**Desenvolvimento, validação e aplicação de método
molecular baseado na análise do rRNA para a identificação das
bactérias formadoras de biofilme metabolicamente ativas na
superfície de membranas de osmose reversa**

ROBERTA NOVAES AMORIM ALMEIDA

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. René Peter Schneider

São Paulo

2009

RESUMO

ALMEIDA, R. N. A. **Desenvolvimento, validação e aplicação de método molecular baseado na extração, amplificação e seqüenciamento do rRNA para a identificação das bactérias formadoras de biofilme na superfície de membranas de osmose reversa.** 2009. 121 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2009.

Um método baseado na extração de rRNA, seguido de RT-PCR rRNA 16S, clonagem e ARDRA foi otimizado e validado para a identificação das bactérias ativas em biofilmes. O método foi analisado primeiro com consórcios artificiais de três organismos. As etapas de clonagem e RT não causaram variações importantes na composição destes consórcios, do contrário da etapa de PCR, onde foi necessária a redução de 30 para 10 ciclos para limitar a distorção da proporção de *templates*. A análise de biofilmes reais indicou que clones dominantes podem ser identificados com o critério de ocorrência de >2% na biblioteca, mas que a reprodutibilidade de análises ainda é insatisfatória, possivelmente devido a fatores como a micro heterogeneidade espacial do biofilme, viés na reação de PCR e formação de mais de um clone de ARDRA por organismo. O armazenamento do biofilme a -20 °C por 2 meses não levou à alterações expressivas em sua composição. O perfil de clones detectado com o kit (Mo Bio) de extração de RNA foi muito diferente do perfil detectado com o método otimizado neste trabalho.

Palavras-chave: Osmose reversa. Biofouling. Biofilme. rRNA 16S. Comunidades microbianas.

ABSTRACT

ALMEIDA, R. N. A. Development, validation and application of a molecular method based on extraction, amplification and sequencing of rRNA for identification of biofilm-forming bacteria on reverse osmosis membranes. 2009. 121 f. Master thesis (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2009.

A method based on extraction of rRNA, followed by RT-PCR of 16S rRNA, cloning and ARDRA was optimized and validated for identification of bacteria active in biofilms. The method was first tested with artificial three-membered consortia. Cloning and RT did not lead to significant changes in the composition of the artificial consortia, but a reduction in cycle number in the PCR reaction from 30 to 10 was necessary for limiting the distortion in the proportion of amplicons relative to that of the templates. Analysis of real biofilms revealed that clones from active organisms occurred in frequencies >2% in the clone library, but reproducibility of analysis was unsatisfactory, probably due to factors such as the spatial heterogeneity of colonization of biofilms by microbes, PCR bias and more than one ARDRA clone per organism. Storage of biofilm samples at -20 °C for 2 months did not lead to important changes in composition. Very different clone profiles were obtained in the analysis of the same biofilm sample with the optimized method and with a kit (Mo Bio) for extraction of RNA.

Keywords: Reverse osmosis. Biofouling. Biofilm. 16S rRNA. Microbial communities.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Osmose reversa

A tecnologia de osmose reversa é amplamente utilizada para a produção de água de alta qualidade para uso industrial ou para abastecimento público, e vem se difundindo rapidamente no Brasil e no mundo (DALVI et al., 2000). Os fatores que impulsionam a adoção desta tecnologia são a redução do custo de construção e operação das plantas, limites mais restritos de qualidade de água impostos pela legislação e o esgotamento dos mananciais de água potável de boa qualidade (SCHNEIDER e TSUTIYA, 2001).

A colmatção de membranas de osmose reversa devido à formação da camada de "fouling", principal determinante de perda de eficiência operacional e de redução de vida útil, tem sido um importante entrave para a redução do custo desta tecnologia (COKER e SEHN, 2000; SCHNEIDER, 2005a, 2005b).

O termo "fouling" descreve todos os mecanismos de colmatção de membranas, causados por processos de deposição e ou adsorção de materiais inorgânicos ou orgânicos, principalmente biofilmes bacterianos (COKER e SEHN, 2000; SCHNEIDER e TSUTIYA, 2001).

As camadas de "fouling" aumentam a resistência de filtração, resultando no aumento de pressão de operação das membranas. São atingidos valores de pressão que inviabilizam a continuação de operação da máquina de osmose. O sistema deve então ser retirado de operação para limpeza química. Ciclos frequentes de limpeza química reduzem a vida útil de membranas (SCHNEIDER e TSUTIYA, 2001).

Um elemento espiral de osmose reversa é constituído de camadas alternadas de membranas, separadas entre si por um espaçador, uma tela polimérica, que garante a abertura do canal de água de alimentação (água bruta, Figura 1A) e o escoamento turbulento da água neste canal. As membranas estão em contato com um canal de coleta de permeado (água filtrada), cuja abertura também é garantida por um espaçador de tela polimérica. Estes pacotes de membrana são enrolados em torno de um tubo perfurado de escoamento de permeado (Figura 1B). O canal de escoamento de permeado é vedado com cola para garantir a não-contaminação do permeado com água bruta (Figura 1B). O

elemento de membrana é inserido no interior de um vaso de pressão, onde a água bruta é injetada sob pressão. O rendimento por módulo de membrana é limitado a cerca de 10 a 15%, ou seja, entre 10 a 15% da água injetada no elemento é transferida pela membrana para produção de permeado, o resto da água escoar em direção tangencial à superfície da membrana com velocidade relativamente elevada, formando o rejeito. Para aumentar a produção, vários elementos de membrana são instalados em série dentro de vasos de pressão, sendo que o rejeito do elemento anterior é a alimentação do elemento seguinte (Figura 1C). A pressão no canal de alimentação varia entre 8 bar (água de superfície) a 90 bar (água de mar). Estas pressões elevadas são necessárias para compensar a pressão osmótica dos sais dissolvidos na água de alimentação e para vencer a resistência da membrana. Membranas de osmose não possuem poros e a água é transferida por difusão.

A rejeição quase completa de praticamente todos os componentes particulados e dissolvidos pelas membranas de osmose reversa resulta no acúmulo de nutrientes e bactérias na superfície da membrana (Figura 2). A turbulência e a elevada velocidade de transporte em direção tangencial no interior do canal de alimentação, porém, limitam a espessura da camada de fouling pela remoção contínua de material da zona de influência destes fatores. As pressões seletivas que atuam sobre organismos formadores de biofilmes são, portanto: (I) facilidade de acesso à membrana, (II) ambiente enriquecido em nutrientes relativamente às condições que prevalecem no canal de alimentação; (III) o mecanismo de enriquecimento de nutrientes pode, porém, resultar também no enriquecimento de fatores antimicrobianos na superfície da membrana, (IV) necessidade do biofilme maduro resistir às forças de cisalhamento horizontais relativamente fortes; (V) aporte contínuo de nutrientes e de bactérias para o biofilme.

Figura 1 - Esquema de um elemento de membranas em espiral (SCHNEIDER, 2001). A: representação esquemática do elemento de membrana; B: representação esquemática do arranjo das membranas no elemento. C: arranjo de elementos de membrana em vasos de pressão.

Figura 2 - Esquema de formação de biofilme sobre a membrana de osmose reversa.

1.2 Biofilmes em “fouling” de membranas de osmose reversa

Biofilmes são agregados de bactérias que produzem substâncias poliméricas extracelulares (EPS- exopolissacarídeos) que, entre outras funções, fixam as células firmemente na superfície da membrana, garantem a coesão mecânica do biofilme e proporcionam superfícies porosas para a incorporação de nutrientes e de bactérias carregadas pela água de alimentação (KNOELL, 1999). A matriz participa também como sítio de quimioabsorção onde sais, compostos orgânicos e colóides são capturados. A proliferação do biofilme é proporcionada pelo constante fluxo de água, que oferta ao biofilme nutrientes provenientes da matéria orgânica dissolvida na água de alimentação. A matriz de exopolissacarídeos também aumenta consideravelmente a resistência do biofilme a biocidas (COSTERTON et al., 1994; FLEMMING et al., 1995). Essa resistência à ação de agentes químicos e físicos de limpeza dificulta o controle do biofilme (DANKERT et al., 1986).

A formação do biofilme na superfície de membrana de osmose reversa inicia-se com a adesão de bactérias formadoras de biofilme sobre a folha de membrana, e posteriormente ocorre a multiplicação desses organismos. Bactérias não formadoras de biofilme poderão ser incorporadas ao biofilme devido ao fluxo contínuo de água através da membrana, entretanto estes organismos não terão participação na formação e estruturação desse complexo ecossistema (Figura 1). Estes organismos permanecerão inativos e não formarão microcolônias. Portanto, a identificação dos organismos formadores de biofilme bacteriano requer técnicas capazes de identificar as bactérias

metabolicamente ativas em uma amostra de biofilme de membrana e diferenciar dentre este grupo de bactérias aquelas que formam microcolônias e excretam exopolímeros daquelas que não se multiplicam no interior do biofilme.

1.3 Técnicas de identificação bacteriana

Técnicas tradicionais de identificação bacteriana são baseadas no isolamento do organismo em meio de cultivo para posterior identificação por meio de uma bateria de testes bioquímicos. Estes procedimentos são, porém, inadequados para a identificação de bactérias de amostras ambientais, pois os meios de cultura artificiais não são capazes de mimetizar com precisão os diferentes nichos ecológicos nestes ambientes (GIOVANNONI et al., 1990; TORSVIK et al., 1998). Cerca de metade das sequências de 16S rDNA, obtidas por clonagem, depositadas no NCBI-Data Base pertencem a organismos não cultiváveis e desconhecidos.

A disparidade entre cultiváveis e diversidade *in situ* tem ocasionado aumento da importância de métodos independente de cultivo (AMANN et al., 1995; HEAD et al., 1998; HUGENHOLTZ et al., 1998; HUGENHOLTZ et al., 1996). Inicialmente essa transição foi acompanhada pela utilização de perfis de ácidos graxos (FINDLAY, 1996; WHITE e FINDLAY, 1988), mas recentemente sequências de ácidos nucleicos têm se tornado as moléculas alvo para os estudos de diversidade microbiana (SZEWZYK et al., 2000).

A priori qualquer gene bacteriano que esteja presente em todos os microrganismos e que possua domínios variáveis e conservados, poderia ser empregado para taxonomia. O gene preferido para estes estudos, porém, é o gene do RNA ribossômico 16S (PACE et al., 1986; HUGENHOLTZ et al., 1998; WHEELIS et al., 1992), para cuja amplificação estão disponíveis inúmeros primers para discriminação de diferentes grupos taxonômicos, e uma base de dados extensa para classificação filogenética (GUTELL et al., 1994; OLSEN et al., 1986). O RNA ribossômico 16S é incorporado na estrutura do ribossomo e, portanto, extremamente estável, comparado a outros tipos de RNA da célula, o que viabiliza a implementação de duas estratégias distintas para análise da sequência deste gene: a matéria-prima pode ser obtida a partir do DNA genômico ou a partir do RNA ribossômico.

A análise filogenética a partir da extração de DNA genômico de amostras, não

permite discriminar bactérias ativas de microrganismos inativos, ou até mesmo mortos, pois o DNA persiste no ambiente mesmo após a célula morrer (KEER e BIRCH, 2003). Em contraste com o DNA, a taxa de turnover do RNA ribossômico é relativamente elevada, de forma que a quantidade de ribossomos da célula reflete a intensidade de seu metabolismo (BARBOSA, 1998). O RNA ribossômico é rapidamente degradado no meio-ambiente devido à abundância de RNases e à fragilidade da molécula (fita simples). Estes conjuntos de fatores credenciam o RNA ribossômico como molécula-alvo mais adequada para a identificação das bactérias formadoras de biofilme metabolicamente ativas na superfície de membranas de osmose reversa (FELSKE et al., 2000; MORGAN et al., 2002).

1.3.1 PCR (Polymerase Chain Reaction – PCR)

Inventada em 1983 por Kary Mullis, a PCR é uma das técnicas mais comuns utilizadas em laboratórios de pesquisas médicas e biológicas para diversas finalidades, como o sequenciamento de genes e diagnóstico de doenças hereditárias, identificação de *fingerprint* genético (usado em testes de paternidade e na medicina forense), detecção de diagnóstico de doenças infecciosas e criação de organismos transgênicos.

Apesar do vasto uso são inerentes ao método muitos mecanismos de interferência, os quais incluem a formação de estruturas secundárias do *template*, o que impediria o acesso do primer a seu sítio de ligação (LIESACK et al., 1991; MEYERHANS et al., 1990; PALLANSCH et al., 1990); a eficiência variável de ligação da Taq polimerase a alvos diferentes (ECKERT e KUNKEL, 1991); oscilações aleatórias decorrentes da baixa concentração de *template* (CHANDLER et al., 1997); desnaturação diferencial do DNA; anelamento diferencial dos primers; inibição de enzimas por ácidos húmicos, no caso de amostras ambientais; degradação do *template* e presença de impurezas no DNA (MUTTER e BOYNTON, 1995; SARKAR et al., 1990; WALSH et al., 1992). Além dos vieses que podem ocorrer em reações contendo um único tipo de *template* podem ocorrer outros quando há mistura de diferentes *templates*, como a formação de quimeras durante a reação (WANG e WANG, 1997) a supressão ou intensificação decorrente da amplificação de seqüências heterogêneas de *templates* de 16S rRNA (von WINTZINGERODE e STACKEBRANDT, 1997) amplificação seletiva da seqüência do 16S rRNA em diferentes condições de PCR (REYSENBACH

et al., 1992); amplificação preferencial (SUZUKI e GIOVANNONI, 1996; POLZ e CAVANAUGH, 1998; KANAGAWA, 2003). Segundo Farrelly et al. (1995) estes vieses impedem que os produtos da amplificação de 16S rRNA possam ser usados para quantificar a abundância de espécies em amostras ambientais, pois a quantidade de *amplicons* de dois modelos de comunidades foram pobremente correlatas em relação ao número de cópias iniciais.

1.3.2 Clonagem bacteriana

A clonagem é uma das técnicas moleculares mais difundidas em ecologia microbiana, o método consiste na extração de DNA ou RNA de uma população bacteriana, amplificação do fragmento de interesse, inserção deste em um vetor de clonagem (reação de ligação), por fim o vetor contendo o fragmento é colocado em bactérias competentes (reação de transformação). Cada clone é amplificado em reações de PCR, com *primers* específicos para a recuperação do fragmento clonado.

A clonagem em *Escherichia coli* é o método mais utilizado para separar DNA amplificado por reação de PCR, de mesmo tamanho e que difere na composição das sequências. Contudo a influência do sistema de clonagem na composição da biblioteca de ecossistemas ambientais são pobremente investigadas.

As vantagens do método de clonagem são: estudo preciso de taxonomia; obtenção de árvores filogenéticas de alta resolução; possibilita desenhos de *primers* e sondas (FISH); cobertura da maioria dos microrganismos, incluindo grupos minoritários, os quais são difíceis de detectar com métodos de “fingerprint”; identificação de microrganismos ainda não cultivados ou identificados.

As desvantagens são o alto tempo consumido; o método é laborioso; a extração de ácido nucléico pode ser dificultada quando a amostra é de solo ou sedimento; muitos clones têm que ser seqüenciados para atingir cobertura amostral; a técnica não é quantitativa, pois a etapa de PCR pode intensificar ou mascarar a quantidade de certas espécies devido às diferenças de acessibilidade aos sítios das moléculas de DNA pelos componentes da reação (SANZ e KOCHLING, 2007).

1.3.3 Métodos de “Fingerprinting”

Os métodos de “fingerprint” são utilizados no estudo de estrutura e dinâmicas populacionais (MUYZER, 1999). A estratégia geral consiste na extração do ácido nucléico, amplificação e análise do produto pelas técnicas de fingerprinting, principalmente por ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) e DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*, ZOETENDAL et al., 2004).

1.3.3.1 ARDRA

A técnica de ARDRA é baseada na digestão, por enzimas de restrição, de DNA amplificado por PCR, seguida por separação eletroforética dos fragmentos em gel com alta porcentagem de agarose ou poliacrilamida (LAGUERRE et al., 1994; MASSOL-DEYA et al., 1995). Uma única enzima de restrição às vezes não provê suficiente resolução genotípica, pois diferentes espécies podem produzir padrões idênticos, sendo necessária a utilização de múltiplas enzimas separadamente ou em combinação.

A técnica permite o processamento de produtos de amplificação de um pool de DNA (ACINAS, 1997; MARTINEZMURCIA et al., 1995) ou sequências individuais de produtos de clonagem (PACE, 1996). No caso de digestão de um pool de produtos de PCR, a separação pode resultar em padrões muito complexos para avaliação comparativa, pois a digestão de DNA de uma única espécie pode produzir de quatro a seis fragmentos, quando são utilizadas enzimas de restrição que reconhecem 4 bases. Este fator, somado a limitada sensibilidade de coloração, resulta na supressão de bandas de comunidades menos abundantes, fato que acarreta em perda de informação filogenética (TIEDJE et al., 1999). O uso de enzimas de restrição que reconhecem 6 bases, tem sido sugerida para reduzir o número de fragmentos de restrição por espécie (KLAMER et al., 2002) e permite que a técnica de ARDRA também possa ser aplicada a amostras com alta diversidade de espécies. A construção de bibliotecas clonais com posterior processamento de clones evita esta limitada sensibilidade de resolução. Apesar dessa estratégia ser mais trabalhosa e demorada ela tem sido escolhida com sucesso para análises de diversidade microbiana. As análises de sequências de clones com padrão

idêntico de ARDRA confirmaram que os membros do grupo eram intimamente relacionados uns com os outros (WEIDNER et al., 1996).

Em geral, a técnica de ARDRA é muito utilizada para detecção de modificações estruturais em comunidades microbianas simples, mas não é o método de escolha, isolado, para detecção de grupos filogenéticos específicos (KIRK et al., 2004; LIU et al., 1997).

1.3.2.2 DGGE e TGGE

Em ambas as técnicas DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) e TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) pequenos fragmentos de PCR (cerca de 200-700 pb) são separados em gel de acrilamida, com gradiente de desnaturante, químico no DGGE e de temperatura em TGGE (MUYZER et al., 1993; MUYZER et al., 1998).

Um dos primers utilizados na amplificação dos fragmentos de PCR contém grampo rico em bases guanina e citosina (GC) com cerca de 40 pb (MYERS et al., 1985). Os fragmentos amplificados analisados pela técnica por serem produtos de reação de PCR, realizada com os mesmos *primers*, possuem geralmente o mesmo tamanho. Inicialmente os produtos são separados de acordo com o peso molecular determinado pela quantidade de GC, porém durante a corrida eletroforética, ocorre o aumento gradual do agente denaturante, o qual faz com que a dupla fita se abra e fique presa a malha do gel, assim os fragmentos contendo maior quantidade de GC terão maior motilidade no gel. O grampo de GC impede a total abertura da dupla fita (MYERS et al., 1985). Os agentes químicos desnaturantes utilizados são a formamida (variando de 0 a 40%) e uréia (variando de 0 a 7 M, com temperatura constante – em torno de 60 °C), no caso do DGGE, ou utilizando um adequado gradiente de aquecimento no caso do TGGE (sem a utilização de agentes desnaturante). O gradiente deve ser ajustado para cada amostra em específico, para uma ótima resolução (OGIER et al., 2002). Esse método tem potencial para detectar diferenças no comportamento de desnaturação de pequenos fragmentos de DNA, que teoricamente diferem em apenas uma base.

A presença do grampo de GC acoplado ao final da extremidade 5' de um dos *primers* leva a baixa eficiência de amplificação na reação de PCR, ocasionando a

diminuição de produto. O grampo de GC também aumenta o risco de geração de artefatos na etapa de anelamento, como a formação de heteroduplex (FERRIS et al., 1997; LEE et al., 1996; RUANO e KIDD 1992), e a formação de dímeros no *primer* (MOESENEDER, 1999). A baixa eficiência de amplificação torna-se um maior problema com alguns *templates* de amostras ambientais, as quais são difíceis de amplificar, devido à presença de substâncias inibitórias. Quando a temperatura necessária para a desnaturação na reação de PCR é suficientemente alta (sem o grampo de GC), o grampo não é essencial. Esse fato explica o porquê de bons perfis serem observados sem o uso do grampo, promovidos quando *templates* contêm um comprimento mínimo de GC. Neste caso a corrida eletroforética não deve ser realizada até a completa separação da dupla fita.

Diante destas considerações é importante salientar que a dupla fita de DNA desnatura em domínios específicos e não como um zíper. Quando fornecida temperatura de desnaturação de produto de PCR suficientemente alta, e mesmo com uma desnaturação parcial envolvendo domínios individuais, é suficiente para o sucesso da separação de misturas de PCR pela técnica de DGGE. Entretanto, a amplificação de diferentes filotipos com mobilidade eletroforética similar ficará mais comprometida.

A variação na composição química do gel, no caso do DGGE, ocasiona coloração desigual. O *background* de coloração torna difícil a distinção entre bandas fracas originadas de espécies menos abundantes na amostra. Programas de computador são utilizados para reduzir o *background* artificialmente introduzido (AGNELLI et al., 2004). Algumas limitações podem ser superadas pelo emprego de produtos de PCR fluorescente. O uso de marcadores fluorescentes pode aumentar enormemente a sensibilidade de detecção (MUYZER, 1999; MUYZER et al., 2004). Esses marcadores são frequentemente necessários, gerando a necessidade de rigorosas padronizações para a comparação entre géis (FERRARI e HOLLIBAUGH, 1999; NEUFELD e MOHN, 2005). Padrões internos intra linhas (em cada canaleta de aplicação) facilitam a padronização de comparação de amostras intra e inter géis (NEUFELD e MOHN, 2005).

Géis tradicionais de DGGE detectam somente no mínimo de 1 a 2 % da população microbiana em amostras ambientais (MACNAUGHTON et al., 1999; MUYZER et al., 1993; STEPHEN et al., 1999). É, portanto, indicado para comunidade com um limitado número de membros abundantes. Holben et al. (2004) fracionaram

extratos de DNA baseado no conteúdo de GC antes da realização do DGGE na tentativa de simplificar perfis e detectar membros raros nas comunidades.

As vantagens deste método são a acessibilidade para laboratórios pouco equipados e a relativa facilidade para interpretação dos resultados. Além disso, bandas individuais de interesse, como por exemplo, bandas que distinguem comunidades, podem ser excisadas do gel e identificadas via sequenciamento, porém podendo resultar em baixa qualidade da sequência de DNA (DIEZ et al., 2001; SEKIGUCHI et al., 2001). A qualidade pode ser melhorada com o emprego da clonagem de bandas excisadas, procedimento que resulta em sequências mais limpas comparadas àquelas sequenciadas diretamente, contudo esta técnica é muito mais trabalhosa.

O uso de DGGE/TGGE para a triagem antes do sequenciamento pode ser limitada pelo fato dos fragmentos serem de tamanhos pequenos. O sequenciamento de 300 a 400 pb pode não conter informação suficientemente precisa para classificação taxonômica (OVREAS, 2000).

A técnica de DGGE tem sido muito utilizada para comparar modificações estruturais em comunidades em resposta às perturbações, como por exemplo, modificações na composição do substrato disponível para a comunidade microbiana. Sun et al. (2004) utilizou o DGGE para documentar diferenças na comunidade microbiana de solo tratado com estrume ou fertilizantes inorgânicos.

O DGGE é o método de escolha quando a informação desejada não tem que ser filogeneticamente exaustiva como na clonagem, porém relativamente precisa para determinar os membros dominantes de uma comunidade (MUYZER e SMALLA 1998). Em geral, esta técnica não é utilizada isoladamente, mas como parte de combinados métodos, como por exemplo, hibridização *in situ* como no estudo de bactérias sulfato redutoras (SANTEGOEDS et al., 1998) ou de eliminadoras de fósforo (ONDA et al., 2002). Os autores monitoram os traços dos organismos dominantes no processo pela avaliação da intensidade de bandas de DGGE e então desenham sondas específicas de acordo com as sequências de bandas predominantes, permitindo a quantificação dos candidatos e confirmando os resultados obtidos por DGGE.

Entretanto, De Araújo e Schneider (2008) ao analisarem consórcios artificiais de bactérias com composição conhecida pela técnica de DGGE observaram que a intensidade relativa de bandas em géis de DGGE raramente refletia a proporção relativa dos organismos na amostra. Em alguns casos a banda correspondente ao organismo

dominante não foi detectada no gel, o qual continha bandas de organismos presentes no mínimo entre 2 a 3 ordens de grandeza inferior ao organismo dominante. Os fatores responsáveis por estes resultados estão relacionados com os vieses na amplificação de DNA de amostra com misturas de *templates*, os quais foram discutidos anteriormente e limitações intrínsecas ao método.

Em suma, a aplicação da técnica de DGGE é a melhor escolha quando o principal objetivo é descrever previamente a diversidade microbiana desconhecida.

1.3.4 FISH

A técnica de FISH (*Fluorescence In-Situ Hybridization*) detecta sequências de ácidos nucleicos por meio de sondas fluorescentes, as quais são suficientemente pequenas para penetrar totalmente em membranas celulares e hibridizar em sítios específicos do rRNA intracelular, sem alterar a morfologia celular ou a integridade (VAUGHAN et al., 1999).

A técnica é comumente utilizada em investigações taxonômicas de comunidades bacterianas. As sondas podem ser desenhadas para serem específicas para espécies, grupos ou reinos. Geralmente uma sonda de domínio Bacteria é utilizada em combinação com mais sondas específicas. Após a hibridização, as comunidades microbianas são analisadas por microscópio de epifluorescência (AMANN et al., 1995; GLÖCKNER et al., 1999; PERNTHALER et al., 2002b).

Apesar das numerosas vantagens da técnica de FISH, a sua aplicação produz alguns resultados falsos positivos e falsos negativos. Fatores metodológicos e ambientais podem influenciar o desempenho da técnica. A escolha da sonda e do fluorocromo, o rigor das condições, a temperatura de hibridização, o fato de que alguns microrganismos são autofluorescente, o tipo de ecossistema, e o estado fisiológico dos alvos celulares podem influenciar na eficiência desta ferramenta (BOUVIER e DEL GIORGIO, 2003; DAIMS et al., 1999; FUCHS et al., 2001; MOTER e GÖBEL, 2000; OUVENEY e FUHRMAN, 1997).

A técnica de FISH tem sido combinada com citometro de fluxo em alguns trabalhos (DELONG, 1993; LEBARON e JOUX, 1994; SIMON et al., 1995; WALLNER et al., 1993). As principais vantagens desta combinação são: a possibilidade de análise de vários parâmetros e a relativa rapidez e sensibilidade na

determinação de até mesmo populações raras. Contudo poucas publicações reportam o uso desta ferramenta para estudos de ecologia, apesar de existirem numerosos artigos no ramo da pesquisa médica (BAERLOCHER e LANSDORP, 2003).

Recentemente uma melhoria na técnica de FISH tem sido proposta, o que levou a modificações na técnica, conhecida como TSAFISH (*Tyramide Signal Amplification of FISH*). Esta técnica permite um aumento do sinal fluorescente de células hibridizadas de 20 a 40 vezes, e tem sido aplicada com sucesso, como por exemplo, em piceucariotos, mas esta técnica consome muito tempo, fato que limita o número de amostra que pode ser estudada (BIEGALA et al., 2003).

Outra melhoria importante da técnica de FISH tem sido feita por Pernthaler et al. (2002). O pesquisador introduziu a técnica de CARD-FISH (*Catalyzed Reporter Deposition-FISH*) em estudos de consórcios microbianos. As amostras são concentradas em filtros de membrana, e posteriormente colocadas em gel de agarose (*low melting*), anteriormente a este procedimento faz se necessário o uso de lisozima para aumentar a permeabilidade da célula. Estudos realizados por Pernthaler et al. (2002) demonstraram que até 94% das células plânctônicas bacterianas foram hibridizadas pela técnica de CARD-FISH.

No presente trabalho o objetivo foi desenvolver, validar e aplicar método molecular baseado na extração e seqüenciamento de 16S rRNA para a identificação das bactérias metabolicamente ativas e formadoras de biofilme na superfície de membranas de osmose reversa.

4 CONCLUSÕES

A análise detalhada dos parâmetros metodológicos de extração e clonagem de RNA ribossômico de biofilmes possibilitaram identificar fatores que determinam a eficiência das diferentes etapas do método e otimizar procedimentos para uma maior fidedignidade na amostragem dos organismos ativos no biofilme.

O método de melhor eficiência, dentre os métodos testados, tanto quantitativamente como qualitativamente, na extração de RNA foi o protocolo adaptado descrito por Oh e So (2003). As melhores condições de lise bacteriana, para o emprego deste protocolo de extração do rRNA foram obtidas com a agitação da amostra no equipamento de “Bead beater” a 4000 rpm durante 1,5 minuto.

Dentre as três enzimas de transcriptase reversa testadas a MML-V apresentou a melhor eficiência.

A quantificação de ácidos nucléicos com o equipamento Nanodrop® permitiu a obtenção de excelentes resultados com emprego de uma quantidade mínima de amostra.

A enzima de DNase Turbo® foi capaz de reduzir a contaminação de DNA nos extratos de rRNA a níveis inferiores aos detectáveis no gel de agarose.

A reação de transcrição reversa apresentou uniformidade de produtos gerados quando *templates* heterogêneos foram utilizados, entretanto o mesmo não aconteceu na etapa de PCR, fato que resultou na alteração da proporção de *amplicons* relativo à proporção inicial de *templates* na amostra.

A proporção vetor inserto de melhor produtividade na reação de ligação, pela técnica de clonagem foi de uma molécula de vetor para três moléculas de inserto.

A análise de consórcios artificiais estabelecidos com rRNA resultou na detecção de todos os componentes da mistura, porém em proporções alteradas. A análise das etapas individuais indica que a reação de transcrição reversa e a clonagem mantiveram a proporcionalidade original dos membros do consórcio, do contrário da etapa de PCR (com 30 ciclos de amplificação), onde ocorreram alterações entre as proporções dos diferentes organismos na mistura. A redução no número de ciclos de amplificação durante a etapa de PCR para 10 ciclos minimizou as variações entre as proporções obtidas e esperadas de clones de organismos dos consórcios artificiais.

Os fatores que poderiam ter contribuído para o insucesso na extração de rRNA de biofilmes da membrana e sucesso na extração de RNA de biofilmes de biorreator

incluem longo tempo de armazenamento dos elementos de osmose reversa e adsorção de rRNA à componentes abióticos orgânicos ou inorgânicos do biofilme. A redução drástica da quantidade de rRNA na transição da fase exponencial para a fase estacionária indica que a manutenção do estado fisiológico dos organismos é essencial na análise de biofilmes ambientais. Estes resultados destacaram a necessidade de se caracterizar os fatores que influenciam na extração de rRNA de biofilmes de meio ambiente, como 0substâncias degradadoras de RNA e substâncias que adsorvem na molécula impedindo a extração.

O estabelecimento do critério de corte em 2% de representação dos clones nas bibliotecas construídas com biofilme permitiu detectar clones dominantes, porém com variação de perfis clonais entre réplicas, demonstrando uma reprodutibilidade ainda insatisfatória na análise de amostras. Três fatores podem ter contribuído para a variação dos perfis clonais entre réplicas: micro heterogeneidade espacial do biofilme, viés da técnica de PCR e alocação de mesmos clones a grupamentos clonais de ARDRA diferentes. A investigação do papel destes fatores na reprodutibilidade do método deve ser investigada em estudos posteriores. Contudo para uma melhor amostragem da composição microbiana em biofilmes, faz-se necessária a análise de número de réplicas suficiente para que nenhuma informação nova seja conseguida e análise nestas réplicas de RNAs homogeneizados de diferentes extrações.

O período de dois meses a temperatura de -20 °C para o armazenamento de amostras de biofilme não ocasionou variação na quantidade de RNA em relação à amostra fresca; a composição das bibliotecas construídas com RNA de amostras frescas de biofilme e de amostras armazenadas por dois meses, em relação aos doze perfis mais frequentes, foi coincidente.

A biblioteca construída a partir de rRNA extraído com o kit (Mo Bio) apresentou grande variação em relação à quantidade de um dos tipos clonais quando comparada às bibliotecas construídas com RNA obtido pelo método adaptado descrito por Oh e So (2003). Fato que pode ter sido decorrente da menor produtividade de extração de RNA pelo kit, hipótese que deverá se testada para resultados mais conclusivos.

REFERÊNCIAS*

- ACINAS, S. G.; RODRIGUEZ-VALERA, F.; PEDROS-ALIO, C. Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16S rDNA. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 24, 27-40, 1997.
- AGNELLI, A.; ASCHER, J.; CORTI, G.; CECCHERINI, M. T.; NANNIPIERI, P.; PIETRAMELLARA, G. Distribution of microbial communities in forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. **Soil Biology Biochemistry**, v.36, p. 859-868, 2004.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial-cells without cultivation. **Microbiological and Molecular Biology Reviews**, v. 59, 143-169, 1995.
- BAERLOCHER, G. M.; LANSDORP, P. M. Telomere Length Measurements in Leukocyte Subsets by Automated Multicolor Flow-FISH. **Cytometry, Part A**, v. 55, n. 1, p. 1-6, 2003.
- BARBOSA, H. R. **Microbiologia básica**. São Paulo: Editora Atheneu, 1998.
- BERESCHENKO, L. A.; STAMS, A. J. M.; HEILIG, G. H. J.; EUVERINK, G. J. W.; NEDERLOF, M. M.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Investigation of microbial communities on reverse osmosis membranes used for process water production. **Water Science & Technology**, v. 55, n. 8-9, p. 181-190, 2007.
- BIEGALA, I. C.; NOT, F.; VAULOT, D.; SIMON, N. Quantitative assessment of picoeukaryotes in the natural environment by using taxon-specific oligonucleotide probes in association with tyramide signal amplification-fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5519-5529, 2003.
- BONNET, R.; SUAUA, A.; DORÉ, J.; GIBSON, G. R.; COLLINS, M. D. Differences in rDNA libraries of faecal bacteria derived from 10- and 25-cycle PCRs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 757-763, 2002.
- BOUVIER, T.; DEL GIORGIO, P.A. Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 44, n. 1, p. 3-15, 2003.

* De acordo com:

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

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROSIUS, J.; DULL, T. J.; SLEETER, D. D.; NOLLER, H. F. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. **Journal Molecular Biology**, v. 148, p. 107-127, 1981.

CHANDLER, D. P.; FREDRICKSON, J. K.; BROCKMAN, F. J. Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. **Molecular Ecology**, v. 6, n. 5, p. 475-482, 1997.

CHENG, K. J.; INGRAM, J. M.; COSTERTON, J. W. Interactions of alkaline phosphatase and the cell wall of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 107, p. 325-336, 1971.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol- chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, p. 156-159, 1987.

CHOMCZYNSKI, P. Solubilization in formamide protects RNA from degradation. **Nucleic Acids Research**, v. 20, 3791–3791, 1992.

CLAYTON, R. A.; SUTTON, G.; HINKLE, P. S.; BULT, C.; FIELDS, C. 1995. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in Genbank—why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 45, p. 595–599.

CLONTECH. Aids to DNA synthesis, repair, amplification and the rest: Powerscript. **Nature**, p. 405-255, 2000.

COKER, S.; SEHN, P. Four years field experience with fouling resistant reverse osmosis membranes. **Desalination**, v. 132, p. 211-215, 2000.

CONDON, C.; LIVERIS, D.; SQUIRES, C.; SCHWARTZ, I.; SQUIRES, C. L. rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of rna inactivation. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 4152-4156, 1995.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; DEBEER, D.; CALDWELL, D.; KORBER, D.; JAMES, G. Biofilms, the Customized Microniche. **Journal of Bacteriology**, p. 2137-2142, 1994.

DAHLLOF, I.; BAILLIE, H.; KJELLEBERG, S. rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3376-3380, 2000.

DAIMS, H.; BRUHL, A.; AMANN, R.; SCHLEIFER, K. H.; WAGNER, M. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 434-444, 1999.

DALVI, A. G. I.; AL-RASHEED, R.; JAVEED, M. A. Studies on organic foulants in the seawater feed of reverse osmosis plants of SWCC. **Desalination**, v. 132, p. 217-232, 2000.

DANKERT, J.; HOGT, A. H.; FEIJEN, J. Biomedical Polymers: Bacterial Adhesion, Colonization and Infection. **Critical Reviews in Biocompatibility**, v. 2, p. 219, 1986.

DAVIS, B. D.; LUGER, S. M.; TAI, P. C. Role of ribosome degradation in the death of starved Escherichia coli cells. **Journal of Bacteriology**, v. 166, 439-445, 1986.

DE ARAÚJO, J. C.; SCHNEIDER, R. P. DGGE with genomic DNA: Suitable for detection of numerically important organisms but not for identification of the most abundant organisms. **Water Research**, v. 42, n. 20, p. 5002-5010, 2008.

DEUTSCHERT, M. P. Degradation of stable RNA in bacteria. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 45041-45044, 2003.

DIEZ, B.; PEDROS-ALIO, C.; MARSH, T. L.; MASSANA, R. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2942-2951, 2001.

DUTTON, C. M.; PAYNTON, C.; SOMMER, S. S. General method for amplifying regions of very high G + C content. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 12, p. 2953-2954, 1993.

ECKERT, K. A.; KUNKEL, T. A. DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. **PCR Methods Applied**, v. 1, p. 17-24, 1991.

FARIAS; I. P.; HRBEK, T. **Desenvolvimento de microssatélites para Arapaima gigas**. Disponível em: <http://www.evoamazon.net/Legal_protocols/Protocolo%20Microssatelites.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2007.

FARRELLY, V.; RAINEY F. A.; STACKEBRANDT, E. Effect of genome size and reran gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. **Applied Environment Microbiology**, v. 61, p. 2798-2801, 1995.

FARRELLY, V.; RAINEY F. A.; STACKEBRANDT E. Effect of genome size and reran gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. **Applied Environment Microbiology**, v. 61, p. 2798-2801, 1995.

- FELSKE, A. A.; WOLTERINK, R.; VAN LIS, W. M. D. V.; AKKERMANS, A. D. L. Response of a soil bacterial community to grassland succession as monitored by 16S rRNA levels of the predominant ribotypes. **Applied Environment Microbiology**, v. 66, p. 3998-4003, 2000.
- FERRARI, V. C.; HOLLIBAUGH, J. T. Distribution of microbial assemblages in the Central Arctic Ocean Basin studied by PCR/ DGGE: analysis of a large data set. **Hydrobiologia**, v. 401, 55-68, 1999.
- FERRIS, M. J.; WARD, D. M. Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied Environment Microbiology**, v. 63, p. 1375-1381, 1997.
- FINDLAY, R. H. The use of phospholipid fatty acids to determine the microbial community structure. In: AKKERMANS, A. D.; VAN ELSAS, J. D.; DE BRUIJN, F. J. (Ed.). **Molecular Microbial Ecology Manual**. Dordrecht: Kluwer, 1996. p. 1-17.
- FISCHER, S. G.; LERMAN, L. S. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. **Cell**, v.16, n. 1, p. 191-200, 1979.
- FLEMMING, H. C. Sorption sites in biofilms. **Water Science and Technology**, v. 32, n. 8, p. 27-33, 1995.
- GALLAGHER, S. R. **Current Protocols in Molecular Biology**. AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Ed.). New York: Greene Publishing and Wiley Interscience, 2003.
- GIOVANONNI S. J.; BRITSCHGI T. B.; MOYER C. L.; FIELD K. G. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. **Nature**, v. 345, p. 60-63, 1990.
- GLOCKNER, F. O.; FUCHS, B. M.; AMANN, R. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: A first comparison based on fluorescence in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3721-3726, 1999.
- GUTELL R. R.; LARSEN N.; WOOSE C. R. Lessons from an envolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. **Microbiology Reviews**, v. 58, n. 10-26, 1994.
- HEAD, I. M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbiology Ecology**, v. 35, p. 1-21, 1998.
- HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, M. H. E. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied Environment Microbiology**, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HOLBEN, W. E.; FERIS, K. P.; KETTUNEN, A.; APAJALAHTI, J. H. A. GC Fractionation Enhances Microbial Community Diversity Assessment and Detection of Minority Populations of Bacteria by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2263-2270, 2004.

HORI, M.; FUKANO, H.; SUZUKI, Y. Uniform amplification of multiple DNAs by emulsion PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 352, n. 2, p. 323-328, 2007.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 4765-4774, 1998.

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

JOHNSON, B. H.; HECHT, M. H. Recombinant Proteins Can Be Isolated from E. coli Cells by Repeated Cycles of Freezing and Thawing. **Bio Technology**, v. 12, p. 1357-1360, 1994.

KANAGAWA, T. Bias and Artifacts in Multitemplate Polymerase Chain Reactions (PCR). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 4, p. 317-323, 2003.

KEER J. T.; BIRCH L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. **Jornal of Microbial Methods**, v. 53, p. 175-183, 2003.

KHALIL, H.; VILLOTA, R. The effect of microwave sublethal heating on the ribonucleic acids of *Staphylococcus aureus*. **Journal Food Protection**, v. 52, n. 8, p. 544-548, 1989.

KHALIL, H.; VILLOTA, R. Comparative study on injury and recovery of *Staphylococcus aureus* using microwaves and conventional heating. **Journal of Food Protection**, v. 51, n. 3, p. 181-186, 1988.

KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KHIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiology Methods**, v. 58, p. 169-188, 2004.

KLAMER, M.; ROBERTS, M. S.; LEVINE, L. H.; DRAKE, B. G.; GARLAND, J. L. Influence of elevated CO₂ on the fungal community in a coastal scrub oak forest soil investigated with terminal-restriction fragment length polymorphism analysis. **Applied Environment of Microbiology**, v. 68, p. 4370-4376, 2002.

KLAPPENBACH, J. A.; DUNBAR, J. M.; SCHMIDT, T. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. **Environment of Microbiology**, v. 66, p. 1328-1333, 2000.

KNOELL, T.; SAFARIK, J.; CORMACK, T.; RILEY, R.; LIN, S. W.; RIDGWAY, H. Biofouling potentials of microporous polysulfone membranes containing a sulfonated polyether-ethersulfone/polyethersulfone block copolymer: Correlation of membrane surface properties with bacterial attachment. **Journal of Membrane Science**, v. 157, n. 1, p. 117-138, 1999.

KOTEWICZ, M. L.; D'ALESSIO, J. M.; DRIFTMIER, K. M. Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. **Gene**, v. 35, n. 3, p. 249-258, 1985.

KOWALAK J. A.; DALLUGE J. J.; MCCLOSKEY J. A.; STETTER K. O. The role of post-transcriptional modifications in stabilization of transfer RNA from hyperthermophiles. **Biochemistry**, v. 33, p. 7869-7876, 1994.

KRUG, M. S.; BERGER L. S. Ribonuclease H activities associated with viral reverse transcriptases are endonucleases Biochem. Proc. Nati. Acad. Sci. USA. **Biochemistry**, v. 22, p. 2365-2373, 1983.

LAGUERRE, G.; ALLARD, M. R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction-fragment-length-polymorphism analysis of PCR-amplified 16S ribosomal-RNA genes. **Environment of Microbiology**, v. 60, p. 56-63, 1994.

LANE, A. N. Solution conformation and dynamics of the octadeoxy-nucleotide d(CACTAGTG)₂: A multinuclear n.m.r. relaxation study. **Carbohydrate Research**, v. 221, p. 123-144, 1991.

LEBARON, P.; JOUX, F. Flow cytometric analysis of the cellular DNA content of *Salmonella typhimurium* and *Alteromonas haloplanktis* during starvation and recovery in seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4345-4350, 1994.

LEE, D. H.; ZO, Y. G.; KIM, S. J. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR single-strand-conformation polymorphism. **Environment of Microbiology**, v. 62, p. 3112-3120, 1996.

LEE, P. K.; MACBETH, T. W.; SORENSON, K. S. JR.; DEEB, R. A.; ALVAREZ-COHEN, L. Quantifying Genes and Transcripts To Assess The In Situ Physiology Of "Dehalococcoides" spp. In A Trichloroethene-Contaminated Groundwater Site. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 9, p. 2728-2739, 2008.

LIESACK, W.; WEYLAND, H.; STACKEBRANDT, E. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. **Microbial Ecology**, v. 21, p. 191-198, 1991.

LIU, W. T.; MARSH, T. L.; CHENG, H.; FORNEY, L. J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Environment of Microbiology**, v. 63, p. 4516-4522, 1997.

- MACNAUGHTON, S. J.; STEPHEN, J. R.; VENOSA, A. D.; DAVIS, G. A.; CHANG, Y. J.; WHITE, D. C. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 81999. p. 3566-3574, 1999.
- MARTINEZMURCIA, A. J.; ACINAS, S. G.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Evaluation of prokaryotic diversity by restrictase digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 17, p. 247- 255, 1995.
- MASSOL-DEYA, M.; ODELSON, D. A.; HICKEY, R. F.; TIEDJE, J. M. Bacterial community fingerprinting of amplified 16 S and 16-23S ribosomal DNA gene sequence and restriction endonuclease analysis (ARDRA). **Molecular Microbial Ecology Manual**, v. 3, p. 1-8, 1995.
- 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. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, p. 712-176, 2008.
- MCKILLIP, J. L.; JAYKUS, L. A.; DRAKE, M. rRNA Stability in Heat-Killed and UV-Irradiated Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4264-4268, 1998.
- MEYERHANS, A.; VARTANIAN, J. P.; WAIN-HOBSON, S. DNA recombination during PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 1687-1691, 1990.
- MILLER, K. Using ImProm-IITM Reverse Transcription System for Coupled RT-PCR. **Promega Notes**, v. 79, p. 15–17, 2001.
- MILLER, L. K.; ORDAL, Z. J. Thermal Injury and Recovery of *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 878-884, 1972.
- MISKIIN, I. P.; FARRIMOND, P.; HEAD, I. M. Identification of bacterial lineages as active members of microbial populations in a freshwater sediment using a rapid RNA extraction procedure and RT-PCR. **Microbiology**, v. 145, p. 1977-1987, 1999.
- MOESENEDER, M. M.; ARRIETA, J. M.; MUYZER, G.; WINTER, C.; HERNDL, G. J. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. **Environment of Microbiology**, v. 65, p. 3518-3525, 1999.
- MOLLET, C.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. **Molecular Microbiology**, v. 26, p. 1005-1011, 1997.
- MORGAN C. A.; HUDSON A.; KONOPKA, A.; NAKATSU C. H. Analyses of microbial activity in biomass-recycle reactors using denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA and 16S rRNA PCR products. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 333-341, 2002.

MORSE, R.; COLLINS, M. D.; OHANLON, K.; WALLBANKS, S.; RICHARDSON, P. T. Analysis of the beta subunit of DNA-dependent RNA polymerase does not support the hypothesis inferred from 16S rRNA analysis that *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) is a tachytelic (fast-evolving) bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 1004-1009, 1996.

MOTER, A.; GOBEL, U. B. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 41, n. 2, p. 85-112, 2000.

MOYER, C. L.; DOBBS, F. C.; KARL, D. M. Estimation of diversity and community structure through restriction-fragment-length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S ribosomal- RNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 871-879, 1994.

MOYER, C. L.; TIEDJE, J. M.; DOBBS, F. C.; KARL, D. M. A Computer-Simulated Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Bacterial Small-Subunit rRNA Genes: Efficacy of Selected Tetrameric Restriction Enzymes for Studies of Microbial Diversity in Nature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 7, p. 2501-2507, 1996.

MUTTER, G. L.; BOYNTON, K. A. PCR bias in amplification of androgen receptor alleles, a trinucleotide repeat marker used in clonality studies. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 1411-1418, 1995.

MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion of Microbiology**, v. 2, p. 317-322, 1999.

MUYZER, G.; BRINKHOFF, T.; NUBEL, U.; SANTEGOEDS, C.; SCHAFER, H.; WAWER, C. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: KOWALCHUK, G. A.; DE BRUIJN, F. J.; HEAD, I. M.; AKKERMANS, A.D.; VAN ELSAS, J. D. (Ed.). **Molecular Microbial Ecology Manual**. London: Kluwer Academic Publishers, 2004. p. 743-770.

MUYZER, G.; DEWAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gelelectrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16S ribosomal-RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 695-700, 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 73, p. 127-141, 1998.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Anton. Leeuw. **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 73, p. 127-141, 1998.

MUYZER, G.; HOTTENTRÄGER, S.; TESKE, A.; WAWER, C. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. **Molecular Microbial Ecology Manual**, v. 3.4.4., p. 1-23, 1996.

MYERS, R. M.; FISCHER, S. G.; LERMAN, L. S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GCclamp can be detected by denaturing gradient gel-electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v. 13, p. 3131-3145, 1985.

NEUFELD, J. D.; MOHN, W. W. Fluorophore-labeled primers improve the sensitivity, versatility, and normalization of denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 4893-4896, 2005.

NIKOLAUSZ, M.; SIPOS, R.; RE'VE' SZ, S.; SZE'KELY, A.; MA' RIALIGETI, K.; Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, p. 385–390, 2005.

NU'BEL, U.; ENGELN, B.; FELSKE, A. J.; SNAIDR, A.; WIESHUBER, R. I.; AMANN, W.; LUDWIG, H.; BACKHAUS. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 5636–5643, 1996.

OGIER, J. C.; SON, O.; GRUSS, A.; TAILLIEZ, P.; DELACROIX-BUCHET, A. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3691-3701, 2002.

OH, E. T.; SO, J. A rapid method for RNA preparation from gram-positive bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 395-398, 2003.

OLSEN, G. J.; JANE, D. J.; GIOVANNONI, S. J.; PACE, N. R. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, p. 337-365, 1986.

ONDA, S.; HIRAISHI, A.; MATSUO Y.; TAKII, S. Polyphasic approaches to the identification of predominant polyphosphate-accumulating organisms in a laboratory-scale anaerobic/aerobic activated sludge system. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 48, p. 43-54, 2002.

ORSINI, M.; ROMANO-SPICA, V. A microwave-based method for nucleic acids isolation from environmental samples. **Applied Microbiology**, v 33, p.1-17, 2001.

OUVERNEY, C. C.; FUHRMAN, J. A. Increase in fluorescence intensity of 16s rRNA in situ hybridization in natural samples treated with chloramphenicol applied and environmental microbiology. **Applied Environment Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2735-2740, 1997.

OVREAS, L. Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. **Ecology Letters**, v. 3, p. 236-251, 2000.

PACE, N. R.; OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. **Cell**, v. 45, p. 325-326, 1986.

PALLANSCH, L.; BESWICK, H.; TALIAN, J.; ZELENKA, P. Use of an RNA folding algorithm to choose regions for amplification by the polymerase chain reaction. **Analitic Biochemistry**, v. 185, p. 57-62, 1990.

PEAKE, I. The polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Pathology**, v. 42, n. 7, p. 673-676, 1989.

PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. Rio de janeiro: McGraw-Hill, 1980. v. 1.

PERNTHALER, A.; PERNTHALER, J.; SCHATTENHOFER, M.; AMANN, R. Identification of DNA-synthesizing bacterial cells in coastal North Sea plankton. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5728-5736, 2002a.

PERNTHALER, A.; PRESTON, C. M.; PERNTHALER, J.; DELONG, E. F.; AMANN, R. Comparison of fluorescently labeled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and archaea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 661-667, 2002b.

PINGOUD, A.; JELTSCH, A. Structure and function of type II restriction endonucleases. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 18, p. 3705-3727, 2001.

PIZZONIA, J. Electrophoresis Gel Image Processing and Analysis Using the KODAK 1D Software. **BioTechniques**, v. 30, n. 6, p. 1316-1321, 2001.

POLZ, M. F.; CAVANAUGH, C. M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3724-3730, 1998.

REYSENBACH, A. L.; GIVER, L. J.; WICKHAM G. S.; PACE, N. R. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3417-3418, 1992.

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, 2000.

ROBLES, J.; DOERS, M. pGEM®-T Vector Systems troubleshooting guide. **Promega Notes**, v. 45, p. 19-20, 1994.

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

ROSENTHAL, L. J.; IANDOLO, J. J. Thermally induced intracellular alteration of ribosomal ribonucleic acid. **Journal of Bacteriology**, v. 103, p. 833–835, 1970.

RUANO, G.; KIDD, K. K. Modeling of heteroduplex formation during PCR from mixtures of DNA templates. **PCR Methods Applied**, v. 2, p. 112–116, 1992.

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

SANGUINETTI C. J.; DIAS NETO E.; SIMPSON, A. J. G. Rapid Silver Staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Bio Techniques**, v. 17, p. 915-919.

SANTEGOEDS C. M.; FERDELMAN, T. G.; MUYZER, G.; DE BEER, D. Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3731-3739, 1998.

SANZ, J. L.; KOCHLING, T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 119–133, 2007.

SARKAR, G.; KAPELNER, S.; SOMMER, S. S. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 7465, 1990.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1501-1506, 2005.

SCHNEIDER, R. P.; TSUTIYA, M. T. **Tratamento de Água, Esgoto e Produção de Água de Reuso Através de Processo de Membranas Filtrantes**. Local: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária, 2001. p. 234.

SCHNEIDER, R. P.; FERREIRA, L. M.; BINDER, P. O.; RAMOS J. R. Analysis of foulant layer in all elements of an RO train. **Journal of Membrane Science**, v. 261, p. 152-162, 2005.

SCHNEIDER, R. P.; FERREIRA, L. M.; BINDER, P.; BEJARANO, E. M.; GÓES, K. P.; SLONGO, E.; MACHADO C. R.; ROSA, G. M. Z. Dynamics of Organic Carbon and of Bacterial Populations in a Conventional Pretreatment Train of a Reverse Osmosis Unit Experiencing Severe Biofouling. **Journal of Membrane Science**, v. 266, p. 18-29, 2005.

SEKIGUCHI, H.; TOMIOKA, N.; NAKAHARA, T.; UCHIYAMA, H. A single band does not always represent single bacterial strains indenaturing gradient gel electrophoresis analysis. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1205-1208, 2001.

SHEN, J.; ZHANG, B.; WEI, G.; PANG, X.; WEI, H.; LI, M.; ZHANG, Y.; ZHAO, L. Molecular profiling of the *Clostridium leptum* subgroup in human fecal microflora by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 8, p. 5232-5238, 2006.

SIMMON, K. E.; STEADMAN, D. D.; DURKIN, S. ; BALDWIN, A.; JEFFREY, W. H.; SHERIDAN, P.; HORTON, R.; SHIELDS, M. S. Autoclave method for rapid preparation of bacterial PCR-template DNA. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 143– 149, 2004.

SIMON, T. P.; DUFOUR, R. L.; FISHER, B. E. Changes in the biological integrity of fish assemblages in the Patoka River drainage as a result of anthropogenic disturbance from 1888 to 2001. **American Fisheries Society Symposium**, v. 45, p. 383-398, 2005.

SMALLA, K.; WACHTENDORF, U.; HEUER, H.; LIU, W. T.; FORNEY, L. Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1220-1225, 1998.

STEPHEN, J. R.; CHANG, Y. J.; MACNAUGHTON, S. J.; WHITAKER, S. L.; HICKS, C. L.; LEUNG, K. T.; FLEMMING, C. A.; WHITE, D. C. Fate of a metal-resistant inoculum in contaminated and pristine soils assessed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 1118-1123, 1999.

STOECK, T.; KASPER, J.; BUNGE, J.; LESLIN, C.; ILYIN, V.; EPSTEIN, S. Protistan diversity in the Arctic: A case of paleoclimate shaping modern biodiversity? **Plos ONE**, v 2, n. 8, p. 728, 2007.

SUAU, A.; BONNET, R.; SUTREN, M.; GODON, J. J.; GIBSON, G. R.; COLLINS, M. D.; DORÉ, J. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n.11, p. 4799-4807, 1999.

SUN, H. Y.; DENG, S. P.; RAUN, W. R. Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 5868–5874, 2004.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature**, v. 6, p. 199-210, 2008.

SUZUKI, M. T.; GIOVANNONI, S. J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 625–630, 1996.

SZEWZYK, R.; FEUERPFEL, I. Antibiotic resistance in the environment. Schriftenreihe des Vereins fur Wasser. **Boden- und Lufthygiene**, v. 106, p. 59-62, 2000.

TEJOWULAN, R. S. Removal of trace metals from contaminated soils using EDTA incorporating resin trapping techniques. **Environmental Pollution**, v. 103, n. 1, p. 103-135. (1998)

TIEDJE, J. M.; ASUMING-BREMPPONG, S.; NUSSEIN, K.; MARSH, T. L.; FLYNN, S. J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, v. 13, n. 2, p. 109-122, 1999.

TIPPER, J. C. An algol program for dissimilarity analysis: a divisive-omnithetic clustering technique. **Computers and Geosciences**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 1979.

TORSVIK V.; DAAE F. L.; SANDAA R, A; OVREAS L. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Biotechnology**, v. 64, p. 53-62, 1998.

UEDA, K.; SEKI, T.; KUDO, T.; YOSHIDA, T.; KATAOKA, M. Two distinct iron-sulphur world. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 58, p. 85-201, 1999.

VAUGHAN, E. E.; HEILIG, H. G. H. J.; ZOETENDAL. E. G.; SATOKARI, R. COLLINS, J. K.; AKKERMANS, A. D. L; DE VOS, W. M. Molecular approaches to study probiotic bacteria. **Trends Food Science Technology**, v. 10, p. 400-404, 1999.

VERGNE, J.; JEAN, A. H.; COGNET, B.; SZATHMÁRY, E.; MAUREL, M. C. *In vitro* selection of halo-thermophilic RNA reveals two families of resistant RNA. **Gene**, v. 371, p. 182-193, 2006.

VON WINTZINGERODE, F.; GOBEL, U. B; STACKEBRANDT, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, p. 213-229, 1997.

WANG, G. C. Y.; WANG, Y. Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4645-4650, 1997.

WEIDNER, S.; ARNOLD, W.; PUHLER, A. Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 766-771, 1996.

WHEELIS, M. L.; KANDLER, O.; WOESE, C. R. On the nature of global classification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 2930-2934, 1992.

WHITE, D. C.; FINDLAY, R. H. Biochemical markers for measurement of predation effects on the biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial biofilms. **Hydrobiologia**, v. 159, n. 1, p. 119-132, 1988.

WHITFORD, M. F.; FORSTER, R. J.; BEARD, C. E.; GONG, J.; TEATHER, R. M. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. **Anaerobe**, v. 4, n. 3, p. 153-163, 1998.

WILFINGER, W. W.; MACKEY, K.; CHOMCZYNSKI, P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. **BioTechniques**, v. 22, n. 3, p. 474-481, 1997.

WILSON, K. H.; BLITCHINGTON, R. B. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 7, p. 2273-2278, 1996.

WOO, I. S.; RHEE, I. K.; PARK, H. D. Differential Damage in Bacterial Cells by Microwave Radiation on the Basis of Cell Wall Structure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2243-2247, 2000.

WUERTZ, S.; OKABE, S.; HAUSNER, M. Microbial communities and their interactions in biofilm systems: An overview. **Water Science and Technology**, v. 49 n. 11-12, p. 327-336, 2004.

YAKHNIN, A. V.; VINOKUROV, L. M.; SURIN, A. K.; ALALHOV, Y. B. Green fluorescent protein purification by organic extraction. **Protein Expression Purified**, v. 14, p. 382-386, 1998.

ZHONG, X.; LUO J.; STEVENS, E. J. R. Isolation of full length RNA from a thermophilic Cyanobacterium. **Biotechniques**, v. 23, p. 904-910, 1997.

ZOETENDAL, E. G.; COLLIER, C. T.; KOIKE, S.; MACKIE, R. I.; GASKINS, H. R. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A review. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 465-472, 2004.

ZWART, G.; CRUMP, B. C.; KAMST, V.; AGTERVELD, M. P.; HAGEN, F.; HAN, S. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 28, p. 141-155, 2002.