continha poucas informações, e com uma visão subjetiva (GEVERS et al., 2005; VAN NIEL; ALLEN, 1952). Nesta época, surgia um conceito de espécie que vigorou por muito tempo, até aproximadamente o ano 2000, e que ainda tem influência na classificação procariótica. O conceito criado por Gordon e Mihm em 1962 definia espécie procariótica como *“um grupo de linhagens isoladas recentemente, mantidas in vitro por diferentes períodos de tempo; e suas variantes, as quais possuem em comum um conjunto de características correlacionáveis que as separam de outras linhagens”* (GORDON; MIHM, 1962). Este conceito de espécie, devido à época em que foi criado, refere-se somente a características morfológicas, não levando em conta todo o ramo da classificação microbiana baseada nos dados de DNA.

Rosseló-Morá e Amann, em 2000, reformularam o conceito de espécie procariótica incluindo também os métodos de comparação de material genético como métodos válidos para determinação de espécies. Os autores sugeriram como espécie um grupo de linhagens que compartilham alto grau de similaridade com relação a diversas características. Essa definição foi aceita pelo comitê de bacteriologia, sendo publicada da seguinte forma: *“espécie é uma categoria que engloba (preferencialmente) um grupo coerente, do ponto de vista genômico, de indivíduos isolados/linhagens que compartilham um alto grau de similaridade em (muitas) características independentes, comparativamente testadas sob condições altamente padronizadas”* (ROSSELLO-MORA; AMANN, 2001; STACKEBRANDT et al., 2002). O documento, apesar de não instituir um método único para identificação de espécies, sugere que observações de caráter comparativo sejam feitas a características independentes. Esta comparação engloba características tanto genóticas quanto fenotípicas, e o cruzamento destes dados para a determinação de espécies. Este método multivariável de classificação procariótica foi denominado de taxonomia polifásica.

A taxonomia polifásica, sendo válidos também os nomes identificação polifásica e classificação polifásica, foi primeiramente proposta por Colwell em 1968 (VANDAMME et al., 1996). Ela define um sistema de classificação baseado em informações genóticas e fenotípicas como forma de identificação procariótica.

Com relação a análises fenotípicas podemos destacar o uso da tecnologia de MALDI-TOF ou espectrometria de massas. Essa tecnologia utiliza cultura isolada, lisado celular ou extratos bacterianos diretamente e permite o estudo do material genético e proteínas celulares tanto isoladas quanto em células (LAY, 2001).

Esse método aplicado a células em suspensão ou mesmo em colônias gera um perfil espectral exclusivo de cada tipo de procarionto, o qual pode ser utilizado para identificação. Possui a vantagem de ser bastante rápido para análises, pois não requer, necessariamente, nenhuma técnica complementar de preparação da amostra, característica bastante vantajosa em identificação de bactérias patogênicas. Para esse tipo de bactéria, a técnica funciona relativamente bem, já que se dispõe de um banco de dados bastante informativo (CARBONNELLE et al., 2012), podendo-se chegar a índices de identificação de 96% para quase 700 espécies (KHOT et al., 2012). Para bactérias não patogênicas, a identificação por MALDI-TOF não é precisa devido à falta de informações dos espectros em bancos de dados e às próprias variações encontradas nas culturas, dificultando a identificação (LAY, 2001).

A necessidade de cultura é outro fator que dificulta a identificação de procariontos. Sem cultura não se tem um espectro, e sem o espectro não é possível a identificação. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de novas técnicas de cultura ou a descoberta de características que permitam a identificação sem a necessidade do cultivo.

Outro método de análise fenotípica é a classificação quimiotáxica. Esta classificação consiste no estudo e identificação de componentes estruturais da célula como parede celular, membrana plasmática e citoplasma. Dentro deste escopo, estruturas específicas são exploradas como lipopolissacarídeos, poliaminas, lipídeos, peptidoglicanos e benzoquinonas para a diferenciação e identificação de procariontos (TINDALL et al., 2010). A simples identificação de presença ou ausência de determinada estrutura pode já ser informativa para a classificação de um organismo. Um exemplo disso são as ubiquinonas que são restritas às classes Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria, e a simples constatação de sua presença já restringe a identificação do procarionto a essas três classes (TINDALL et al., 2010).

A quimiotaxonomia pode fornecer maiores informações e ser mais precisa do que testes fisiológicos e bioquímicos, porém sofre com a falta de resolução para níveis taxonômicos mais específicos. Divergências de resultados entre laboratórios também

podem ocorrer devido ao comprometimento da reprodutibilidade relacionado a diferenças de equipamentos e protocolos (MOORE et al., 2010).

Completando a taxonomia polifásica, os métodos genotípicos de identificação existem em maior número e são os mais utilizados para a classificação procariótica. Muitos desses métodos são baseados em reação de polimerização em cadeia, hidrólise do material genético por enzimas de restrição e sequenciamento de DNA. Estes métodos evidenciam diferenças e similaridades do material genético, o que ajuda na identificação de procariotos e no estabelecimento das relações filogenéticas entre eles.

As técnicas como AFLP, PFGE e PCR-RFLP são baseadas na digestão dos genomas por enzimas de restrição e na amplificação dos fragmentos formados evidenciando diferenças entre os genomas que podem ser utilizadas para classificação (VANDAMME et al., 1996).

Outros métodos de análise genômica como MLSA e MLST se baseiam em genes como *rpoA* e *pheS*, conhecidamente conservados e com valor para diferenciações entre espécies. As duas técnicas evidenciam diferenças existentes nesses genes usadas na identificação e construção de relações filogenéticas entre os organismos, já que, como o gene SSU rRNA, esses genes são menos propensos a transferências laterais e a pressões seletivas. Para realização desta comparação, iniciadores específicos, técnicas de reação de polimerização em cadeia e sequenciamento de nucleotídeos são utilizados. Este método abrange muito bem níveis mais específicos de identificação, porém, perde resolução para níveis mais amplos como filos e classes (MAIDEN et al., 1998; NASER et al., 2005).

Com a diminuição de custo de sequenciamento e incremento da capacidade bioinformática, os projetos de sequenciamento de genomas completos estão em plena ascensão. Em 2010, estavam depositados no banco de dados Genome OnLine Database (GOLD); <<http://www.genomesonline.org>>, 2400 genomas completos (MOORE et al., 2010). Atualmente, neste mesmo banco se encontram 3788 genomas completos depositados, o que representa um aumento de 50% em apenas 2 anos. Número bastante expressivo desde a primeira publicação do banco de dados há mais de 10 anos, com apenas 21 genomas (KYRPIDES, 1999).

O sequenciamento de genomas completos é uma das técnicas mais promissoras para classificação de procariotos (GUPTA; GRIFFITHS, 2002; MOORE et al., 2010; WAYNE, 1988). Com o genoma completo, comparações totais do material

genético entre diferentes organismos se tornam possíveis. Análises entre as sequências do genoma dos organismos poderão ser realizadas *in silico*, com alta padronização e qualidade. Duas técnicas que surgiram baseadas no sequenciamento completo de genomas são as técnicas ANI (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2007) e MUM (DELOGER; EL KAROUI; PETIT, 2009). Ambas se baseiam em comparações nucleotídicas entre regiões em comum dos genomas e se mostraram bastante eficientes na construção de relações filogenéticas.

Não há dúvidas de que entre as técnicas genotípicas de identificação, a mais utilizada é a técnica de análise da sequência do gene SSU rRNA. Apesar das críticas, ainda é uma das melhores ferramentas de comparação que existem atualmente e uma das poucas com a capacidade de fornecer dados para construção de filogenia. Um fato que possibilita esta capacidade é o enorme banco de dados de sequências do SSU rRNA que existe atualmente. Os bancos de dados RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>) e SILVA (<http://www.arb-silva.de/>) possuem respectivamente 2.578.902 e 3.587.011 sequências desse gene depositadas.

Os estudos genotípicos dos procariotos estão se voltando cada vez mais a análises computacionais e a comparações em bancos de dados *in silico*. Técnicas antes realizadas em laboratório e que despendiam grande quantidade de tempo podem ser feitas atualmente em minutos e com uma quantidade de dados muito maior. Esse avanço, tanto no número de dados quanto na capacidade de processamento das informações, levou ao aparecimento de técnicas de estudos de comunidades procarióticas inteiras sem a necessidade de cultivo. Atualmente podemos ter acesso tanto à composição quanto ao tipo de metabolismo dessas comunidades, uma porta de estudos para um grande potencial biotecnológico.

#### **1.4 Metagenômica**

Como já mencionado no item 1.1, o grupo dos procariotos é o de maior diversidade e abundância do planeta. Mesmo com todos os avanços tecnológicos, o nosso conhecimento desse grupo de organismos ainda é muito pequeno. A necessidade de cultivo desses organismos para estudo dificulta ainda mais nosso aprofundamento no conhecimento. Estima-se que seja possível o cultivo de apenas 1% de todos os procariotos (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2008; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003; STREIT; RA, 2004;). Na tentativa de superar essa dificuldade e

poder aprofundar o conhecimento desse grupo, técnicas moleculares de estudo sem a necessidade de cultivo de organismo foram desenvolvidas. Extração de material genético, clonagem, sequenciamento e expressão gênica foram aplicados diretamente a comunidades microbianas do ambiente, o que resultou no aparecimento de um novo tipo de estudo chamado de metagenômica.

A metagenômica pode ser definida como uma análise funcional e genômica de uma comunidade microbiana do ambiente sem a necessidade de cultivo. Esse nome foi utilizado oficialmente na primeira conferência sobre o assunto (Metagenomics 2003) realizada na cidade de Darmstadt na Alemanha (REISENFELD; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2004).

O estudo metagenômico está baseado inteiramente no estudo do material genético de uma comunidade microbiana, e o isolamento de ácidos nucleicos é o primeiro passo. Este isolamento pode ser realizado diretamente no ambiente a partir de uma lise celular total, ou indiretamente a partir de separação das células presentes na amostra que então segue para a lise celular (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2008). O material genético é purificado e recuperado, e, a partir deste momento, empregado para o estudo, que pode ser dirigido a diversos caminhos de acordo com o interesse da pesquisa. Em uma abordagem funcional, o material genético extraído do ambiente é fragmentado e clonado em vetores de expressão e transfectado em organismos receptores. Estes organismos expressando os clones são então testados para a função de interesse, e os clones positivos são selecionados para um estudo mais aprofundado de sua sequência nucleotídica (HESS et al., 2011; REISENFELD; GOODMAN; HANDELSMAN, 2004). Este tipo de abordagem é bastante laboriosa e apresenta baixo rendimento.

Um exemplo desse tipo de abordagem metagenômica é trabalho realizado por Riesenfeld e colaboradores (2004), cujo foco eram genes de resistência a antibióticos. Nas 4,1 gigabases ( $10^9$  bases) clonadas, foram encontrados apenas 10 clones que se mostraram resistentes aos antibióticos testados. Para otimizar o trabalho de busca quando o foco é a abordagem funcional, um passo de enriquecimento de material pode ser realizado anteriormente à extração de DNA.

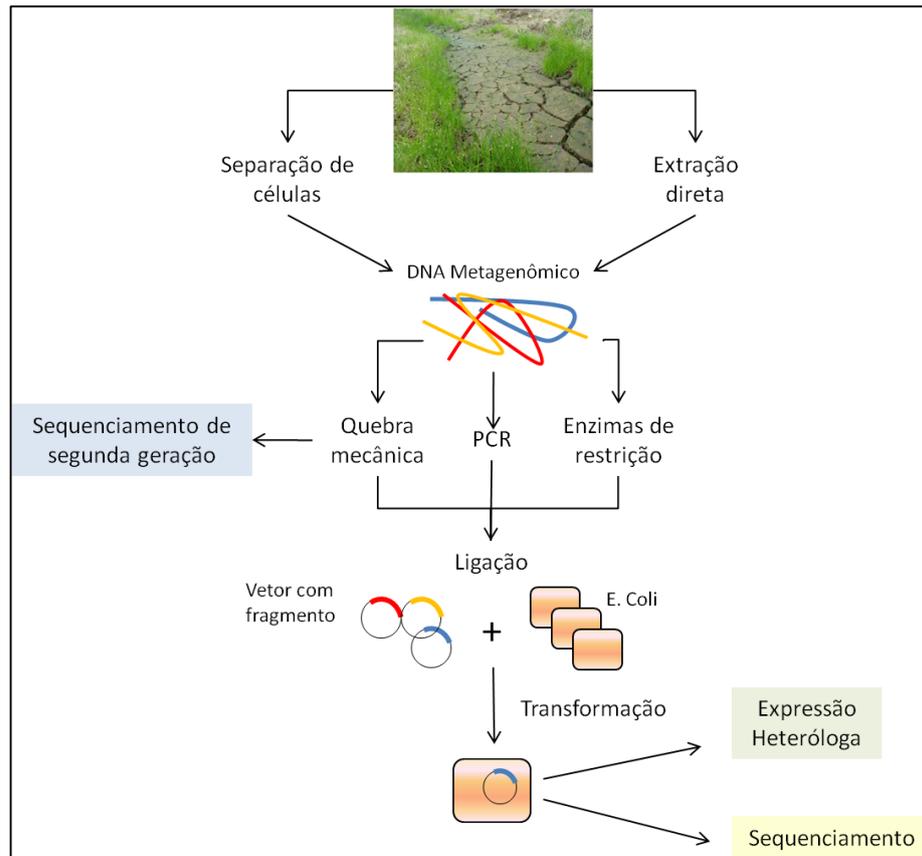
Outro exemplo foi o estudo de Hess e colaboradores (2011), cujo interesse estava em enzimas de degradação de biomassa de origem vegetal em rúmen bovino. Para o estudo, uma massa vegetal foi introduzida no rúmen e apenas procariotos que

estavam aderidos e processando o material vegetal foram selecionados para a análise metagenômica .

A outra abordagem metagenômica é a baseada em sequência ou sequência dirigida (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003). Ela consiste no uso de iniciadores conhecidos e na amplificação direta do DNA metagenômico. É comum a aplicação dessa abordagem para identificação microbiana no ambiente a partir do uso de iniciadores específicos para o gene SSU rRNA. Com isso, um grande número de sequências deste gene em diversos organismos pode ser amplificado e a comparação dessas sequências, além de permitir a identificação dos organismos que constituem a comunidade, pode ser utilizada para estabelecer relações filogenéticas e identificar sequências que não são identificadas nos bancos de dados, ou seja, possíveis novas espécies, revelando uma diversidade que não poderia ser alcançada somente por meio de comparações com o banco de dados (BRUCE et al., 2010).

A abordagem da sequência dirigida ainda permite a recuperação de genes que codificam enzimas de interesse. Através de comparações de sequências conhecidas, regiões conservadas podem ser identificadas e utilizadas como molde para iniciadores. Genes presentes no metagenoma que possuem a mesma função ou uma função parecida podem ser recuperados por amplificação, clonados e ter sua atividade avaliada (COURTOIS et al., 2003). A Figura 1 esquematiza as principais etapas de um estudo metagenômico.

**Figura 1** - Representação das etapas de um estudo metagenômico



Uma grande diversidade de procaríotos foi descoberta com o avanço dos estudos metagenômicos. No entanto, a capacidade de geração de informações era ainda muito limitada e demorada. As análises metagenômicas envolvem sempre uma etapa de sequenciamento de nucleotídeos. O sequenciamento utilizado para os estudos em questão era o sequenciamento de nucleotídeos pelo método Sanger (SANGER; COULSON, 1975), que é dependente de clonagem e gera uma quantidade de dados que para a metagenômica se mostra insuficiente.

Em 1998 Ronaghi e colaboradores desenvolveram uma técnica de sequenciamento de nucleotídeos que revolucionou a metagenômica (RONAGHI; UHLEN; NYREN, 1998). Este sequenciamento baseado em emissão de luz recebeu o nome de pirosequenciamento. A técnica foi a base para o desenvolvimento da terceira geração de sequenciadores e aumentou exponencialmente a quantidade de dados gerada. Enquanto o sequenciamento pelo método Sanger pode gerar por corrida cerca de 1000 bases, as tecnologias baseadas no pirosequenciamento podem chegar à ordem de  $10^9$  a  $10^{12}$ , dependendo da plataforma utilizada (DANIEL, 2005).

Além de aumentar a capacidade de informação gerada, o sequenciamento de terceira geração promoveu novas abordagens de análises metagenômicas, alcançadas pela possibilidade de sequenciamento de ácidos nucleicos sem a necessidade de clonagem.

Uma das novas abordagens que puderam ser desenvolvidas graças à técnica de pirosequenciamento foi o sequenciamento ambiental direto em larga escala. Esta técnica consiste no sequenciamento direto do material genético encontrado em diferentes habitats. Por não passar por clonagem, não é necessária a preparação de bibliotecas genômicas em vetores ou desenvolvimento de iniciadores para estudo de genes. Este método pode gerar dados que representam toda a comunidade microbiana, possibilitando a comparação entre comunidades de diferentes locais (QUAISER et al., 2011) ou de diferentes datas (MARCHETTI et al., 2012).

O primeiro trabalho utilizando essa abordagem metagenômica foi publicado em 2004 e teve como local de estudo o mar de sargaço (VENTER et al., 2004). Venter e colaboradores foram os pioneiros a aplicar a tecnologia de pirosequenciamento diretamente em amostras ambientais. Pela primeira vez pôde-se mostrar tão detalhada e profundamente uma comunidade microbiana aquática abordando-se diferentes características. Várias faces da metagenômica, reveladas a partir do sequenciamento em larga escala, se apresentam neste trabalho. Identificação microbiana, identificação metabólica, montagem de genomas e identificação e comparação de genes de interesse puderam ser abordadas em um único estudo, mostrando todo o potencial inovador e promissor da técnica.

A partir deste primeiro trabalho, muitos outros ambientes foram sendo explorados como os tratos digestórios de animais, ambientes pelágicos e solos. Habitats específicos como fezes (GILL et al., 2006) e pele humana (GRICE; SEGRE, 2011) também já foram abordados, e esses trabalhos além de gerar conhecimento sobre procariotos em geral, possuem também um caráter terapêutico, pois ao se entender melhor a dinâmica microbiana envolvida, melhorias no combate a infecções, previsão de doenças e tratamentos mais específicos e eficazes podem ser desenvolvidos.

Entre toda a diversidade microbiana existente, os procariotos ambientais são ainda uma grande incógnita para a ciência e, por esse motivo, muitos trabalhos de metagenômica focam comunidades microbianas ambientais na tentativa de entender quem são e o que fazem. Estes estudos não se restringem apenas a ambientes

inóspitos, desabitados e desprovidos de contato com seres humanos, mas também incluem ambientes que sofrem com atividades antropocêntricas e acabam sendo contaminados. Nesses ambientes, comunidades microbianas conseguem sobreviver e muitas vezes conseguem até utilizar o contaminante do local como fonte de carbono produzindo energia para manutenção e multiplicação celular (VOGEL, 1996). O potencial de degradação de contaminantes por procariotos é um dos focos de estudos metagenômicos graças ao seu grande potencial biotecnológico e de aplicabilidade, podendo se tornar uma ferramenta biotecnológica.

## **1.5 BTEX**

### **1.5.1 BTEX e contaminação ambiental**

Os xenobióticos são conhecidos por causarem impactos ambientais modificando a homeostase do ambiente e influenciando diretamente a interação entre os seres vivos e o meio onde vivem. Além do impacto ambiental causado pelo aporte de um elemento estranho ao ambiente, muitas vezes os xenobióticos são tóxicos, podendo ser os responsáveis direto pela mortalidade de seres vivos, ocasionando queda tanto no número de indivíduos quanto no número de espécies de um local afetado. O petróleo e seus derivados se posicionam em local de destaque entre os xenobióticos de maior importância com relação a impactos ambientais.

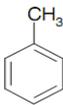
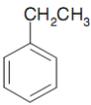
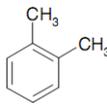
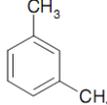
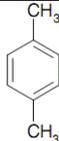
O petróleo é um recurso natural amplamente explorado e utilizado ao redor do mundo, sendo a principal fonte energética do planeta. Segundo a EIA, em 2011 foram produzidos em média mais de 87 bilhões de barris de petróleo por dia no mundo e os maiores consumidores desta fonte energética são, em ordem, Estados Unidos, China, Japão, Índia, Rússia e Brasil (EIA, 2013).

O petróleo raramente é utilizado em sua forma natural. Seu uso se dá após seu refino, que é o processo de separação de seus componentes, uma diversidade de substâncias orgânicas conhecidas como hidrocarbonetos. Uma vez separados, os componentes do petróleo são utilizados nas mais diversas produções industriais, sendo utilizados como pavimentação, solventes, combustíveis, lubrificantes, plásticos, borrachas e fibras sintéticas.

Entre os produtos derivados do petróleo, um grupo de substâncias tem chamado a atenção por suas características físico-químicas, toxicidade, taxa de produção e impacto no ambiente: o grupo denominado de BTEX. A sigla BTEX se refere ao

conjunto que agrupa benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos. Suas estruturas moleculares e características químicas se encontram na Tabela 2.

**Tabela 2 – Características dos hidrocarbonetos do grupo BTEX**

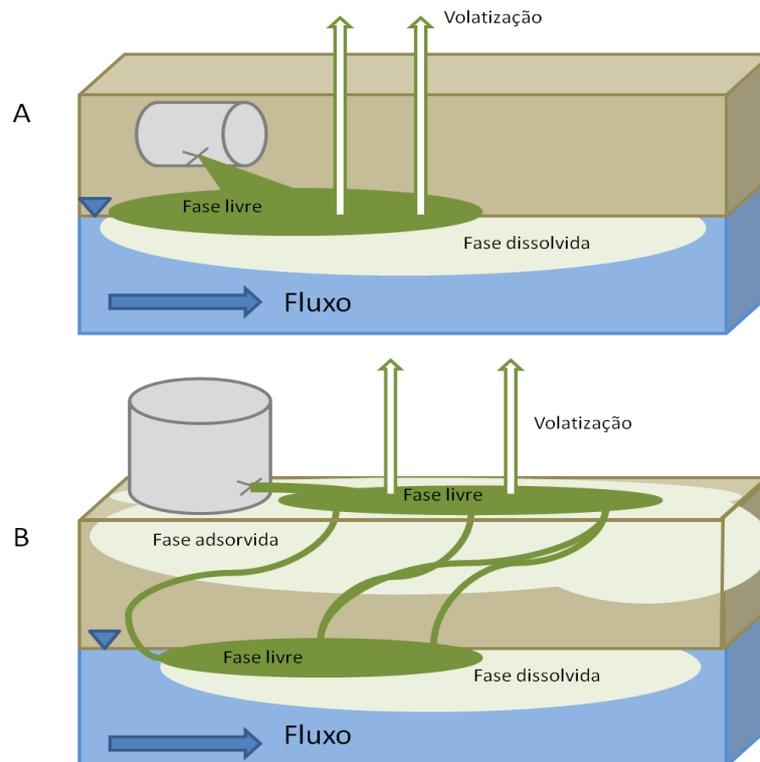
						
	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	<i>orto</i> -Xileno	<i>meta</i> -Xileno	<i>para</i> -Xileno
Fórmula molecular	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>
Peso molecular	78,11	92,1	106,2	106,2	106,2	106,2
Temperatura de fusão (°C)	5,5	-95	-95	-25	-48	13
Temperatura de ebulição (°C)	80,1	110,8	136,2	144,4	139,0	138,4
Solubilidade em água a 20 °C (mg/L)	1780	515	152	175	200	198

Fonte: (Baseado em AGTEREN; KEUNING; JANSSEN, 1998; WEELINK; EEKERT, 2010).

Estes hidrocarbonetos derivados do petróleo são produzidos em quantidades equivalentes a 10<sup>3</sup> toneladas por ano e são utilizados largamente em processos industriais como solventes e matérias-primas para produção de pesticidas, plásticos e fibras sintéticas (JINDROVA et al., 2002). Esse grupo de hidrocarbonetos também reúne componentes da gasolina, que pode conter de 10% a 40% destes hidrocarbonetos aromáticos em sua composição (FINOTTI; CAICEDO; RODRIGUEZ, 2001). Devido à importância desses hidrocarbonetos em processos industriais e ao fato de estarem presente em produtos difundidos mundialmente, contaminações ambientais em diversas partes do mundo envolvendo BTEX são comuns (ALFREIDER; VOGHT, 2007; BALDWIN et al., 2009; CAVALCA; DELL'AMICO; ANDREONI, 2004; MAZZEO et al., 2010). As contaminações com BTEX ocorrem principalmente por vazamentos, sejam dos componentes puros de tanques de armazenamentos ou encanamentos de indústrias, ou de gasolina de postos de combustíveis. Os postos de combustíveis têm grande contribuição nas contaminações com BTEX. Esse fato se deve à grande

quantidade desse tipo de local de distribuição e ao fato de a gasolina estar amplamente relacionada à vida cotidiana (FINOTTI; CAICEDO; RODRIGUEZ, 2001). Um recente estudo realizado pela Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo revelou que 79,5% das contaminações do Estado de São Paulo tinham como origem postos de combustíveis (SMA, 2012). A Figura 2 exemplifica dois tipos de vazamentos que ocorrem no ambiente.

**Figura 2** - Esquema de diferentes modos de contaminação do ambiente por BTEX



**A)** Vazamento que ocorre geralmente em tanques de postos de combustível onde os tanques de armazenamento são subterrâneos. Esse tipo de contaminação afeta o subsolo e a camada saturada (azul). Existe a formação de uma fase livre e de uma fase dissolvida que percorre grandes distâncias, podendo contaminar outros locais.

**B)** Exemplo de vazamento de um tanque de armazenamento sobre o solo. Quando ocorre este tipo de vazamento, existe contaminação superficial do solo, formando uma fase livre e uma fase adsorvida. A fase livre superficial pode penetrar no subsolo e formar outra fase livre e uma fase dissolvida na camada saturada do subsolo. Em ambos os casos ocorre contaminação do solo, água e ar através da volatilização do BTEX.

Pela sua solubilidade relativamente baixa em água, o BTEX quando liberado no ambiente pode ser carregado e alcançar longas distâncias. Pode contaminar o lençol freático e comprometer reservas de água de uso humano.

Não só a água é alvo de contaminação por BTEX, o ar também pode ser afetado. Por serem hidrocarbonetos voláteis e por terem baixa tendência de adsorção em matéria orgânica, quando derramados em solo, grande parte evapora atingindo a

atmosfera e pode retornar ao solo carregado pelas águas da chuva (FINOTTI; CAICEDO; RODRIGUEZ, 2001).

No ambiente, não se tem muitas informações das consequências diretas de contaminação por BTEX. Muito mais conhecidas são contaminações por petróleo que causam mortalidade de peixes, aves, mamíferos e podem contaminar amplas áreas pelágicas e costeiras. Contudo, alguns estudos comprovam a toxicidade de BTEX em seres vivos. Já foi demonstrada a toxicidade de BTEX no desenvolvimento de plantas utilizando como modelo as espécies *Sorghum bicolor* e *Cucumis sativum* (AN, 2004). A toxicidade também foi testada em alga verde *Selenastrum capricornutum* (HERMAN; INNIS; MAYFIELD, 1991). Nos estudos citados, em concentrações elevadas, o crescimento das plantas ficou comprometido, e no caso da alga verde foi comprovado danos à integridade da membrana celular causada pela exposição ao BTEX.

Em seres humanos, a toxicidade do BTEX já foi estudada (COSTA et al., 2006; GÉRIN et al., 1998; TRAVIS et al., 1994). A contaminação pode ocorrer através da pele, ingestão ou inalação. Altas concentrações de BTEX podem ocasionar irritação da pele, depressão do sistema nervoso central e problemas respiratórios. A exposição por períodos prolongados pode causar, além dos problemas já citados, problemas hepáticos e renais. O benzeno em particular é uma substância conhecidamente carcinogênica e exposições prolongadas a ele podem causar leucemia (TRAVIS et al., 1994). Doenças de coração, do sistema nervoso central e anemia aplástica também já foram relacionadas à exposição de benzeno (GUIMARÃES, 2005).

Sendo xilenos, tolueno e etilbenzeno substâncias tóxicas e benzeno, além de tóxico, conhecidamente carcinogênico, regulamentações para controle destas substâncias no ambiente existem tanto para atividades industriais que utilizam o BTEX quanto para monitoramento ambiental. A CONAMA, resolução 396 de 2008, determina valores máximos para a potabilidade da água no Brasil com relação à presença de BTEX (Tabela 3).

**Tabela 3** – Níveis máximos para a potabilidade da água com relação às concentrações de BTEX (CONAMA 396/2008)

<i>Hidrocarboneto</i>	<i>Valor máximo tolerado µg/L</i>
<i>Benzeno</i>	5
<i>Etilbenzeno</i>	200
<i>Tolueno</i>	170
<i>Xileno</i>	300

A presença de BTEX em praticamente todo o planeta aumenta as chances de contaminação acidental do ambiente colocando em risco a saúde de seres humanos. Suas propriedades químicas permitem uma rápida movimentação pelo solo e água se espalhando rapidamente por grandes áreas. Devido ao seu caráter tóxico, ações de contenção e recuperação ambiental precisam ser tomadas com agilidade em caso de acidentes. Medidas de retirada de BTEX do ambiente existem baseadas em princípios químicos, físicos e biológicos, neste último caso, utilizando-se a capacidade metabólica de procariotos para catabolizar e eliminar a contaminação do ambiente.

### **1.5.2 Degradação microbiana de BTEX**

Seja em solo ou em ambiente aquático, o BTEX quando atinge o meio ambiente causa problemas não apenas no local onde ocorre o derramamento, mas também em locais distantes, podendo se espalhar rapidamente. Devido ao seu potencial tóxico, medidas de retirada do BTEX do ambiente precisam ser tomadas com urgência impedindo o afastamento do contaminante. Estas medidas de retirada de contaminantes do ambiente são denominadas remediação.

A remediação ambiental pode ser aplicada a substâncias nocivas como pesticidas e metais pesados, mas, em sua grande maioria, a remediação é utilizada em casos de contaminação com petróleo e seus derivados. Diversas técnicas de remediação ambiental estão disponíveis atualmente para remediação de solo, água ou ambos. Estas técnicas estão baseadas em princípios físicos, como a retirada do contaminante através de sucção ou escavação; princípios químicos, como oxidação do contaminante transformando-o em um produto menos tóxico; e princípios

biológicos, através da modificação do contaminante por intermédio de ação metabólica de seres vivos (KHAN; HUSAIN; HEJAZI, 2004).

Os meios biológicos de remediação são conhecidos como biorremediação. Esse método utiliza a capacidade dos seres vivos de degradar contaminantes (GENOVESE et al., 2008) transformando-os em produtos de menor toxicidade, ou eliminando-os totalmente do ambiente. Este tipo de remediação vem ganhando cada vez mais espaço entre as técnicas de remediação ambiental. Por não utilizar produtos químicos nem recursos de maquinário e tecnologias que requerem altos investimentos, torna-se uma alternativa viável e vantajosa para o tratamento de locais contaminados (VIDALI, 2001). Em contrapartida, este método é bastante demorado comparado a outros métodos físicos e químicos, e, dependendo da concentração, os seres vivos se tornam incapazes de catabolizar o contaminante. Para um melhor resultado, a utilização de diferentes técnicas é frequente. A biorremediação, utilizada por último, consegue diminuir a concentração do contaminante a níveis dentro do limite tolerável (KHAN; HUSAIN; HEJAZI, 2004).

A biodegradação de BTEX é conhecida desde 1908 quando pela primeira vez Stormer observou a capacidade de crescimento do *Bacillus hexabovorum* em meio de cultura contendo tolueno e xilenos (MAZZEO et al., 2010). Posteriormente, foram descobertas muitas bactérias, de diversos locais, que também apresentavam a capacidade de degradação de BTEX. Já foi constatada a presença destas bactérias tanto na parte superficial de solos contaminados (HENDRICKX et al., 2006) quanto no subsolo (HERRMANN et al., 2008) e em águas subterrâneas (CAVALCA; DELL'AMICO; ANDREONI, 2004). Entre os gêneros bacterianos conhecidos por metabolizar BTEX, o gênero *Pseudomonas* é o de maior representatividade. Este gênero é conhecido por utilizar BTEX como única fonte de carbono, processando estas moléculas por respiração e transformando-as em dióxido de carbono e água (BYRNE; KUKOR; OLSEN, 1995; JOHNSON; OLSEN, 1995). Outros três gêneros já estudados e que possuem a capacidade de degradação de hidrocarbonetos aromáticos são *Comamonas* (TERAMOTO et al., 1999), *Xhantobacter* (ZHOU et al., 1999) e *Burkholderia* (SHIELDS et al., 1995). A capacidade de degradação de BTEX dessas bactérias foi comprovada por estudos das bactérias isoladas em cultura pura.

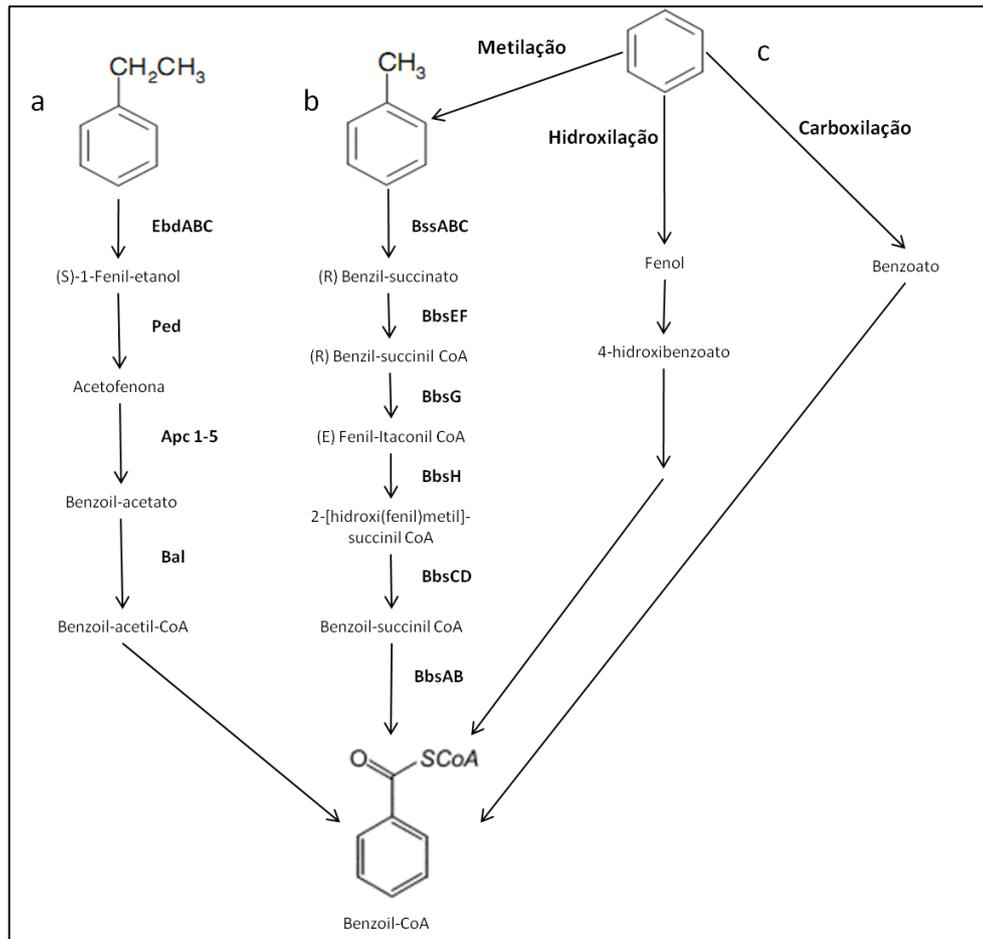
No ambiente, geralmente são encontrados vários gêneros bacterianos presentes em locais contaminados. Cavalca e colaboradores, além do gênero *Pseudomonas*, encontraram também os gêneros *Mycobacterium*, *Azoarcus* e *Bradyrhizobium*

(CAVALCA; DELL'AMICO; ANDREONI, 2004). Os gêneros *Desulfomicrobium*, *Acetobacterium*, *Desulfovibrio*, *Espirochaeta*, *Desulfocapsa* e *Acetobater* foram identificados em experimentos relacionados à contaminação com benzeno (HERRMANN et al., 2008). Amplificações genômicas utilizando iniciadores conservados para o gene SSU rRNA revelaram sequências que quando comparadas aos bancos de dados compartilham pouca identidade com sequências lá depositadas. Isso aponta uma diversidade microbiana desconhecida com potencial de degradação de compostos aromáticos.

Nesses trabalhos, o que chama a atenção é que a maioria dos gêneros identificados não são conhecidos por degradar compostos aromáticos, mas eles frequentemente aparecem em locais contaminados juntamente com gêneros bacterianos que tem capacidade de degradação. Na literatura, existem relatos de que essa diversidade de micro-organismos em locais contaminados com BTEX, e até mesmo outros hidrocarbonetos aromáticos, é reflexo de um consórcio microbiano que se estabelece e promove a degradação (ALFREIDER; VOGHT, 2007; ANDREOZZI et al., 2006; GENOVESE et al., 2008). Em um consórcio microbiano, uma dinâmica metabólica é estabelecida entre diferentes micro-organismos. A fonte de carbono de um organismo constituinte do consórcio pode ser o produto de outro, o que aumenta as chances de sucesso no caso de uma remediação e pode levar a elevados índices de degradação do contaminante (GENOVESE et al., 2008).

Para o BTEX, a biodegradação pode ocorrer aeróbia ou anaerobiamente. Quando o ambiente é anóxico, o metabolismo microbiano é anaeróbio e a degradação de BTEX ocorre pela redução de sulfatos e nitratos presentes no solo (DO et al., 2008). Os hidrocarbonetos aromáticos são modificados estruturalmente em benzoil-CoA e então degradados (WEELINK; EEKERT, 2010). Essa é uma degradação mais lenta e menos eficaz em comparação à degradação aeróbia, mas não menos importante, uma vez que no solo, o BTEX pode penetrar até grandes profundidades e alcançar a zona saturada com baixa ou nenhuma concentração de oxigênio. A **Figura 3** representa exemplos de degradação anaeróbia que ocorrem principalmente em grandes profundidades dos solos e zonas saturadas.

**Figura 3 – Vias de degradação anaeróbia de BTEX**



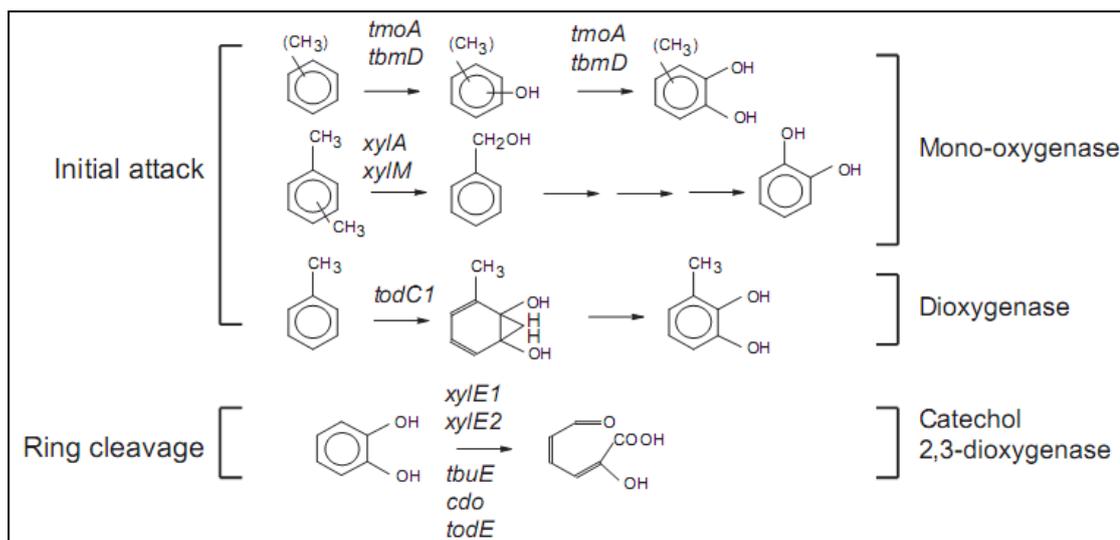
**a)** Degradação de etilbenzeno: *EbdABC*, etilbenzeno desidrogenase; *Ped*, (S)-1-fenil-etanol desidrogenase, *Apc1-5*, acetofenona carboxilase, *Bal*, benzoil-acetato-CoA ligase (KÜHNER et al., 2005). **b)** Degradação anaeróbia de tolueno: *BssABC*, benzilsuccinato sintase; *BbsEF*, succinil-CoA(R)-benzilsuccinato CoA transferase; *BbsG*, (R)Benzil-succinil CoA-desidrogenase; *Bbsh*, Fenil-itaconil-CoA hidratase; *BbsCD*, 2[hidroxi(fenil)metil]succinil-CoA desidrogenase; *BbsAB*, benzoil-succinil-CoA tiolase (KUBE et al., 2004). **c)** Três possíveis vias de degradação de benzeno. Por metilação, o benzeno é transformado em tolueno e segue na via de degradação. A hidroxilação transforma o benzeno em fenol e segue na via de degradação de fenol. Pela carboxilação, o benzeno se transforma em benzoato e, ao final, em benzoil-CoA

Fonte: (WEELINK; EEKERT, 2010).

A degradação das três formas de xilenos não está ainda bem elucidada, mas existem evidências de que a degradação seja muito parecida com a cascata de degradação de tolueno. A ativação de xilenos é feita pela adição de fumarato formando metil-benzil-succinato antes de prosseguir por essa cascata de degradação (FOGHT, 2008; KRIEGER et al., 1999; WEELINK; EEKERT, 2010).

As vias de degradação aeróbias de BTEX são vias bastante eficazes e mais velozes, utilizando o oxigênio comoceptor final de elétrons. Essa via possui três enzimas principais que modificam a estrutura do anel aromático (**Figura 4**).

**Figura 4** – Representação da degradação aeróbia de BTEX



A figura representa os passos iniciais de degradação de substâncias monoaromáticas. Os genes *tmoA*, *tbmD*, *XylA*, *XylM*, *todC1*, *xylE1*, *xylE2*, *tbuE*, *cdo* e *todE* codificam para monooxigenases, dioxigenases e catecol 2,3-dioxigenase. Essas três enzimas são indicadores de degradação de BTEX por metabolismo microbiano

Fonte: (HENDRICKX et al., 2006).

A biorremediação vem se tornando uma opção cada vez mais viável no tratamento de áreas contaminadas. Através do estudo da composição microbiana dessas áreas, consórcios puderam ser elucidados assim como a dinâmica de degradação desses consórcios. Evidências ainda mostram que organismos totalmente desconhecidos podem ter papel importante no processo de remediação ambiental, indicando um grande potencial a ser explorado. Atenção especial deve ser empregada principalmente em áreas com histórico de contaminação, onde, por uma pressão ambiental ocasionada pela ação antrópica, micro-organismos com metabolismos especializados podem ter sido selecionados e podem revelar novas vias de degradação ou até mesmos servir como agentes biorremediadores.

## 1.6 Cubatão

O município de Cubatão (latitude 23° 50 ' e 23 ° 55 ' ; longitude 46 ° 30 ' a oeste do meridiano de Greenwich) está localizado a 57 quilômetros do centro de São Paulo. A área onde se situa o município está localizada no complexo da Serra do Mar na região de transição entre o planalto paulista e a baixada santista. O clima é tropical úmido, mas com ocorrências de microclimas formados pelas variações do relevo (AUGUSTO FILHO et al., 1988; TORRES; BRAGA JR; BORGES, 2002). As escarpas

presentes são responsáveis pelos índices pluviométricos anuais que variam de 2.500 mm nas partes mais baixas chegando a 4.000 mm nas partes mais altas da encosta (IPT, 1985). Segundo a CETESB, a umidade relativa do ar varia de 70% a 90%.

Com relação à cobertura vegetal, a região de Cubatão se encontra dentro do complexo climático de Mata Atlântica, caracterizado por formações florestais definidas como ombrófila densa, ombrófila mista, estacional semidecidual, estacional decidual e ombrófila aberta, além da presença de manguezais e campos de altitude. Essa região é considerada uma das regiões mais ricas em biodiversidade do mundo. O domínio tem 1.300.000 km<sup>2</sup> de extensão, que são distribuídos quase em sua totalidade em uma faixa litorânea voltada ao Oceano Atlântico, estendendo-se do sul ao nordeste do país. Apenas 7% de sua extensão está conservada, fato que pode ser atribuído à ocupação humana. Aproximadamente 120 milhões de pessoas habitam o complexo da Mata Atlântica (MMA, 2013; WWF, 2013). A presença de pessoas não é a única causa da degradação do bioma. A região é intensamente urbanizada e inclui grandes cidades do Brasil, como São Paulo e Rio de Janeiro. Grandes polos industriais também se localizam na região, utilizando-se de recursos hídricos, pluviais e territoriais. Na região são depositados todos os rejeitos de produção, principal motivo da degradação do bioma.

O município de Cubatão é conhecido por ser o principal polo industrial do Brasil e um dos maiores da América Latina. Sua industrialização ocorreu no início do século XX com o desenvolvimento de três empresas pioneiras. Uma do ramo de couros, outra de produtos químicos e a última do ramo de papel. Foi criada também uma usina hidrelétrica que garantia o aporte de energia na região (FERREIRA; TORRES; BORGES, 2008).

Em 1930 houve incentivos para a instalação de indústrias de base no Brasil e em 1948, com o primeiro plano econômico integrado do país, que visava saúde, alimentação, transporte e energia (plano SALTE), o grande desenvolvimento industrial de Cubatão ocorreu. A primeira grande empresa atraída pelo plano econômico a se instalar na região foi a Refinaria Presidente Bernardes, em 1953, época do surgimento do monopólio do petróleo e da fundação da Petrobrás. Esta empresa foi o chamariz para que outras viessem se estabelecer em Cubatão, e entre 1953 e 1997 foram instaladas 23 grandes empresas ali. As empresas instaladas em Cubatão, em sua maioria, são indústrias químicas voltadas ao refinamento e processamento de petróleo, produção de fertilizantes, químicos industriais e siderurgia. Estas empresas

encontraram em Cubatão uma perfeita ligação entre aporte de matérias-primas e distribuição de seus produtos. Estão localizadas perto do porto de Santos, usufruem de acesso a estradas de ferro e proximidade com a capital do estado (FERREIRA; TORRES; BORGES, 2008).

A grande concentração de indústrias no local, a manipulação de compostos químicos com grande potencial poluente e a baixa ou nenhuma preocupação ambiental, levaram a cidade de Cubatão a ser chamada de Vale da Morte na década de 1980. Nesse período, a ONU chegou a classificar Cubatão como a pior cidade do mundo para se viver. Moradores intoxicados pelos rejeitos industriais que eram lançados em água, solo e ar, sem tratamento, e recém-nascidos apresentando casos de anencefalia faziam parte do cenário da cidade na época. Entre os poluentes que contaminavam a cidade, estavam metais particulados (363 mil toneladas por ano depositadas no meio ambiente), hidrocarbonetos e óxidos de enxofre e amônia, que causavam chuva ácida e degradavam toda a cobertura vegetal que se encontrava nas encostas (OLIVETTE, 2008).

Esforços realizados pelos órgãos governamentais do estado e do município, além das empresas da região, fizeram com que a poluição de Cubatão fosse diminuída por meio do controle de emissão de poluentes. Esse programa alcançou taxas de despoluição da ordem de 98,9% em redução de material particulado, 95,79% em emissão de hidrocarbonetos e redução significativa de óxidos e fluoretos (OLIVETTE, 2008).

Os esforços na redução da poluição em Cubatão trouxeram grandes melhorias à cidade, ambiente e população, o que valeu o título de cidade símbolo da recuperação ambiental, dado pela ONU durante a ECO 92 na cidade do Rio de Janeiro (CNO, 2012).

Realmente existe uma queda real da taxa de contaminação da região de Cubatão atualmente, mas o acúmulo de 30 anos de poluição continua atingindo o município. Metais pesados ainda são encontrados no ambiente fazendo parte de águas e sedimentos marinhos e pluviais. O resultado é o acúmulo destas substâncias em organismos vivos como peixes, crustáceos e moluscos consumidos pela população (CETESB, 2001). De acordo com o relatório de áreas contaminadas e reabilitadas do estado de São Paulo, muitas áreas do município de Cubatão ainda se apresentam contaminadas com hidrocarbonetos aromáticos. Entre elas incluem-se áreas consideradas residenciais além de áreas industriais (CETESB, 2011). A Tabela 4 mostra diferentes áreas contaminadas da região de Cubatão.

**Tabela 4** – Relação de áreas contaminadas de Cubatão e seus respectivos contaminantes

<b><i>Cubatão - Local</i></b>	<b><i>Resíduo Industrial / Substância tóxica no solo</i></b>
<i>Centro</i>	Hidrocarbonetos aromáticos.
<i>Vila. Couto</i>	Metais pesados, resíduos organoclorados, aromáticos e halogenados.
<i>Piaçaguera</i>	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, fenóis, metais pesados, compostos nitrogenados, fluoretos, fósforo, sulfatos, cloreto de vinila, 1,2 dicloroetano.
<i>Industrial</i>	Resíduos organoclorados, solventes halogenados, fluoretos, fósforo, sulfatos e mercúrio.
<i>Ponte Preta</i>	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, fenóis, metais pesados, policloretos de bifenila, derivados de petróleo.

Fonte: Modificado de Guimarães (2005).

A região de Cubatão, de acordo com seu histórico, é uma região de destaque dentro do problema de contaminações ambientais. Sua história industrial e sua localização fazem com que o local seja único no mundo. A pressão ambiental exercida pelos contaminantes durante aproximadamente 30 anos pode ter resultado em modificações no seres vivos, adaptados aos contaminantes.

Os procariotos dentro deste panorama, merecem atenção especial. Variações bióticas e abióticas no ambiente podem ter feito com que os procariotos fossem selecionados de modo a utilizar estes contaminantes em seus metabolismos. Um estudo microbiano realizado por meio de técnicas de identificação e metagenômica pode trazer maior conhecimento sobre a comunidade microbiana desses locais. Este conhecimento pode gerar atualizações nos métodos de biorremediação e até mesmo o desenvolvimento de novas técnicas, possibilidades que justificam o investimento em pesquisas que podem trazer benefícios ao ambiente e às populações afetadas.

## 2 CONCLUSÕES

A abordagem metagenômica de sequenciamento direto de DNA ambiental dos solos selecionados se mostrou uma boa ferramenta para acesso às informações *in situ* pretendidas neste trabalho. Conseguimos identificar as comunidades procarióticas dos três locais analisados encontrando diferenças entre elas. Pudemos relacionar grupos de micro-organismos com as características dos locais. Exemplos disso foram a grande diversidade de micro-organismos com potencial de degradação de hidrocarbonetos aromáticos no local contaminado e a presença de representantes da família Enterobacteriaceae no local Cotia-Pará, com provável contaminação por rejeitos residenciais. Com estas comparações pudemos entender melhor a composição procariótica da região e identificar a diversidade e abundância de uma comunidade procariótica de solo após evento de contaminação. O uso da tecnologia de pirosequenciamento certamente nos forneceu uma quantidade de dados muito superior comparado ao método clássico de sequenciamento. Isto refletiu na profundidade das análises, possibilitando a partir de um único sequenciamento construir um panorama mais completo, unindo resultados de identificação taxonômica e metabólica.

As diferenças entre os locais analisados também foram observadas sob o ponto de vista metabólico. Apesar da identificação de genes e domínios de degradação de anéis aromáticos em todos os locais analisados, o método utilizado neste estudo foi refinado o bastante para diferenciar qualitativamente e quantitativamente os diferentes locais. Para o local contaminado, foi encontrada maior diversidade de genes e domínios conservados de degradação, o que reflete uma comunidade microbiana mais adaptada à contaminação por anéis aromáticos e com potencial de degradação, que pode estar desempenhando um papel de biorremediação intrínseca no local. Não apenas os genes foram identificados, mas também um perfil taxonômico, sugerindo um consórcio microbiano de degradação de hidrocarbonetos aromáticos para os locais estudados e principalmente para o local contaminado.

Este trabalho aprofunda um pouco mais o conhecimento de comunidades procarióticas ambientais, área de estudo que apresenta grande potencial biotecnológico e que carece de maior quantidade de estudos. Mais precisamente, aprofunda o conhecimento sobre procariotos de áreas contaminadas com BTEX. Apesar de já serem conhecidos exemplares capazes de degradar essas substâncias

aromáticas, pouco se conhece sobre a dinâmica de uma comunidade *in situ* de locais contaminados. Este conhecimento pode trazer adaptações ao modo de aplicação de biorremediações, assim como desenvolver novos métodos.

Um dos aspectos mais importantes deste trabalho foi o local estudado. Cubatão é um município bastante afetado pela poluição que influencia o meio ambiente e os seres vivos que neles vivem. Os trinta anos de pressão ambiental causada por contaminantes fazem da região única no mundo, principalmente sob o aspecto da biorremediação. Apesar de toda esta importância, poucos trabalhos na região foram desenvolvidos, e este foi pioneiro ao utilizar a metagenômica para identificar e comparar micro-organismos da região, focando identificar potenciais biorremediadores e sugerindo um panorama metabólico e estrutural das comunidades de solo ali presentes.

## REFERÊNCIAS\*

- ACOSTA-GONZALEZ, A.; ROSSELLO-MORA, R.; MARQUES, S. Characterization of the anaerobic microbial community in oil-polluted subtidal sediments: aromatic biodegradation potential after the Prestige oil spill. **Environ. Microbiol.**, v. 15, n. 1, p. 77-92, Jan 2013.
- AGTEREN, M. H. V.; KEUNING, S.; JANSSEN, D. B. **Handbook on biodegradation and biological treatment of hazardous organic compounds**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1998.
- AHMER, B. M.; TRAN, M.; HEFFRON, F. The virulence plasmid of *Salmonella typhimurium* is self-transmissible. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 4, p. 1364-1368, Feb 1999.
- ALFREIDER, A.; VOGHT, C. Bacterial diversity and aerobic biodegradation potential in a BTEX-contaminated aquifer. **Water Air Soil Pollut.**, v. 183, p. 415-426, 2007.
- ALFREIDER, A.; VOGT, C. Genetic evidence for bacterial chemolithoautotrophy based on the reductive tricarboxylic acid cycle in groundwater systems. **Microbes Environ.**, v. 27, n. 2, p. 209-214, 2012.
- ALTSCHUL, 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.**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, Sep 1997.
- AN, Y. J. Toxicity of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) mixtures to *Sorghum bicolor* and *Cucumis sativus*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 72, n. 5, p. 1006-1011, May 2004.
- ANDREOZZI, R.; CESARO, R.; MAROTTA, R.; PIROZZI, F. Evaluation of biodegradation kinetic constants for aromatic compounds by means of aerobic batch experiments. **Chemosphere**, v. 62, n. 9, p. 1431-1436, Mar 2006.
- APWEILER, R.; BAIROCH, A.; WU, C. H.; BARKER, W. C.; BOECKMANN, B.; FERRO, S.; GASTEIGER, E.; HUANG, H.; LOPEZ, R.; MAGRANE, M.; MARTIN, M. J.; NATALE, D. A.; O'DONOVAN, C.; REDASCHI, N.; YEH, L. S. UniProt: the Universal Protein knowledgebase. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, p. D115-119, Jan 2004.
- ARENSKOTTER, M.; BROKER, D.; STEINBUCHER, A. Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 6, p. 3195-3204, Jun 2004.
- AUGUSTO FILHO, O.; MACEDO, E. S.; CERRI, L. E. S.; OGURA, A. T. Carta Geotécnica da Serra do Mar nas Folhas de Santos e Riacho Grande. **Seminário de integração técnica sobre a poluição da Serra do Mar**, p. 69-75, 1988.
- BALDWIN, B. R.; NAKATSU, C. H.; NEBE, J.; WICKHAM, G. S.; PARKS, C.; NIES, L. Enumeration of aromatic oxygenase genes to evaluate biodegradation during multi-phase extraction at a gasoline-contaminated site. **J. Hazard. Mater.**, v. 163, n. 2-3, p. 524-530, Apr 30 2009.
- BERG, G.; EBERL, L.; HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environ. Microbiol.**, v. 7, n. 11, p. 1673-1685, Nov 2005.
- BODDEY, H. L.; HUNGRIA, M. Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. **Biol. Fertil. Soils**, n. 25, p. 407-405, 1997.

\*De acordo com:

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

BOTTON, S.; VAN HARMELEN, M.; BRASTER, M.; PARSONS, J. R.; ROLING, W. F. Dominance of Geobacteraceae in BTX-degrading enrichments from an iron-reducing aquifer. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 62, n. 1, p. 118-130, Oct 2007.

BRUCE, T.; MARTINEZ, I. B.; MAIA NETO, O.; VICENTE, A. C.; KRUGER, R. H.; THOMPSON, F. L. Bacterial community diversity in the Brazilian Atlantic forest soils. **Microb. Ecol.**, v. 60, n. 4, p. 840-849, Nov 2010.

BYRNE, A. M.; KUKOR, J. J.; OLSEN, R. H. Sequence analysis of the gene cluster encoding toluene-3-monooxygenase from *Pseudomonas pickettii* PKO1. **Gene**, v. 154, n. 1, p. 65-70, Feb 27 1995.

CARBAJOSA, G.; TRIGO, A.; VALENCIA, A.; CASES, I. Bionemo: molecular information on biodegradation metabolism. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, p. 598-602, Jan 2009.

CARBONNELLE, E.; GROHS, P.; JACQUIER, H.; DAY, N.; TENZA, S.; DEWAILLY, A.; VISSOUARN, O.; ROTTMAN, M.; HERRMANN, J. L.; PODGLAJEN, I.; RASKINE, L. Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. **Journal of microbiological methods**, v. 89, n. 2, p. 133-136, May 2012.

CAVALCA, L.; DELL'AMICO, E.; ANDREONI, V. Intrinsic bioremediability of an aromatic hydrocarbon-polluted groundwater: diversity of bacterial population and toluene monooxygenase genes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 64, n. 4, p. 576-587, May 2004.

CHAMKHA, M.; TRABELSI, Y.; MNIF, S.; SAYADI, S. Isolation and characterization of *Klebsiella oxytoca* strain degrading crude oil from a Tunisian off-shore oil field. **J. Basic Microbiol.**, v. 51, n. 6, p. 580-589, Dec 2011.

CHRISTENSEN, J. S.; ELTON, J. Soil and Groundwater pollution from BTEX. 1996. Disponível em: <<http://www.webapps.cee.vt.edu/ewr/environmental/teach/gwprimer/btex/btex.html>>. Acesso em: 07 fev. 2013.

COLE, J. R.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A. S.; MCGARRELL, D. M.; BANDELA, A. M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Res.**, v. 35, p. 169-172, Jan 2007.

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. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, p. 141-145, Jan 2009.

Comitê Nacional de Organização Rio + 20. Cubatão mostra como é possível aliar crescimento com sustentabilidade. 2012. Disponível em: <[http://www.rio20.gov.br/sala\\_de\\_imprensa/noticias-nacionais1/cubatao-mostra-como-e-possivel-aliar-crescimento-com-sustentabilidade.html](http://www.rio20.gov.br/sala_de_imprensa/noticias-nacionais1/cubatao-mostra-como-e-possivel-aliar-crescimento-com-sustentabilidade.html)>. Acesso em: 14/01/2013.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Sistema estuarino de Santos e São Vicente. AMBIENTE, S. D. E. D. M. Disponível em: <[www.acpo.org.br](http://www.acpo.org.br)>. PROCOP - Programa de controle de poluição 2001.

\_\_\_\_\_. **Áreas contaminadas e reabilitadas no estado de São Paulo**. CETESB. Disponível em: <[www.cetesb.sp.gov.br](http://www.cetesb.sp.gov.br)>. 2011

COSTA, C.; DE PASQUALE, R.; SILVARI, V.; BARBARO, M.; CATANIA, S. In vitro evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin. **Toxicology in Vitro**. p. 324-331 2006.

COURTOIS, S.; CAPPELLANO, C. M.; BALL, M.; FRANCOU, F. X.; NORMAND, P.; HELYNCK, G.; MARTINEZ, A.; KOLVEK, S. J.; HOPKE, J.; OSBURNE, M. S.; AUGUST, P. R.; NALIN, R.; GUERINEAU, M.; JEANNIN, P.; SIMONET, P.; PERNODET, J. L. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 1, p. 49-55, Jan 2003.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 470-478, Jun 2005.

DEDYSH, S. N.; KULICHEVSKAYA, I. S.; SERKEBAEVA, Y. M.; MITYAEVA, M. A.; SOROKIN, V. V.; SUZINA, N. E.; RIJPSTRA, W. I.; DAMSTE, J. S. *Bryocella elongata* gen. nov., sp. nov., a member of subdivision 1 of the Acidobacteria isolated from a methanotrophic enrichment culture, and emended description of *Edaphobacter aggregans* Koch et al. 2008. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 62, n. 3, p. 654-664, Mar 2012.

DELOGER, M.; EL KAROUI, M.; PETIT, M. A. A genomic distance based on MUM indicates discontinuity between most bacterial species and genera. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 1, p. 91-99, Jan 2009.

DENARIE, J.; DEBELLE, F.; ROSENBERG, C. Signaling and host range variation in nodulation. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 46, p. 497-531, 1992.

DO, J.; LIU, X.; HU, Z.; DENG, D. Anaerobic BTEX biodegradation linked to nitrate and sulfate reduction. **Journal of Hazardous Materials**. n. 151, p. 720-729, 2008.

DONG, D.; YAN, A.; LIU, H.; ZHANG, X.; XU, Y. Removal of humic substances from soil DNA using aluminium sulfate. **J. Microbiol. Methods.**, v. 66, n. 2, p. 217-222, Aug 2006.

Energy Information Administration. Top World Oil Consumers, 2011. Disponível em: <<http://www.eia.gov/countries/index.cfm?topL=con>>, 2013. Acesso em: 13/03.

EL AZHARI, N.; BRU, D.; MARTIN-LAURENT, F. Estimation of the density of the protocatechuate-degrading bacterial community in soil by real-time PCR. **European Journal of Soil Science**, v. 59, n. 4, p. 665-673, 2008.

ERIKSSON, M.; SODERSTEN, E.; YU, Z.; DALHAMMAR, G.; MOHN, W. W. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from northern soils. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 1, p. 275-284, Jan 2003.

FERREIRA, C. C.; TORRES, F. R.; BORGES, W. R. **Cubatão Caminhos da História**. Cubatão: Edição do Autor, 2008.

FINN, R. D.; CLEMENTS, J.; EDDY, S. R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. **Nucleic acids research**, v. 39, n. Web Server issue, p. 29-37, Jul 2011.

FINOTTI, A. R.; CAICEDO, N. O. L.; RODRIGUEZ, M. T. R. Contaminações Subterrâneas com Combustíveis Derivados de Petróleo: Toxicidade e a Legislação Brasileira. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 6, n. 2, p. 29-46, 2001.

FISCHER, A.; HERKLOTZ, I.; HERRMANN, S.; THULLNER, M.; WEELINK, S. A.; STAMS, A. J.; SCHLOMANN, M.; RICHNOW, H. H.; VOGT, C. Combined carbon and hydrogen isotope fractionation investigations for elucidating benzene biodegradation pathways. **Environ. Sci. Technol.**, v. 42, n. 12, p. 4356-4363, Jun 15 2008.

FLICEK, P.; AMODE, M. R.; BARRELL, D.; BEAL, K.; BRENT, S.; CARVALHO-SILVA, D.; CLAPHAM, P.; COATES, G.; FAIRLEY, S.; FITZGERALD, S.; GIL, L.; GORDON, L.; HENDRIX, M.; HOURLIER, T.; JOHNSON, N.; KAHARI, A. K.; KEEFE, D.; KEENAN, S.; KINSELLA, R.; KOMOROWSKA, M.; KOSCIELNY, G.; KULESHA, E.; LARSSON, P.; LONGDEN, I.; MCLAREN, W.; MUFFATO, M.; OVERDUIN, B.; PIGNATELLI, M.; PRITCHARD, B.; RIAT, H. S.; RITCHIE, G. R.; RUFFIER, M.; SCHUSTER, M.; SOBRAL, D.; TANG, Y. A.; TAYLOR, K.; TREVANION, S.; VANDROVCOVA, J.; WHITE, S.; WILSON, M.; WILDER, S. P.; AKEN, B. L.; BIRNEY, E.; CUNNINGHAM, F.; DUNHAM, I.; DURBIN, R.; FERNANDEZ-SUAREZ, X. M.; HARROW, J.; HERRERO, J.; HUBBARD, T. J.; PARKER, A.; PROCTOR, G.; SPUDICH, G.; VOGEL, J.; YATES, A.; ZADISSA, A.; SEARLE, S. M. Ensembl 2012. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, p. D84-90, Jan 2012.

FOGHT, J. Anaerobic Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons: Pathways and Prospects. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**: 93-120 p. 2008.

FOX, G. E.; WISOTZKEY, J. D.; JURTSCHUK, P., JR. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **International journal of systematic bacteriology**, v. 42, n. 1, p. 166-170, Jan 1992.

FRANKLIN, F. C.; BAGDASARIAN, M.; BAGDASARIAN, M. M.; TIMMIS, K. N. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 78, n. 12, p. 7458-7462, Dec 1981.

FURUKAWA, K.; MIYAZAKI, T. Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. **J. Bacteriol.**, v. 166, n. 2, p. 392-398, May 1986.

GEER, L. Y.; MARCHLER-BAUER, A.; GEER, R. C.; HAN, L.; HE, J.; HE, S.; LIU, C.; SHI, W.; BRYANT, S. H. The NCBI BioSystems database. **Nucleic Acids Res.**, v. 38, p. D492-496, Jan 2010.

GENOVESE, M.; DENARO, R.; CAPPELLO, S.; DI MARCO, G.; LA SPADA, G.; GIULIANO, L.; GENOVESE, L.; YAKIMOV, M. M. Bioremediation of benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes-contaminated soil: a biopile pilot experiment. **J. Appl. Microbiol.**, v. 105, n. 5, p. 1694-1702, Nov 2008.

GÉRIN, M.; SIEMIATYCKI, J.; DÉSY, M.; KREWSKI, D. Associations between several sites of cancer and occupational exposure to benzene, toluene, xylene, and styrene: Results of a case-control study in Montreal. **American Journal of Industrial Medicine**: 144-156 p. 1998.

GERISCHER, U. Specific and global regulation of genes associated with the degradation of aromatic compounds in bacteria. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 4, n. 2, p. 111-121, Mar 2002.

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 733-739, Sep 2005.

GIBSON, D. T.; PARALES, R. E. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 11, n. 3, p. 236-243, Jun 2000.

GILL, S. R.; POP, M.; DEBOY, R. T.; ECKBURG, P. B.; TURNBAUGH, P. J.; SAMUEL, B. S.; GORDON, J. I.; RELMAN, D. A.; FRASER-LIGGETT, C. M.; NELSON, K. E. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. **Science**, v. 312, n. 5778, p. 1355-1359, Jun 2 2006.

GLYNN, M. K.; BOPP, C.; DEWITT, W.; DABNEY, P.; MOKHTAR, M.; ANGULO, F. J. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 infections in the United States. **N. Engl. J. Med.**, v. 338, n. 19, p. 1333-1338, May 7 1998.

GOMEZ-ALVAREZ, V.; TEAL, T. K.; SCHMIDT, T. M. Systematic artifacts in metagenomes from complex microbial communities. **ISME J.**, v. 3, n. 11, p. 1314-1317, Nov 2009.

GORDON, R. E.; MIHM, J. M. The type species of the genus *Nocardia*. **Journal of general microbiology**, v. 27, p. 1-10, Jan 1962.

GORIS, J.; KONSTANTINIDIS, K. T.; KLAPPENBACH, J. A.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; TIEDJE, J. M. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 57, n. 1, p. 81-91, Jan 2007.

GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The skin microbiome. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 9, n. 4, p. 244-253, Apr 2011.

GUIMARÃES, J. R. P. F. **Resíduos industriais na Baixada Santista**. Disponível em: <[http://www.acpo.org.br/biblioteca/08\\_residuos/residuos\\_bx\\_santista.pdf](http://www.acpo.org.br/biblioteca/08_residuos/residuos_bx_santista.pdf)>. ACPO 2005.

GUPTA, R. S.; GRIFFITHS, E. Critical issues in bacterial phylogeny. **Theoretical population biology**, v. 61, n. 4, p. 423-434, Jun 2002.

HAAS, B. J.; GEVERS, D.; EARL, A. M.; FELDGARDEN, M.; WARD, D. V.; GIANNOUKOS, G.; CIULLA, D.; TABBAA, D.; HIGHLANDER, S. K.; SODERGREN, E.; METHE, B.; DESANTIS, T. Z.; PETROSINO, J. F.; KNIGHT, R.; BIRREN, B. W. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. **Genome Res.**, v. 21, n. 3, p. 494-504, Mar 2011.

HENDRICKX, B.; JUNCA, H.; VOSAHLOVA, J.; LINDNER, A.; RUEGG, I.; BUCHELI-WITSCHER, M.; FABER, F.; EGLI, T.; MAU, M.; SCHLOMANN, M.; BRENNEROVA, M.; BRENNER, V.; PIEPER, D. H.; TOP, E. M.; DEJONGHE, W.; BASTIAENS, L.; SPRINGAEL, D. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. **J. Microbiol. Methods.**, v. 64, n. 2, p. 250-265, Feb 2006.

HERMAN, D. C.; INNIS, W. E.; MAYFIELD, C. I. Toxicity testing of aromatic hydrocarbons utilizing a measure of their impact on the membrane integrity of the green alga *Selenastrum capricornutum*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 47, n. 6, p. 874-881, Dec 1991.

HERRMANN, S.; KLEINSTEUBER, S.; NEU, T. R.; RICHNOW, H. H.; VOGT, C. Enrichment of anaerobic benzene-degrading microorganisms by in situ microcosms. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 63, n. 1, p. 94-106, Jan 2008.

HESS, M.; SCZYRBA, A.; EGAN, R.; KIM, T. W.; CHOKHAWALA, H.; SCHROTH, G.; LUO, S.; CLARK, D. S.; CHEN, F.; ZHANG, T.; MACKIE, R. I.; PENNACCHIO, L. A.; TRINGE, S. G.; VISEL, A.; WOYKE, T.; WANG, Z.; RUBIN, E. M. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. **Science**, v. 331, n. 6016, p. 463-467, Jan 28 2011.

HOLDEN, N.; PRITCHARD, L.; TOTH, I. Colonization outwith the colon: plants as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 33, n. 4, p. 689-703, Jul 2009.

HOLLOWELLA, G. P.; KUYKENDALL, L. D.; GILLETTEC, W. K.; HASHEMD, F. M.; HOUA, L.; TATEME, H. E.; DUTTA, S. K. Genetic transfer and expression of plasmid RP4::TOL in *Sinorhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n. 13, p. 1811-1819, 1999.

HUSON, D. H.; AUCH, A. F.; QI, J.; SCHUSTER, S. C. MEGAN analysis of metagenomic data. **Genome Res.**, v. 17, n. 3, p. 377-386, Mar 2007.

HUSSAIN, Y. A.; TEWFIK, M. S.; HANDI, Y. A. DEGRADATION OF CERTAIN AROMATIC COMPOUNDS BY RHIZOBIA. **Soil Biol. Biochem.**, v. 6, p. 377-381, 1974.

IPT. Elaboração de subsídios técnicos para um plano de emergência para a área de Cubatão. São Paulo: Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo 1985.

JANNASCH, H. W.; MOTT, M. J. Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. **Science**, v. 229, n. 4715, p. 717-725, Aug 23 1985.

JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 3, p. 1719-1728, Mar 2006.

JINDROVA, E.; CHOCOVA, M.; DEMNEROVA, K.; BRENNER, V. Bacterial aerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene. **Folia Microbiol. (Praha)**, v. 47, n. 2, p. 83-93, 2002.

JOHNSON, G. R.; OLSEN, R. H. Nucleotide sequence analysis of genes encoding a toluene/benzene-2-monooxygenase from *Pseudomonas* sp. strain JS150. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 9, p. 3336-3346, Sep 1995.

KAMPFER, P.; GLAESER, S. P. Prokaryotic taxonomy in the sequencing era--the polyphasic approach revisited. **Environmental microbiology**, v. 14, n. 2, p. 291-317, Feb 2012.

KANAGAWA, T. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). **J. Biosci. Bioeng.**, v. 96, n. 4, p. 317-323, 2003.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, n. 1, p. 27-30, Jan 1 2000.

KAO, C. M.; CHEN, C. Y.; CHEN, S. C.; CHIEN, H. Y.; CHEN, Y. L. Application of in situ biosparging to remediate a petroleum-hydrocarbon spill site: field and microbial evaluation. **Chemosphere**, v. 70, n. 8, p. 1492-1499, Feb 2008.

KENT, W. J. BLAT--the BLAST-like alignment tool. **Genome Res.**, v. 12, n. 4, p. 656-664, Apr 2002.

KHAN, F. I.; HUSAIN, T.; HEJAZI, R. An overview and analysis of site remediation technologies. **J. Environ. Manage.**, v. 71, n. 2, p. 95-122, Jun 2004.

KHOT, P. D.; COUTURIER, M. R.; WILSON, A.; CROFT, A.; FISHER, M. A. Optimization of MALDI-TOF Mass Spectrometry Analysis for Bacterial Identification. **Journal of clinical microbiology**, Sep 19 2012.

KIELAK, A.; PIJL, A. S.; VAN VEEN, J. A.; KOWALCHUK, G. A. Phylogenetic diversity of Acidobacteria in a former agricultural soil. **ISME J.**, v. 3, n. 3, p. 378-382, Mar 2009.

KNOTHE, H.; SHAH, P.; KRCMERY, V.; ANTAL, M.; MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, n. 6, p. 315-317, Nov-Dec 1983.

KOCH, I. H.; GICH, F.; DUNFIELD, P. F.; OVERMANN, J. *Edaphobacter modestus* gen. nov., sp. nov., and *Edaphobacter aggregans* sp. nov., acidobacteria isolated from alpine and forest soils. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 58, n. 5, p. 1114-1122, May 2008.

KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 5, p. 504-509, Oct 2007.

KRIEGER, C.; BELLER, H.; REINHARD, M.; SPORMANN, M. Initial Reactions in Anaerobic Oxidation of m-Xylene by the Denitrifying Bacterium *Azoarcus* sp. Strain T. **Journal of Bacteriology**. 181: 6403-6410 p. 1999.

KUBE, M.; HEIDER, J.; J, A.; HUFNAGEL, P.; KÜHNER, S.; BECK, A.; REINHARDT, R.; RABUS, R. Genes involved in the anaerobic degradation of toluene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. **Arch. Microbiol.** 182-194 p. 2004.

KÜHNER, S.; WÖHLBRAND, L.; FRITZ, I.; WRUCK, W.; HULTSCHIG, C.; HUFNAGEL, P.; KUBE, M.; REINHARD, R.; RABUS, R. Substrate-Dependent Regulation of Anaerobic Degradation Pathways for Toluene and Ethylbenzene in a Denitrifying Bacterium, Strain EbN1. **Journal of Bacteriology**. 187: 1493-1503 p. 2005.

KYRPIDES, N. C. Genomes OnLine Database (GOLD 1.0): a monitor of complete and ongoing genome projects world-wide. **Bioinformatics**, v. 15, n. 9, p. 773-774, Sep 1999.

LAKAY, F. M.; BOTHA, A.; PRIOR, B. A. Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils. **J. Appl. Microbiol.**, v. 102, n. 1, p. 265-273, Jan 2007.

LARENTIS, M.; HOERMANN, K.; LUEDERS, T. Fine-scale degrader community profiling over an aerobic/anaerobic redox gradient in a toluene-contaminated aquifer. **Environmental Microbiology Reports**, p. 1-10, 2012.

LAY, J. O., JR. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. **Mass spectrometry reviews**, v. 20, n. 4, p. 172-194, Jul-Aug 2001.

LEE, S. H.; KA, J. O.; CHO, J. C. Members of the phylum Acidobacteria are dominant and metabolically active in rhizosphere soil. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 285, n. 2, p. 263-269, Aug 2008.

LI, H.; ZHANG, Q.; WANG, X. L.; MA, X. Y.; LIN, K. F.; LIU, Y. D.; GU, J. D.; LU, S. G.; SHI, L.; LU, Q.; SHEN, T. T. Biodegradation of benzene homologues in contaminated sediment of the East China Sea. **Bioresour. Technol.**, v. 124, p. 129-136, Nov 2012.

LIU, B.; GIBBONS, T.; GHODSI, M.; TREANGEN, T.; POP, M. Accurate and fast estimation of taxonomic profiles from metagenomic shotgun sequences. **BMC Genomics**, v. 12 Suppl 2, p. S4, 2011.

MACEDO, A. J.; TIMMIS, K. N.; ABRAHAM, W. R. Widespread capacity to metabolize polychlorinated biphenyls by diverse microbial communities in soils with no significant exposure to PCB contamination. **Environ. Microbiol.**, v. 9, n. 8, p. 1890-1897, Aug 2007.

MAIDEN, M. C.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEAVERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3140-3145, Mar 17 1998.

MANFREDI, R.; NANETTI, A.; FERRI, M.; CHIODO, F. Xanthomonas maltophilia: an emerging pathogen in patients with HIV disease. **Int. J. STD. AIDS.**, v. 9, n. 4, p. 201-207, Apr 1998.

MARCHETTI, A.; SCHRUTH, D. M.; DURKIN, C. A.; PARKER, M. S.; KODNER, R. B.; BERTHIAUME, C. T.; MORALES, R.; ALLEN, A. E.; ARMBRUST, E. V. Comparative metatranscriptomics identifies molecular bases for the physiological responses of phytoplankton to varying iron availability. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 109, n. 6, p. 317-325, Feb 7 2012.

MARMUR, J.; DOTY, P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. **Journal of molecular biology**, v. 5, p. 109-118, Jul 1962.

MAZZEO, D. E.; LEVY, C. E.; DE ANGELIS DDE, F.; MARIN-MORALES, M. A. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **Sci. Total Environ.**, v. 408, n. 20, p. 4334-4340, Sep 15 2010.

MCGRATH, K. C.; THOMAS-HALL, S. R.; CHENG, C. T.; LEO, L.; ALEXA, A.; SCHMIDT, S.; SCHENK, P. M. Isolation and analysis of mRNA from environmental microbial communities. **J. Microbiol. Methods**, v. 75, n. 2, p. 172-176, Oct 2008.

MEGADI, V. B.; TALLUR, P. N.; MULLA, S. I.; NINNEKAR, H. Z. Bacterial degradation of fungicide captan. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 58, n. 24, p. 12863-12868, Dec 22 2010.

MEYER, F.; PAARMANN, D.; D'SOUZA, M.; OLSON, R.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; PACZIAN, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS, R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R. A. The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 386, 2008.

MILLER, D. N. Evaluation of gel filtration resins for the removal of PCR-inhibitory substances from soils and sediments. **J. Microbiol. Methods.**, v. 44, n. 1, p. 49-58, Feb 1 2001.

Ministério do Meio Ambiente. Mata Atlântica. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>>, Acesso em: 15/02/2013.

MOORE, E. R.; MIHAYLOVA, S. A.; VANDAMME, P.; KRICHEVSKY, M. I.; DIJKSHOORN, L. Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons. **Research in microbiology**, v. 161, n. 6, p. 430-438, Jul-Aug 2010.

MORALES, S. E.; HOLBEN, W. E. Empirical testing of 16S rRNA gene PCR primer pairs reveals variance in target specificity and efficacy not suggested by in silico analysis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 9, p. 2677-2683, May 2009.

NASER, S. M.; THOMPSON, F. L.; HOSTE, B.; GEVERS, D.; DAWYNDT, P.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. **Microbiology**, v. 151, n. 7, p. 2141-2150, Jul 2005.

NAVARRO-NOYA, Y. E.; JAN-ROBLERO, J.; GONZALEZ-CHAVEZ MDEL, C.; HERNANDEZ-GAMA, R.; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, C. Bacterial communities associated with the rhizosphere of pioneer plants (*Bahia xylopoda* and *Viguiera linearis*) growing on heavy metals-contaminated soils. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 97, n. 4, p. 335-349, May 2010.

OLIVETTE, C. Programa de Controle de Poluição em Cubatão completa 25 anos. Disponível em: <[www.ambiente.sp.gov.br/acontece/noticias/programa-de-controle-de-poluicao-em-cubatao-completa-25-anos/](http://www.ambiente.sp.gov.br/acontece/noticias/programa-de-controle-de-poluicao-em-cubatao-completa-25-anos/)>, 2008. Acesso em: 13/01/2013.

PATTERSON, J. E.; HARDIN, T. C.; KELLY, C. A.; GARCIA, R. C.; JORGENSEN, J. H. Association of antibiotic utilization measures and control of multiple-drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 21, n. 7, p. 455-458, Jul 2000.

PAUL, E. A. Soil, microbiology and biochemistry. 3<sup>rd</sup> Edition. UK: Academic Press, 2007. 337.

PEREZ-PANTOJA, D.; DONOSO, R.; JUNCA, H.; GONZÁLEZ, B.; PIEPER, D. Phylogenomics of Aerobic Bacterial Degradation of Aromatics. In: TIMIS, K. N. (Ed.). **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**: Springer-Verlag GmbH, 2010.

PETROSINO, J. F.; HIGHLANDER, S.; LUNA, R. A.; GIBBS, R. A.; VERSALOVIC, J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. **Clin. Chem.**, v. 55, n. 5, p. 856-866, May 2009.

POLZ, M. F.; CAVANAUGH, C. M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 10, p. 3724-3730, Oct 1998.

PUNTA, M.; COGGILL, P. C.; EBERHARDT, R. Y.; MISTRY, J.; TATE, J.; BOURSNELL, C.; PANG, N.; FORSLUND, K.; CERIC, G.; CLEMENTS, J.; HEGER, A.; HOLM, L.; SONNHAMMER, E. L.; EDDY, S. R.; BATEMAN, A.; FINN, R. D. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, p. 290-301, Jan 2012.

QUAISER, A.; OCHSENREITER, T.; LANZ, C.; SCHUSTER, S. C.; TREUSCH, A. H.; ECK, J.; SCHLEPER, C. Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. **Mol. Microbiol.**, v. 50, n. 2, p. 563-575, Oct 2003.

QUAISER, A.; ZIVANOVIC, Y.; MOREIRA, D.; LOPEZ-GARCIA, P. Comparative metagenomics of bathypelagic plankton and bottom sediment from the Sea of Marmara. **ISME J.**, v. 5, n. 2, p. 285-304, Feb 2011.

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. **Biotechnology advances**, v. 26, n. 6, p. 576-590, Nov-Dec 2008.

RAMOS-GONZALEZ, M. I.; DUQUE, E.; RAMOS, J. L. Conjugational transfer of recombinant DNA in cultures and in soils: host range of *Pseudomonas putida* TOL plasmids. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, n. 10, p. 3020-3027, Oct 1991.

REISENFELD, C.; SCHLOSS, P.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities. **Annu. Rev. Genet.**, p. 525-552, 2004.

RHO, M.; TANG, H.; YE, Y. FragGeneScan: predicting genes in short and error-prone reads. **Nucleic Acids Res.**, v. 38, n. 20, p. 191, Nov 2010.

RIESENFELD, C. S.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. **Environmental microbiology**, v. 6, n. 9, p. 981-989, Sep 2004.

RIVKINA, E. M.; FRIEDMANN, E. I.; MCKAY, C. P.; GILICHINSKY, D. A. Metabolic activity of permafrost bacteria below the freezing point. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3230-3233, Aug 2000.

ROESCH, L. F.; FULTHORPE, R. R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A. K.; KENT, A. D.; DAROUB, S. H.; CAMARGO, F. A.; FARMERIE, W. G.; TRIPLET, E. W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **ISME J.**, v. 1, n. 4, p. 283-290, Aug 2007.

RONAGHI, M.; UHLEN, M.; NYREN, P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. **Science**, v. 281, n. 5375, p. 363, 365, Jul 17 1998.

ROSSELLO-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS microbiology reviews**, v. 25, n. 1, p. 39-67, Jan 2001.

SACK, R. B. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 29, p. 333-353, 1975.

SALLES, J. F.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Multivariate analyses of *Burkholderia* species in soil: effect of crop and land use history. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 7, p. 4012-4020, Jul 2004.

SANDEGREN, L.; LINKEVICIUS, M.; LYTSY, B.; MELHUS, A.; ANDERSSON, D. I. Transfer of an Escherichia coli ST131 multiresistance cassette has created a Klebsiella pneumoniae-specific plasmid associated with a major nosocomial outbreak. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 67, n. 1, p. 74-83, Jan 2012.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of molecular biology**, v. 94, n. 3, p. 441-448, May 25 1975.

SCHLEIFER, K. H. Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. **Systematic and applied microbiology**, v. 32, n. 8, p. 533-542, Dec 2009.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current opinion in biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 303-310, Jun 2003.

SHANGE, R. S.; ANKUMAH, R. O.; IBEKWE, A. M.; ZABAWA, R.; DOWD, S. E. Distinct soil bacterial communities revealed under a diversely managed agroecosystem. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. 1-11, 2012.

SHIELDS, M. S.; REAGIN, M. J.; GERGER, R. R.; CAMPBELL, R.; SOMERVILLE, C. TOM, a new aromatic degradative plasmid from Burkholderia (Pseudomonas) cepacia G4. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 4, p. 1352-1356, Apr 1995.

SHINODA, Y.; SAKAI, Y.; UENISHI, H.; UCHIHASHI, Y.; HIRAISHI, A.; YUKAWA, H.; YURIMOTO, H.; KATO, N. Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, Thauera sp. strain DNT-1. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 3, p. 1385-1392, Mar 2004.

SHON, A. S.; BAJWA, R. P.; RUSSO, T. A. Hypervirulent (hypermucoviscous) Klebsiella pneumoniae: A new and dangerous breed. **Virulence**, v. 4, n. 2, Jan 9 2013.

SHUKLA, A. K.; UPADHYAY, S. N.; DUBEY, S. K. Current trends in trichloroethylene biodegradation: a review. **Crit. Rev. Biotechnol.**, Oct 11 2012.

SILVA, C. C.; HAYDEN, H.; SAWBRIDGE, T.; MELE, P.; KRUGER, R. H.; RODRIGUES, M. V.; COSTA, G. G.; VIDAL, R. O.; SOUSA, M. P.; TORRES, A. P.; SANTIAGO, V. M.; OLIVEIRA, V. M. Phylogenetic and functional diversity of metagenomic libraries of phenol degrading sludge from petroleum refinery wastewater treatment system. **AMB Express**, v. 2, n. 1, p. 18, 2012.

SIMON, C.; WIEZER, A.; STRITTMATTER, A. W.; DANIEL, R. Phylogenetic diversity and metabolic potential revealed in a glacier ice metagenome. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 23, p. 7519-7526, Dec 2009.

SINGLETON, D. R.; JONES, M. D.; RICHARDSON, S. D.; AITKEN, M. D. Pyrosequence analyses of bacterial communities during simulated in situ bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Nov 7 2012.

SMA. Meio Ambiente Paulista: Relatório de Qualidade Ambiental 2012. AMBIENTAL, S. D. M. A. C. D. P. São Paulo: SMA / CPLA: n. 252, 2012.

SMITH, A. M.; KIRISITS, M. J.; REIBLE, D. D. Assessment of potential anaerobic biotransformation of organic pollutants in sediment caps. **N. Biotechnol.**, v. 30, n. 1, p. 80-87, Nov 15 2012.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A.; KAMPFER, P.; MAIDEN, M. C.; NESME, X.; ROSSELLO-MORA, R.; SWINGS, J.; TRUPER, H. G.; VAUTERIN, L.; WARD, A. C.; WHITMAN, W. B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 52, n. 3, p. 1043-1047, May 2002.

STOVER, C. K.; PHAM, X. Q.; ERWIN, A. L.; MIZOGUCHI, S. D.; WARRENER, P.; HICKEY, M. J.; BRINKMAN, F. S.; HUFNAGLE, W. O.; KOWALIK, D. J.; LAGROU, M.; GARBER, R. L.; GOLTRY, L.; TOLENTINO, E.; WESTBROCK-WADMAN, S.; YUAN, Y.; BRODY, L. L.; COULTER, S. N.; FOLGER, K. R.; KAS, A.; LARBIG, K.; LIM, R.; SMITH, K.; SPENCER, D.; WONG, G. K.; WU, Z.; PAULSEN, I. T.; REIZER, J.; SAIER, M. H.; HANCOCK, R. E.; LORY, S.; OLSON, M. V. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, n. 6799, p. 959-964, Aug 31 2000.

STREIT, W.; RA, S. Metagenomics – the key to the uncultured microbes. **Current Opinion in Microbiology**. n.7, p. 492-498, 2004.

SUN, W.; CUPPLES, A. M. Diversity of five anaerobic toluene-degrading microbial communities investigated using stable isotope probing. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, n. 4, p. 972-980, Feb 2012.

SUZUKI, M. T.; GIOVANNONI, S. J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 2, p. 625-630, Feb 1996.

TANCSICS, A.; SZOBOSZLAY, S.; KRISZT, B.; KUKOLYA, J.; BAKA, E.; MARIALIGETI, K.; REVESZ, S. Applicability of the functional gene catechol 1,2-dioxygenase as a biomarker in the detection of BTEX-degrading *Rhodococcus* species. **J. Appl. Microbiol.**, v. 105, n. 4, p. 1026-1033, Oct 2008.

TANCSICS, A.; SZOBOSZLAY, S.; SZABO, I.; FARKAS, M.; KOVACS, B.; KUKOLYA, J.; MAYER, Z.; KRISZT, B. Quantification of subfamily I.2.C catechol 2,3-dioxygenase mRNA transcripts in groundwater samples of an oxygen-limited BTEX-contaminated site. **Environ. Sci. Technol.**, v. 46, n. 1, p. 232-240, Jan 3 2012.

TERAMOTO, M.; FUTAMATA, H.; HARAYAMA, S.; WATANABE, K. Characterization of a high-affinity phenol hydroxylase from *Comamonas testosteroni* R5 by gene cloning, and expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1c. **Mol. Gen. Genet.**, v. 262, n. 3, p. 552-558, Oct 1999.

TINDALL, B. J.; ROSSELLO-MORA, R.; BUSSE, H. J.; LUDWIG, W.; KAMPFER, P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 60, n. 1, p. 249-266, Jan 2010.

TORRES, F. R.; BRAGA JR, J. C.; BORGES, W. R. O que você precisa saber sobre Cubatão. São Paulo: Design & Print e Arquivo Histórico Municipal de Cubatão, 2002.

TRAVIS, L.; CHIN-YANG, L.; ZHANG, Z.; LI, D.-G.; YIN, S.-N.; CHAO, W.-H.; LI, G.-L.; DOSEMECI, M.; BLOT, W.; FRAUMENI, J.; JR; HAYES, R.; LINET, M. Hematopoietic Malignancies and Related Disorders Among Benzene-Exposed Workers in China. **Leukemia and Lymphoma**. n. 14, p. 91-102, 1994.

TRINGE, S. G.; VON MERING, C.; KOBAYASHI, A.; SALAMOV, A. A.; CHEN, K.; CHANG, H. W.; PODAR, M.; SHORT, J. M.; MATHUR, E. J.; DETTER, J. C.; BORK, P.; HUGENHOLTZ, P.; RUBIN, E. M. Comparative metagenomics of microbial communities. **Science**, v. 308, n. 5721, p. 554-557, Apr 22 2005.

URICH, T.; LANZEN, A.; QI, J.; HUSON, D. H.; SCHLEPER, C.; SCHUSTER, S. C. Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the meta-transcriptome. **PLoS One**, v. 3, n. 6, p. e2527, 2008.

VALDERRAMA, M. J.; PRADO, B.; DEL MORAL, A.; RIOS, R.; RAMOS-CORMENZANA, A.; CAMPOS, V. Numerical taxonomy of moderately halophilic gram-positive cocci isolated from the Salar de Atacama (Chile). **Microbiologia**, v. 7, n. 1, p. 35-41, Jun 1991.

VAN NIEL, C. B.; ALLEN, M. B. A note on *Pseudomonas stutzeri*. **Journal of bacteriology**, v. 64, n. 3, p. 413-422, Sep 1952.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 2, p. 407-438, Jun 1996.

VAZQUEZ, S.; NOGALES, B.; RUBERTO, L.; HERNANDEZ, E.; CHRISTIE-OLEZA, J.; LO BALBO, A.; BOSCH, R.; LALUCAT, J.; MAC CORMACK, W. Bacterial community dynamics during bioremediation of diesel oil-contaminated Antarctic soil. **Microb. Ecol.**, v. 57, n. 4, p. 598-610, May 2009.

VENTER, J. C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J. F.; HALPERN, A. L.; RUSCH, D.; EISEN, J. A.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K. E.; NELSON, W.; FOUTS, D. E.; LEVY, S.; KNAP, A. H.; LOMAS, M. W.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.; HOFFMAN, J.; PARSONS, R.; BADEN-TILLSON, H.; PFANNKOCH, C.; ROGERS, Y. H.; SMITH, H. O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, v. 304, n. 5667, p. 66-74, Apr 2 2004.

VIDALI, M. Bioremediation. An overview. **Pure Appl. Chem.**, v. 73, n. 7, p. 1163-1172, 2001.

VOGEL, T. M. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 7, n. 3, p. 311-316, Jun 1996.

WAYNE, L. G. International Committee on Systematic Bacteriology: announcement of the report of the ad hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. **Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology**, v. 268, n. 4, p. 433-434, Jun 1988.

WEELINK, S. A. B.; EEKERT, M. H. A.; M., S. A. J. Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.** p. 359-385 2010.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 12, p. 6578-6583, Jun 9 1998.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271, Jun 1987.

World Wildlife Fund. Mata Atlântica. Disponível em: <[http://www.wwf.org.br/natureza\\_brasileira/areas\\_prioritarias/mata\\_atlantica/](http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/areas_prioritarias/mata_atlantica/)>, 2013. Acesso em: 15/02/2013.

WU, M.; EISEN, J. A. A simple, fast, and accurate method of phylogenomic inference. **Genome Biol**, v. 9, n. 10, p. R151, 2008.

XIE, S.; SUN, W.; LUO, C.; CUPPLES, A. M. Novel aerobic benzene degrading microorganisms identified in three soils by stable isotope probing. **Biodegradation**, v. 22, n. 1, p. 71-81, Feb 2011.

XIN, B. P.; WU, C. H.; LIN, C. W. Bioaugmented remediation of high concentration BTEX-contaminated groundwater by permeable reactive barrier with immobilized bead. **J. Hazard. Mater.**, v. 244-245, p. 765-772, Jan 15 2013.

YEN, K. M.; KARL, M. R.; BLATT, L. M.; SIMON, M. J.; WINTER, R. B.; FAUSSET, P. R.; LU, H. S.; HARCOURT, A. A.; CHEN, K. K. Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase. **J. Bacteriol.**, v. 173, n. 17, p. 5315-5327, Sep 1991.

YERGEAU, E.; SANSCHAGRIN, S.; BEAUMIER, D.; GREER, C. W. Metagenomic analysis of the bioremediation of diesel-contaminated Canadian high arctic soils. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30058, 2012.

ZHOU, N. Y.; JENKINS, A.; CHAN KWO CHION, C. K.; LEAK, D. J. The alkene monooxygenase from *Xanthobacter* strain Py2 is closely related to aromatic monooxygenases and catalyzes aromatic monohydroxylation of benzene, toluene, and phenol. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 4, p. 1589-1595, Apr 1999.

ZYLSTRA, G. J.; KIM, E. Aromatic hydrocarbon degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 5-6, p. 408-414, 1997.