PRISCILA IKEDA USHIMARU

**APLICAÇÃO DE METODOLOGIAS
DE ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS
AINDA “NÃO-CULTIVADAS” EM
ECOSSISTEMAS MARINHOS**

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

**São Paulo
2011**

PRISCILA IKEDA USHIMARU

**APLICAÇÃO DE METODOLOGIAS
DE ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS
AINDA “NÃO-CULTIVADAS” EM
ECOSSISTEMAS MARINHOS**

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

Área de Concentração:
Biotecnologia

Orientadora:
Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari

**São Paulo
2011**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Ushimaru, Priscila Ikeda.

Aplicação de metodologias de isolamento de bactérias ainda "não-cultivadas" em ecossistemas marinhos / Priscila Ikeda Ushimaru. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Vivian Helena Pellizari.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Microbiologia ambiental.

Versão do título para o inglês: Applications of methods for isolating uncultured bacteria in marine environments.

Descritores: 1. Método de cultivo de alto desempenho (HTC) 2. Isolamento de bactérias "não-cultivadas" 3. Ambiente marinho 4. Alcano monooxigenases (genes *alk*) I. Pellizari, Vivian Helena II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB077/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Priscila Ikeda Ushimaru.

Título da Dissertação: Aplicação de metodologias de isolamento de bactérias ainda "não-cultivadas" em ecossistemas marinhos.

Orientador(a): Vivian Helena Pellizari.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente a Força Divina e meus mestres/mentores por todas as proteções e ensinamentos recebidos, por ter a permissão de vivenciar esta importante etapa da minha vida, podendo ser da melhor forma possível útil para esta civilização;

Aos meus pais primeiramente, e toda minha família pelo amplo apoio e paciência, por contribuir em toda minha educação e fornecer todas as condições para meu desenvolvimento;

À minha orientadora, Profa. Dra. Vivian H. Pellizari, pela permissão de realizar meu projeto de estudo em seu laboratório, por todas as orientações e aprendizados, enriquecendo minha formação acadêmica, que me conduzirão para alcançar meus objetivos profissionais;

À todos os companheiros (dominantemente as companheiras) de laboratórios, desde que iniciei minha vivência no Instituto de Ciências Biomédicas e atualmente no Instituto Oceanográfico, por todas as colaborações, contribuições, consultorias e principalmente, pela amizade dentro e fora do laboratório;

À Maysa Pompeu e ao Prof. Dr. Salvador A. Gaeta, que coordenam o Laboratório de Produção Primária, no Instituto Oceanográfico-USP, pela coleta e dados das amostragens para realização do meu projeto;

À Márcia Maria Parma e ao Dr. Itamar Soares, que supervisiona o Laboratório Microbiologia Ambiental (LMA), EMBRAPA Meio Ambiente, pela realização das análises do FAME;

À todos os Funcionários da USP, que desempenham todos os dias os seus trabalhos para que os Institutos da USP possam ser administrados e todos nós possamos trabalhar de maneira mais eficaz;

Aos meus amigos cariocas Karen Tavares e Juliano Cury, da UFRJ, e às minhas amigas Gabriela Martins Reis, Liliana de Oliveira Rocha e Luciana Ambrosio Tófoli, pelos auxílios e colaborações para desenvolvimento deste trabalho;

Ao CNPq pela concessão da bolsa durante o mestrado;

Ao MCT, SECIRM e CNPq-Proantar pelo auxílio financeiro e pelo apoio à pesquisa brasileira na Antártica;

À todas(os) amigas e amigos de coração que tenho tido a oportunidade de conhecer durante todos esses meus aninhos, pela amizade sincera, pelas companhias, e também pelas mínimas e enormes ajudas que me deram e que pude retribuir de alguma forma;

Neste momento, meus agradecimentos estão descritos e definidos em poucas palavras, mas, na verdade, representam um profundo e sincero humilde sentimento de gratidão que pode ser expandido por todo universo.

MUITO OBRIGADA!!

DÔMO ARIGATÔ GOZAIMASU!!

どうもありがとうございます

*"A vida é o resultado do que
alcançamos a cada hoje."*

*"Não devemos ter medo dos confrontos...
Até os planetas se chocam
e do caos nascem as estrelas."*

RESUMO

USHIMARU, P. I. **Aplicação de metodologias de isolamento de bactérias ainda “não-cultivadas” em ecossistemas marinhos.** 2011. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Apesar dos avanços no conhecimento da biodiversidade de micro-organismos marinhos, muitas espécies ainda persistem desconhecidas. As técnicas, que permitiram o cultivo de bactérias ainda "não-cultivadas", as quais podem pertencer a grupos dominantes no ambiente marinho, requerem abordagens diferentes dos métodos padrões de cultivo, visando promover de forma semelhante as condições naturais de seu habitat para favorecer ao máximo seu crescimento. O objetivo dessa pesquisa foi aplicar duas metodologias para isolamento de bactérias ainda "não-cultivadas", em amostras de água do mar de Ubatuba (Estado de São Paulo, Brasil) e da Baía do Almirantado, Ilha Rei George (Antártica), que são conhecidas apenas por suas sequências genômicas; e também, encontrar os hospedeiros dos genes *alk* recém-descritos em clones de bibliotecas metagenômicas no ambiente marinho. Pela adaptação do método de cultivo de alto desempenho (método HTC), que emprega o princípio da diluição-até-extinção, foi possível isolar quatro culturas bacterianas, nas quais duas podem ser consideradas ainda “não-cultivadas”, e foram identificadas através das análises filogenéticas do gene rRNA 16S. Ao aplicar o método de inóculo em meio de cultura diluído 1/10, nas amostras de água do mar antártico, 81 isolados bacterianos foram identificados pela análise do gene rRNA 16S, sendo que um deles, é candidato a um isolado "não-cultivado". Outras abordagens fenotípicas e genômicas serão necessárias para definir a caracterização taxonômica destas bactérias "não-cultivadas" obtidas. A presença dos genes *alkB*, *alkB4* e *alkM*, que codificam para alcano monoxigenases, foi detectada em onze isolados bacterianos antárticos, destes, um representante do gênero *Sphingomonas*, apresentou similaridade com uma sequência de gene *alkM*, recém-descrita em um dos clones ambientais de sedimentos, na mesma região de coleta, Botany Point, encontrados em estudo prévio. Dessa forma, este estudo contribuiu na identificação taxonômica de bactérias consideradas ainda "não-cultivadas" do ambiente marinho e na obtenção de isolados com potencial ainda não explorado para emprego biotecnológico, como na área de biodegradação de hidrocarbonetos.

Palavras-chave: Método de cultivo de alto desempenho (HTC). Isolamento de bactérias "não-cultivadas". Ambiente marinho. Alcano monoxigenases (genes *alk*).

ABSTRACT

USHIMARU, P. I. **Applications of methods for isolating uncultured bacteria in marine environments.** 2011. 101 p. Master's Thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2011.

In spite of the extensive studies on marine microbial diversity, many prokaryotes are still unknown. The efficient cultivation techniques to isolate not-yet cultured bacteria, which can represent the predominant marine taxa, have the purpose of reproducing the natural conditions of the habitats to improve their growth. Therefore, this study aimed to apply two different methods for culturing marine bacteria in order to isolate uncultured representatives from Ubatuba seawater (São Paulo coast, Brazil) and from Admiralty Bay, King George Island (Antarctica). The objectives of the study also included the identification of these novel bacteria and detection of functional genes (*alk* genes) in these same isolated hosts, once *alk* genes have been previously described in clones of metagenomic libraries from marine environments. The adapted high-throughput culturing (HTC) procedures, that utilize the concept of dilution-to-extinction, allowed to obtain four isolates. Two of them are uncultured bacteria candidates from coastal seawater studied and were identified by phylogenetic analysis for 16S rRNA genes. The use of traditional plating on 1/10 dilution of agar media for the Antarctic seawater samples, allowed the isolation of 81 cultures that were identified by 16S rRNA sequence-based approaches. One of these isolates is most likely to be an uncultured micro-organism. For taxonomic purposes, several other phenotypic and genomic methods must be applied for the further characterization of these uncultured bacteria. The *alk* genes (*alkB*, *alkB4* e *alkM*), which encode to alkane monooxygenases, were detected in eleven bacterial isolates from Antarctica. One of these isolates, member of the genus *Sphingomonas*, showed similarity to the sequence of an *alkM* gene, described in previous work in environmental clone libraries of sediments, from the same sampling area (Botany Point, Admiralty Bay). This study provided taxonomical identification of uncultured bacteria candidates from marine environment and obtained isolates with potential not-yet exploited for biotechnology applications, as in biodegradation of hydrocarbons.

Key-words: High-throughput culturing method (HTC). Uncultured bacteria. Marine environment. Alkane monooxygenases (*alk* genes).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura microbiana de um ecossistema marinho	18
Figura 2.	Árvore filogenética ilustrando a diversidade de bactérias aeróbicas que podem degradar hidrocarbonetos provenientes de ambientes marinhos contaminados por óleos	20
Figura 3.	Números de Filos-Divisões (Filos com membros cultivados + Divisões candidatos com representantes “não-cultivados” identificados, desde 1987, nos Domínios Bacteria (linha preta) e Arqueia (linha cinza), e números de Filos com representantes cultivados (linha tracejada)	22
Figura 4.	Linha do tempo destacando os micro-organismos marinhos cultivados ao longo dos anos	30
Figura 5.	Imagens de microscopia por epifluorescência dos novos isolados bacterianos obtidos pelo método HTC	31
Figura 6.	Mapeamento das contagens das densidades celulares dos subclados Ia (a), Ib (b) e II (c) de SAR11 nas profundidades de 0-300 m, entre os anos 2003 e 2005	34
Figura 7.	Árvore filogenética mostrando os principais grupos bacterioplânctons marinhos e os tamanhos de seus genomas completos	36
Figura 8.	Localização do ponto de coleta (UBA) na região próxima a área da Enseada do Flamengo, Ubatuba, SP, Brasil, referente a amostragem para aplicação do método de cultivo de alto desempenho	38
Figura 9.	Mapas de referências (A: Península Antártica; B: Ilha Rei George; C: Baía do Almirantado), destacando os três pontos de amostragem na Baía do Almirantado: Botany Point (P. BOT.), Comandante Ferraz (EACF) e Punta Ullman (P. ULL). Os três pontos indicados com círculos totalmente preenchidos de cor preta se referem às amostras de água do mar coletadas, para serem empregadas pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10. O ponto marcado em itálico, <i>Punta Ullman (P. ULL)</i> , representa a amostragem para aplicação do método HTC	39
Figura 10.	Fluxograma do método de cultivo de alto desempenho (HTC)	41
Figura 11.	Fluxograma da técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10	42
Figura 12.	Fotos da cultura (ANT-01) da amostra de água marinha de Punta Ullmann, Antártica, coradas com kit Live/Dead BacLight Bacterial Viability e visualizadas pela microscopia de epifluorescência. Coloração verde representa as células viáveis	50
Figura 13.	Fotos das culturas da amostra de água marinha de Ubatuba, coradas com kit Live/Dead BacLight Bacterial Viability e visualizadas pela microscopia de epifluorescência	51

Figura 14. Fotos de eletroforese em gel de agarose das amplificações para gene rRNA 16S das culturas isoladas pelo método HTC	52
Figura 15. Foto do gel de agarose 4%, corado em brometo de etídeo, com as quatro culturas isoladas pelo método HTC, que foram submetidas pela técnica de RFLP com duas enzimas de restrição: <i>HaeIII</i> e <i>MboI</i>	54
Figura 16. Fotos de eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR purificados para gene rRNA 16S das culturas isoladas pelo método HTC	55
Figura 17. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pelo método HTC e as sequências com maiores identidades no banco de dados. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Jukes e Cantor e teste de <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas através do programa MEGA .	56
Figura 18. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pelo método HTC e as sequências com maiores identidades no banco de dados. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Kimura 2-parâmetros e teste de <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas através do programa MEGA	56
Figura 19. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pelo método HTC e as sequências com maiores identidades no banco de dados. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Jukes e Cantor e teste de <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas através do programa ARB	57
Figura 20. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pelo método HTC e as sequências com maiores identidades no banco de dados. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Kimura 2-parâmetros e teste de <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas através do programa ARB	58
Figura 21. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas UBA-01 e UBA-02 isoladas pelo método HTC e as sequências com maiores identidades no banco de dados. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Jukes e Cantor e teste de <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas através do programa ARB	60
Figura 22. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre a cultura UBA-03 isoladas pelo método HTC e as sequências com maiores identidades no banco de dados. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Jukes e Cantor e teste de <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas através do programa ARB	61
Figura 23. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre a cultura ANT-01 isolada pelo método HTC e as sequências com maiores identidades no banco de dados. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Jukes e Cantor e teste de <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas através do programa ARB	62
Figura 24. Foto de microscopia eletrônica de transmissão do isolado ANT-01 obtido pelo método HTC	65
Figura 25. Fotos de microscopia eletrônica de varredura das quatro culturas isoladas pelo método HTC	66

Figura 26. Foto de gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídeo, da extração de DNA total dos isolados obtidos pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10	71
Figura 27. Foto de eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR purificados para genes rRNA 16S dos isolados obtidos pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10	71
Figura 28. Representação gráfica dos representantes dos grupos taxômicos relacionados com os isolados obtidos na área de estudo antártico, através da técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10	72
Figura 29. Frequências dos grupos filogenéticos dos isolados bacterianos encontrados nos pontos de coleta pela análise do gene rRNA 16S	73
Figura 30. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10 e as sequências com maiores identidades no banco de dados. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Jukes e Cantor e teste de <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas através do programa MEGA	74
Figura 31. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para a Classe <i>Gammaproteobacteria</i> . Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Jukes e Cantor e teste de <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas através do programa MEGA	76
Figura 32. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para a Classe <i>Alphaproteobacteria</i> . Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Jukes e Cantor e teste de <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas através do programa MEGA	77
Figura 33. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para a Classe <i>Betaproteobacteria</i> . Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Jukes e Cantor e teste de <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas através do programa MEGA	78
Figura 34. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para o Filo <i>Actinobacteria</i> . Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Jukes e Cantor e teste de <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas através do programa MEGA .	79

Figura 35. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para a Classe <i>Gammaproteobacteria</i> . Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Kimura 2-parâmetros e teste de <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas através do programa MEGA	80
Figura 36. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para a Classe <i>Alphaproteobacteria</i> . Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Kimura 2-parâmetros e teste de <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas através do programa MEGA	81
Figura 37. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para a Classe <i>Betaproteobacteria</i> . Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Kimura 2-parâmetros e teste de <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas através do programa MEGA	82
Figura 38. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para o Filo <i>Actinobacteria</i> . Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Kimura 2-parâmetros e teste de <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas através do programa MEGA	83
Figura 39. Foto de eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR purificados para genes <i>alk</i> dos isolados obtidos pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10	87
Figura 40. Árvore filogenética das seqüências dos representantes do gene <i>alk</i> dos isolados marinhos bacterianos correlacionados com clones ambientais da Antártica. Os isolados estão marcados com caixa cinza; clones ambientais de CF em vermelho, de BP em azul, e de PU em verde	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classes de enzimas envolvidas na oxidação de alcanos	19
Tabela 2 -	Localização georeferenciada dos pontos de amostragem e profundidade de coleta	37
Tabela 3 -	Descrição dos iniciadores degenerados que foram utilizados para amplificar os genes que codificam as enzimas alceno monoxigenase	46
Tabela 4 -	Valores correspondentes às contagens totais das amostras de água do mar coletadas neste estudo	49
Tabela 5 -	Resultado das similaridades das sequências para gene rRNA 16S das culturas isoladas pelo método HTC quando comparadas com as sequências depositadas no banco de dados RDPII	55
Tabela 6 -	Composição celular dos ácidos graxos da cultura isolada, UBA-03, pelo método HTC, proveniente da amostras de água do mar de Ubatuba	63
Tabela 7 -	Composição celular dos ácidos graxos da cultura isolada, ANT-01, pelo método HTC, proveniente das amostras de água do mar da Antártica	64
Tabela 8 -	Síntese dos resultados das análises realizadas neste estudo	67
Tabela 9 -	Locais e profundidades das amostragens de água do mar coletadas na Península Antártica	69
Tabela 10 -	Dados do isolamento de bactérias das amostras de água marinha antártica	70
Tabela 11 -	Composição celular dos ácidos graxos da cultura isolada, SL CF5(L), pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10, proveniente das amostras de água do mar da Antártica	85
Tabela 12 -	Composição celular dos ácidos graxos da cultura isolada, SL 26.9(L), pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10, proveniente das amostras de água do mar da Antártica	85
Tabela 13 -	Identificação filogenética pela análise do gene rRNA 16S e genes <i>alk</i> das sequências nucleotídicas das bactérias isoladas de amostras de água marinha da Antártica	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Alks: Enzimas Alcano monoxigenases

Alks: Genes Alcano monoxigenases

ARHDs: Dioxigenases que Hidroxilam Anéis Aromáticos (enzimas e genes)

BLASTN: *Basic Local Alignment Search Tool for nucleotide*

BP: Botany Point (ponto amostral)

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CF: Comandante Ferraz (ponto amostral)

DAPI: 4', 6' - diamidino - 2 - fenilindole

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DOC: Carbono orgânico dissolvido

FAME: Análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular

HPAs: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

HTC: *High-Throughput Culturing*

MCT: Ministério de Ciência e Tecnologia

Método HTC: Método de cultivo de alto desempenho

NCBI: Centro de Informação Biotecnológica

pb: pares de bases

PCBs: Bifenilos policlorados

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PU: Punta Ullmann (ponto amostral)

RDPII: Ribosomal Database Project

RFLP: Análise de restrição de fragmentos polimórficos

rRNA: ácido ribonucleico ribossômico

SECIRM: Secretaria da Comissão Interministerial para Recursos do Mar

UFC: Unidade formadora de colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Objetivos	27
<i>1.1.1 Objetivo Geral</i>	<i>27</i>
<i>1.1.2 Objetivos Específicos</i>	<i>27</i>
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Amostras	37
3.2 Contagem de bactérias totais	40
3.3 Métodos de cultivo	41
<i>3.3.1 Método de cultivo de alto desempenho (HTC).....</i>	<i>42</i>
<i>3.3.1.1 Preparação do meio de cultura e do inóculo</i>	<i>42</i>
<i>3.3.1.2 Detecção de crescimento nas microplacas</i>	<i>43</i>
<i>3.3.1.3 Caracterização das culturas</i>	<i>43</i>
<i>3.3.1.3.1 Análise de restrição de fragmentos polimórficos (RFLP) e sequenciamento dos isolados obtidos</i>	<i>43</i>
<i>3.3.1.3.2 Análise Filogenética</i>	<i>45</i>
<i>3.3.1.3.3 Iniciadores degenerados para amplificação dos genes <i>alk</i></i>	<i>45</i>
<i>3.3.2 Técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10</i>	<i>46</i>
3.4 Testes adicionais para caracterização dos isolados	47
<i>3.4.1 Análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (Fatty Acid Methyl Ester - FAME).....</i>	<i>47</i>
<i>3.4.2 Microscopia eletrônica de varredura e de transmissão</i>	<i>48</i>

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Contagem de bactérias totais	49
4.2 Método de cultivo de alto desempenho (HTC)	49
<i>4.2.1 Detecção de crescimento nas microplacas</i>	<i>50</i>
<i>4.2.2 Extração de DNA total das culturas obtidas</i>	<i>51</i>
<i>4.2.3 Amplificação do gene rRNA 16S</i>	<i>52</i>
<i>4.2.4 Análise de restrição de fragmentos polimórficos (RFLP).....</i>	<i>52</i>
<i>4.2.5 Identificação e análise filogenética das culturas puras obtidas</i>	<i>54</i>
<i>4.2.6 Testes adicionais</i>	<i>63</i>
<i>4.2.6.1 Análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (Fatty Acid Methyl Ester - FAME)</i>	<i>63</i>
<i>4.2.6.2 Microscopia eletrônica de varredura e de transmissão</i>	<i>65</i>
<i>4.2.7 Detecção de genes alk nas culturas isoladas</i>	<i>68</i>
4.3 Técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10	69
<i>4.3.1 Isolamento através do Agar Marinho diluído 1/10</i>	<i>69</i>
<i>4.3.2 Extração de DNA e Amplificação do gene rRNA 16S</i>	<i>70</i>
<i>4.3.3 Identificação do gene rRNA 16S e análise filogenética</i>	<i>72</i>
<i>4.3.4 Testes Adicionais</i>	<i>84</i>
<i>4.3.4.1 Análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (Fatty Acid Methyl Ester - FAME)</i>	<i>84</i>
<i>4.3.5 Identificação dos genes alk e análise filogenética</i>	<i>86</i>
5 CONCLUSÕES	91
5.1 Técnica de cultivo de alto desempenho	91
5.2 Técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10	91
REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

Micro-organismos marinhos são excepcionalmente importantes para a vida como nós o sabemos. Há mais de dois bilhões de anos atrás, a geração de oxigênio pelos micro-organismos fotossintéticos marinhos ajudou a moldar a composição química do ambiente atual, no qual plantas, animais e todas as outras formas de vida têm evoluído (HUNTER-CEVERA et al., 2005).

Desde o início da vida nos oceanos, micro-organismos marinhos são os descendentes vivos mais próximos das formas ancestrais responsáveis pela origem da vida no planeta. Devido à sua grande versatilidade metabólica, os micro-organismos marinhos participam de diferentes etapas dos ciclos biogeoquímicos, não realizadas por outros organismos (Figura 1). O bom funcionamento destes ciclos é essencial para o equilíbrio da vida na Terra. No entanto, este equilíbrio pode ser afetado em decorrência de diferentes impactos antropogênicos, incluindo as mudanças climáticas globais.

Os habitats microbianos nos oceanos são influenciados por muitos determinantes ambientais, incluindo salinidade, correntes, quantidade de matéria orgânica, temperatura, luz, e outros efeitos climáticos, podendo cada um destes fatores alterar a composição das comunidades microbianas marinhas de diversas maneiras. Também, no meio marinho, as interfaces existentes, como entre ar e água, água e sedimento ou a superfície de hospedeiros tendem a concentrar maior diversidade e atividade biológica.

Sabe-se atualmente que os micro-organismos são encontrados nas diferentes regiões dos oceanos, denominadas eufótica (0-150 m), mesopelágica (150-1000 m), batopelágica (>1000 m) ou bentônica (HUNTER-CEVERA et al., 2005; BROWN et al., 2009), onde se encontram em vida livre, como simbiontes ou podem estar organizados como biofilmes, além de serem encontrados também em ambientes extremos, como as regiões de exudação termal ou frias (CASSLER et al., 2008; HIRAYAMA et al., 2007). No entanto, como muitas espécies persistem desconhecidas, são necessários maiores estudos para compreender sua complexidade (HUNTER-CEVERA et al., 2005).

Figura 1. Estrutura microbiana de um ecossistema marinho. Uma grande fração da matéria orgânica que é sintetizada pelos produtores primários torna-se matéria orgânica dissolvida (MOD) e é consumida exclusivamente por bactérias e arqueias. A maior parte da MOD é transformada em dióxido de carbono, sendo liberada para ambiente através da respiração; e uma fração é assimilada e re-introduzida pela cadeia alimentar: fitoplâncton → zooplâncton → peixes. A ação das bactérias na matéria orgânica realiza o principal papel no ciclo do carbono através da MOD. Dessa forma, influencia nas trocas de dióxido de carbono entre a interface ar-água e nos estoque e fluxo de carbono para outros organismos marinhos. DMS: dimetilsulfureto; hv: luz; POM: matéria orgânica particulada; DOM: MOD.

Fonte: Adaptação de Azam e Malfatti (2007).

Outra importância do avanço no conhecimento da biodiversidade funcional dos micro-organismos marinhos é seu potencial para a exploração biotecnológica. Esta pode ser empregada, por exemplo, na produção de energia e novos compostos bioativos, que podem ter aplicação na indústria farmacêutica, cosmética ou alimentícia e também na tecnologia da biorremediação.

Sabe-se que os produtos petrolíferos compreendem uma questão especial nos oceanos, onde acidentes a bordo dos navios petroleiros ou no processo de exploração podem liberar milhares de litros de petróleo em um único incidente. A capacidade metabólica de degradação de hidrocarbonetos tem sido relatada em diversos estudos por diferentes espécies bacterianas em vários habitats, inclusive em regiões polares (LUZ et al., 2006; WEID et al., 2007). Entretanto, os conhecimentos sobre o funcionamento das bactérias para eliminação do óleo

contaminante em áreas pelágicas e dos genes envolvidos na oxidação de alcanos, permanecem escassos (WANG et al., 2010).

Os alcanos constituem aproximadamente de 20-50% do óleo bruto, dependendo da sua fonte de origem. Os hidrocarbonetos alifáticos correspondem a uma ampla classe de compostos orgânicos de cadeia aberta, saturados e insaturados. Pertencem à esta classe: os alcanos e ciclo-alcanos (cadeia normal e ramificada saturada), alcenos e ciclo-alcenos (cadeia normal e ramificada insaturada), alcinos, terpanos, hopanos e esteranos, entre outros. Os hidrocarbonetos alifáticos podem ser sintetizados pelas plantas, algas e bactérias, como elementos de estrutura (ceras cuticulares, lipídios de membrana), mecanismos de defesa ou substâncias quimioatrativas (VAN BEILEN et al., 2003).

Tabela 1 - Classes de enzimas envolvidas na oxidação de alcanos (Adaptação de van Beilen e Funhoff, 2007).

Classe Enzimática	Composição e cofatores	Substrato	Exemplos de hospedeiros	Referência
Metano solúvel monooxigenase (sMMO)	$\alpha_2\beta_2\gamma_2$ hidroxilase; ferro dinuclear redutase, [2Fe-2S], FAD, NADH	C1-C8 (halogenados)-alcanos, alcenos, cicloalcanos	<i>Methylococcus</i> , <i>Methylosinus</i> , <i>Methylocystis</i> , <i>Methylomonas</i> , <i>Methylocella</i>	McDonald et al., 2006
Metano particulado monooxigenase (pMMO)	Trímero de $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ hidroxilase composto por PmoA, PmoB e PmoC; cobre mono e dinuclear em PmoB	C1-C5 (halogenados)-alcanos, alcenos	<i>Methylococcus</i> , <i>Methylosinus</i> , <i>Methylocystis</i> , <i>Methylobacter</i> , <i>Methylomonas</i> , <i>Methylomicrobium</i> , etc.	McDonald et al., 2006
Hidroxilases de alcano AlkB-relacionados	Membrana hidroxilase; rubredoxina ferro dinuclear; rubredoxina redutase ferro mononuclear, FAD, NADH	C5-C16 alcanos, ácidos graxos, alquilbenzenos, cicloalcanos, etc.	<i>Acinetobacter</i> , <i>Alcanivorax</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i> , etc.	van Beilen et al., 2003
P450 eucariótico (CYP52, Classe II)	Oxigenase microsomal; P450 heme-redutase; FAD, FMN, NADPH	C10-C16 alcanos, ácidos graxos	<i>Candida maltosa</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>	Iida et al., 2000
Sistemas bacterianos de oxigenases P450 (CYP153, Classe I)	Oxigenase P450; heme-ferrodoxina P450; ferro-enxofre ferrodoxina redutase, FAD, NADH	C5-C16 alcanos, cicloalcanos, alquilbenzenos, etc.	<i>Acinetobacter</i> , <i>Alcanivorax</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Sphingomonas</i> , etc.	van Beilen et al., 2006
Dioxigenase	Homodímero; cobre, FAD	C10-C30 alcanos	<i>Acinetobacter</i> sp. M-1	Maeng et al., 1996

O primeiro passo na degradação aeróbica de alcanos pelas bactérias, leveduras e fungos, é catalizada pelas oxigenases (Tabela 1). Estas enzimas, as quais introduzem átomos de oxigênio formando substratos derivados de alcanos (álcoois), empregam um importante papel na biorremediação e na degradação de co-metabólitos de compostos, como, tricloroetileno e combustíveis oxigenados. Os principais papéis das oxigenases são: a

iniciação de biodegradação e detoxificação de potenciais fontes de carbono e compostos tóxicos, e a biossíntese de metabólitos secundários, hormônios e moléculas sinalizadoras (VAN BEILEN et al., 2003; VAN BEILEN e FUNHOFF, 2005).

Dependendo do tamanho das cadeias de alcano dos substratos, diferentes sistemas enzimáticos são exigidos para a introdução do oxigênio no substrato e iniciar a biodegradação (Tabela 1) (VAN BEILEN e FUNHOFF, 2007).

Figura 2. Árvore filogenética ilustrando a diversidade de bactérias aeróbicas que podem degradar hidrocarbonetos provenientes de ambientes marinhos contaminados por óleos. Os micro-organismos apresentados em azul possuem capacidade de degradar hidrocarbonetos saturados, enquanto os que estão coloridos em vermelho podem degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.

Fonte: Head; Jones; Röling, 2006.

Uma revisão relatou que 79 gêneros bacterianos podem utilizar hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia, incluindo nove gêneros de cianobactérias, além de 103 gêneros de fungos e 14 de algas, conhecidas pelo potencial em degradar ou transformar hidrocarbonetos (HEAD; JONES; RÖLING, 2006). Dessa forma, muitas bactérias importantes biodegradadoras de hidrocarbonetos no ecossistema marinho já foram descritas (Figura 2).

Abordagens inovadoras em pesquisas no campo da microbiologia marinha devem incorporar as novas ferramentas da genômica e metagenômica, entretanto sem excluir outros métodos de cultivo tradicionais (ALAIN e QUERELLOU, 2009). A extração de marcadores moleculares filogenéticos (como o rRNA) dos ambientes naturais representou um importante desenvolvimento na biologia microbiana. As descobertas resultantes dos métodos independentes de cultivo incluem o reconhecimento de novas linhagens filogenéticas, inclusive a de "não-cultivados", o mapeamento de distribuição dos táxons em alguns habitats inesperados e a avaliação da diversidade microbiana que a abordagem tradicional de cultivo impossibilitava. Avanços nas tecnologias de sequenciamento genômico tiveram grande impacto sobre biologia microbiana na década de 90, fornecendo novas descobertas sobre evolução microbiana, bioquímica, fisiologia e diversidade (DELONG, 2005).

Através do sequenciamento de genes funcionais e taxonômicos realizados a partir de bibliotecas metagenômicas, foi possível detectar a abundância e diversidade dentro dos diferentes Filos (DOJKA; HARRIS; PACE, 2000; ESCHENFELDT et al., 2001; HARRIS; KELLEY; PACE, 2004; KÖPKE et al., 2005; DAI et al., 2006; RANCHOU-PEYRUSE et al., 2006; CASSLER et al., 2008; YING et al., 2007; SAPP; WICHELS; GERDTS, 2007; HATAMOTO et al. 2007). Atualmente existem instrumentos estatísticos para estimar a riqueza de uma biblioteca metagenômica e diversos autores têm utilizado os resultados das bibliotecas de clones e procedimentos estatísticos para estimar número de táxons microbianos no oceano em um nível global (PEDRÓS-ALIÓ, 2006).

Desde que estudos realizados por técnicas independentes de cultivo, indicam que numericamente a grande maioria das bactérias ainda não foi cultivada (mais de 99% do total de procariotos existentes no mundo) (Figura 3), novos métodos de cultivo são essenciais para possibilitar o avanço na compreensão sobre a estrutura e função das comunidades microbianas (BARTSCHT; CYPIONKA; OVERMANN, 1999; EILERS et al., 2000; STEVENSON et al., 2004; SIMU et al., 2005; KÖPKE et al., 2005; YASUMOTO-HIROSE et al., 2006; HEYLEN

et al., 2006; TAN et al., 2007; GONTANG; FENICAL; JENSEN, 2007).

Durante os últimos 15 anos, os estudos moleculares usando sequências genéticas, que codificam a pequena subunidade rRNA 16S, revelaram uma grande variedade de novos micro-organismos marinhos, dentro dos três domínios de vida: *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*. No entanto, a maior parte desta nova diversidade ainda não foi descrita (Figura 3), porque culturas puras dos organismos além das suas sequências genômicas são necessárias para definir uma espécie. Alguns raros táxons foram descobertos pelas técnicas moleculares convencionais. Entretanto, a maioria dos táxons raros presentes no banco de dados só serão acessíveis quando cultivados em culturas puras (PEDRÓS-ALIÓ, 2006).

Muitos dos representantes de micro-organismos "não-cultivados" puderam ser encontrados em diferentes habitats, sendo em alguns, extremamente abundantes (RAPPE e GIOVANNONI, 2003). As técnicas, que permitiram o cultivo destes micro-organismos, requerem abordagens diferentes dos métodos padrões de cultivo, visando promover de forma semelhante as condições naturais de seu habitat para favorecer ao máximo seu crescimento. Entretanto, estas técnicas ainda não estão completamente estabelecidas (ALAIN e QUERELLOU, 2009).

Figura 3. Números de Filo-Divisões (Filos com membros cultivados + Divisões candidatas com representantes "não-cultivados" identificados, desde 1987, nos Domínios Bacteria (linha preta) e Archaea (linha cinza), e números de Filos com representantes cultivados (linha tracejada).
Fonte: Adaptação de Alain e Querellou (2009).

Recentemente muitas tentativas de estudo foram feitas para cultivar, isolar e identificar os micro-organismos "não-cultivados" através da aplicação de novas abordagens. Destas, podemos incluir o método de cultivo de alto desempenho (*High-Throughput Culturing* - HTC) empregando o princípio de diluição-até-extinção (CONNON e GIOVANNONI, 2002; RAPPÉ et al., 2002; CHO e GIOVANNONI, 2004; STINGL et al., 2008; OH et al., 2010), HTC adaptada e combinada com outras técnicas (BRUNS; HOFFELNER; OVERMANN, 2003; GICH et al., 2005; NICHOLS et al., 2010), e encapsulação de células em gel "*microdroplets*" (ZENGLER et al., 2002).

Lembramos que apesar dos avanços obtidos através das técnicas independentes de cultivo, táxons raros dificilmente vão ser recuperados através de clonagem e sequenciamento empregando iniciadores universais, aonde a reação de PCR termina por selecionar os táxons mais abundantes e os raros permanecerão desconhecidos. A situação pode ser otimizada, através do uso de iniciadores específicos para alguns grupos de bactérias (tais como os oxidantes de amônia) por técnicas de *nested* PCR e pela técnica de *shotgun*, no qual PCR não é utilizado. No entanto, uma grande parte do banco de dados permanecerá fora do alcance das atuais ferramentas moleculares. Basicamente, apenas os táxons abundantes estarão disponíveis. Alguns estudos indicam que táxons que compõem $\geq 1\%$ do total do número de células pode ser detectada com técnicas PCR-dependente, e táxons que compõem $<0,1\%$ são difíceis de recuperar. Propõe-se que os táxons recuperados por PCR são aqueles fundamentais para diversidade de um ecossistema. Assim, a maioria das bactérias que são relevantes e ativas nos fluxos de carbono, energia e nutrientes seriam recuperadas pelas técnicas moleculares (PEDRÓS-ALIÓ, 2006).

Dentre as linhagens que representam os mais abundantes clados marinhos isolados em cultura pura nos últimos anos estão o clado *Roseobacter*, indicado como o primeiro grupo de bactérias heterotróficas marinhas cultivadas, que aparecem frequentemente em bibliotecas de clones ambientais (metagenomas), surgindo como um modelo importante de organismo. Baseada em análises do gene rRNA 16S, sua diversidade genômica e fisiológica é considerável. Apenas cerca de 50% das sequências codificadas em cada um dos três genomas completos foram compartilhados com as outras duas linhagens. Entre os fenótipos mais comuns das espécies de *Roseobacter* estão a motilidade e a capacidade para degradar os compostos aromáticos (ex.: gentisato, homogentisato, benzoato e fenilacetato). A bactéria *Sphingomonas alaskensis* é a bactéria oligotrófica melhor estudada, sendo também

considerado um modelo. Cepas de *S. alaskensis* foram isoladas pelos métodos de diluição-até-extinção em amostras de águas costeiras do Alasca, o Mar do Norte e Japão (GIOVANNONI e STINGL, 2007).

A linhagem de *Alphaproteobacteria*, denominada SAR11 foi um dos primeiros grupos de organismos a ser identificado através de técnicas independente de cultivo baseadas na clonagem e sequenciamento do gene rRNA 16S em ecossistemas naturais. Este grupo corresponde a 26% de todos os clones identificados no oceano e tem sido encontrado em quase todas as comunidades bacterioplancônicas pelágicas marinhas estudadas por estes métodos. O estudo realizado por Rappé et al. (2002) mereceu destaque, uma vez que resultou no acesso aos membros do clado SAR11 em cultura, o que promoveu uma importante oportunidade para as análises de sequenciamento genômico de um organismo com significância biogeoquímica global. Isso pode também fornecer uma visão detalhada das adaptações das células em sistemas com teores baixos de nutrientes.

Sugere-se que este cultivo poderia depender da determinação bem-sucedida de seu nicho ecológico, uma vez que podem estar associados a metabolismos incomuns. Como por exemplo, o clado SAR202, que não tem representantes cultivados, pertence ao filo *Chloroflexi*, que inclui fotoheterótrofos, e anaeróbios que têm a capacidade de oxidar compostos halogenados; são encontrados em regiões que estão apenas abaixo da zona eufótica. Outro importante grupo que necessita de representantes cultivados é o grupo SAR86 da subclasse *Gammaproteobacteria*, que representa cerca de 10% do total de comunidade microbiana procariótica na superfície do oceano (GIOVANNONI e STINGL, 2007).

Com relação aos estudos realizados no Brasil, ainda são poucas as informações sobre a biodiversidade e caracterização taxonômica e funcional de procariontes no ambiente marinho. Piza, Prado e Manfio (2004) analisaram filogeneticamente a diversidade das comunidades microbianas presentes em sedimentos do estuário de Santos-São Vicente e identificaram clones homólogos às sequências de cultivados e também de "não-cultivados" do gênero *Actinobacteria* através das bibliotecas ambientais para o gene rRNA 16S.

As pesquisas metagenômicas foram feitas em diferentes ambientes aquáticos do Rio de Janeiro, tais como, na Baía Sepetiba, em que se estudou a composição e estrutura de comunidades microbianas de amostras de águas acidificadas e contaminadas com metais pesados originados de resíduos de minérios de zinco (ALMEIDA et al., 2009). Além de ter o primeiro relato sobre diversidade microbiana em águas hipersalinas da Lagoa Araruama

(CLEMENTINO et al., 2008). E também, o recente trabalho feito por Vieira et al. (2008), baseado na construção de biblioteca genômica e análises genéticas do gene rRNA 16S, comparam a diversidade bacterioplanctônica dentro do ecossistema da Baía de Guanabara (RJ), que apresentou comunidades microbianas com diferentes táxons relacionadas aos parâmetros químicos e microbiológicos analisados. Sequências de "não-cultivados" também foram obtidas nas bibliotecas. No entanto, não pudemos identificar na literatura levantada, estudos buscando recuperar do ambiente as sequências de micro-organismos "não-cultivados", detectadas no ambiente através das técnicas independentes de cultivo.

A aplicação de análises de PCR e hibridização de DNA em amostras de solos do Brasil (Cubatão, SP) e de regiões polares (Ártico e Península Antártica), indicaram que *Rhodococcus-alkB1* (*Rh alkB1*) e *Rh alkB2* foram os mais frequentes genótipos degradadores de alcanos encontrados em solos contaminados e não-contaminados (controles) de ambas regiões geográficas. Enquanto *Pseudomonas-alkB* foi detectado principalmente nos solos contaminados das regiões polares e não foi detectado nos solos controles e contaminados do Brasil. O gene *Acinetobacter-alkM* não pode ser detectado em nenhum dos solos das regiões polares e brasileiras (WHYTE et al., 2002; LUZ et al., 2004).

Recente trabalho feito em solos *permafrost* polares, revelou a detecção dos genes *alk* (*alkB* e *alkM*) em amostras de *permafrost* do Ártico e não foi observado nas amostras da Antártica, sendo que somente a amostra de solo exposta por recuo de geleira na Antártica, amplificou para os genes *alkB* (DUARTE, 2010).

O estudo feito por Bellicanta (2004), desenvolveu novos *primers* degenerados para amplificar genes homólogos para alcano monoxigenases e subunidades alfa de ARHDs, para verificar, através de bibliotecas gênicas, a presença e diversidade de genes catabólicos, envolvidos na degradação de *n*-alcanos, HPAs e PCBs, nos sedimentos da Baixada Santista, São Paulo, Brasil. Os resultados confirmaram a presença de novos genótipos catabólicos no estuário, os quais não tinham sido detectados anteriormente devido à especificidade dos iniciadores empregados.

O uso de iniciadores degenerados (BELLICANTA, 2004) possibilitou a detecção de genes alcano monoxigenases (*alkB* e *alkM*) descritos em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além disso, identificou genes *alk* putativos ainda não descritos. Estes resultados foram apresentados no trabalho de Kuhn, Bellicanta e Pellizari (2009) em amostras de sedimentos marinhos da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica.

Embora as alceno-hidroxilases (incluindo as enzimas alceno monoxigenases, AlkB) terem sido detectadas em vários micro-organismos de diversos tipos de ambientes, o conhecimento sobre a diversidade dos genes das bactérias marinhas degradadoras de alcanos permanece limitado, especialmente nos ecossistemas pelágicos. Uma pesquisa realizou consórcios enriquecidos com óleo diesel das amostras da água do mar coletadas na região superficial ao longo da área mediana, desde do Norte ao Sul, do Oceano Atlântico, e detectou a presença de genes *alkB*, pela primeira vez, em isolados bacterianos pertencentes a diferentes gêneros: *Bacillus*, *Brachybacterium*, *Kordiimonas*, *Gaetbulibacter*, *Leifsonia*, *Microbacterium*, *Solimonas* e *Tetrathlobacter* (WANG et al., 2010).

Dessa forma, a partir desses estudos relatados, têm-se a indicação do potencial existente para isolamento e descrição da desconhecida diversidade dos genes *alk*, presentes nos hospedeiros bacterianos, que muitas vezes podem ser endêmicos do ambiente marinho.

Lembramos também que o método de cultivo de alto desempenho (método HTC) ainda não foi desenvolvida no Brasil e auxiliará na identificação de novas espécies, além do conhecimento da biodiversidade microbiana marinha na Antártica e no Brasil. Este estudo foi desenvolvido com apoio dos projetos de levantamento da biodiversidade marinha do “Latin American Consortium of Census of Antarctic Marine Life” (LA CAML) na Antártica sob supervisão da Profa. Dra. Lucia Campos da UFRJ e do projeto Microbial Diversity in Antarctic Peninsula (MIDI-API), sob coordenação da Profa. Dra. Vivian H. Pellizari e parte do projeto Microbiological and Ecological Responses to Global Environmental Changes in Polar Regions (MERGE) do Ano Polar Internacional, apoiado no Brasil pelo CNPq/MCT/SECIRM.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo dessa pesquisa foi aplicar metodologias para isolamento de bactérias ainda "não-cultivadas" no ecossistema marinho (amostras de água do mar de Ubatuba, Estado de São Paulo, Brasil e da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica), buscando isolar, pela primeira vez, bactérias conhecidas apenas por suas sequências genômicas; isolar novos táxons e membros raros da comunidade bacteriana marinha, e também, encontrar os hospedeiros dos genes funcionais (genes *alk*) recém-descritos em clones de bibliotecas metagenômicas no ambiente marinho.

1.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Implementar e avaliar as metodologias de cultivo de “não-cultivados”, denominadas: Método de cultivo de alto desempenho (método HTC) e Técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10, no laboratório de Ecologia de Micro-organismos, Instituto Oceanográfico - USP;
- ✓ Pesquisar dentre os isolados obtidos a presença e diversidade dos genes funcionais *alk*, que codificam para a enzima alceno-monoxigenase, através da técnica de amplificação em cadeia da polimerase e sequenciamento dos genes *alk*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O termo "não-cultivável" iniciou-se por Xu et al., em 1982, para descrever células debilitadas, mas viáveis em um estado de sobrevivência ou dormência, observado ocorrer depois de um crescimento ativo de culturas de *Vibrio cholerae* O1 ou *Escherichia coli*, que foram colocadas em um microcosmo sem nutriente, por exemplo, uma solução salina livre de nutrientes e incubada em baixa temperatura. As células cresceram no caldo nutriente sob condições ótimas, concentradas por centrifugação, lavadas, e colocadas em água do mar artificial estéril (15% de salinidade). As células foram contadas diretamente, usando alaranjado de acridina e coloração fluorescente de anticorpos, e visualizadas por microscopia de epifluorescência. Elas também foram plaqueadas usando meio de cultura rico para seu crescimento. Foi determinado pela observação da microscopia direta, que o número total de células não diminuiu com o tempo. Entretanto, como a incubação continuou por vários dias, não foram encontradas formação de colônias quando as mesmas amostras foram plaqueadas nos meios de cultura que tinham sido otimizadas para crescimento da cultura. Para determinar se tais células eram viáveis ou mortas, uma técnica de microscopia desenvolvida por Kogure e colaboradores, em 1979, foi empregada para examinar as culturas que não formaram colônias na transferência para meio de cultura sólido e não cresceram em meio líquido. O método de Kogure, um procedimento de contagem direta de células viáveis, quando aplicado nestas culturas revelou que aparentemente todas as células contadas por contagem direta com alaranjado de acridina estavam metabolicamente ativas, apesar de não conseguirem ser recuperadas em nenhum plaqueamento e em caldo. Assim, a frase "viáveis mas não-cultiváveis" foi inventada para descrever estas bactérias que estavam aparentemente em estado de dormência (COLWELL e GRIMES, 2000).

Os termos "não-cultivável" e "ainda não-cultivado" têm sido usados para descrever bactérias que são pressupostamente funcionais, isto é, provavelmente não debilitadas, mas caracteristicamente com metabolismo muito baixo e ter se tornado altamente adaptado para sobreviver em condições oligotróficas, nas quais os métodos de cultivo em laboratório têm encontrado dificuldades em simular com sucesso (COLWELL e GRIMES, 2000).

Desde o início do emprego da placa de petri, contendo meios de cultura solidificados, para obtenção de culturas puras de micro-organismos, existem esforços contínuos para melhorar a eficiência do cultivo microbiano, visando suprir as diversas condições de

crescimento, simulando as condições *in situ*.

Duas principais estratégias são usadas para o isolamento de culturas puras em microbiologia. A primeira estratégia tem como objetivo isolar colônias procedendo a repetitivos plaqueamentos por esgotamento através do meio de cultura sólido, enquanto a segunda estratégia visa isolar células por sucessivas séries de diluição em meio líquido. Entretanto, estas estratégias de enriquecimento e isolamento de culturas puras frequentemente selecionam os micro-organismos oportunistas com rápido crescimento ou aqueles micro-organismos dominantes na comunidade. Em meio de cultura artificial com alta concentração de nutrientes, os membros de comunidades com 'r'-estrategistas, ou aqueles com rápido crescimento, frequentemente dominam e competem com os abundantes 'K'-estrategistas (WATVE et al., 2000). Consequentemente, estas abordagens convencionais de cultura-dependente não refletem de forma real as comunidades microbianas.(AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995).

Dessa forma, os recentes estudos, que aprimoraram os métodos de cultivo tradicionais com sucesso, utilizam baixas concentrações de nutrientes para aumentar a culturabilidade e otimizar a recuperação de procariotos de diferentes tipos de amostras dos ecossistemas naturais. Dentre estas inovadoras metodologias de cultivo, podemos citar o método HTC (método de cultivo de alto desempenho).

Historicamente, não há dúvida que as células microbianas heterotróficas podem crescer em concentrações extremamente baixas de nutrientes, as quais são encontradas nos ecossistemas naturais. Entretanto, existem muitas linhagens microbianas que têm sido cultivadas e conseguem se replicar em água do mar estéril, mas não conseguem crescer em meio de cultura que contém altas concentrações de nutrientes orgânicos (Figura 4). O principal desafio em produzir um meio de cultura artificial, que mimetize a água do mar natural, é reconstruir apuradamente a complexa composição de carbono orgânico dissolvido (DOC) e os elementos traços.

O primeiro cultivado oligotrófico obrigatório foi isolado de amostra de água marinha em 1981. Neste mesmo ano, uma importante revisão sobre micro-organismos oligotróficos foi publicada. Consequentemente, diversos grupos de pesquisadores, como podemos citar em destaque o Don K. Button, que desenvolveu com sucesso métodos de cultivo para oligotróficos e começou a trabalhar no cultivo de bactérias marinhas que conseguem crescer em água do mar autoclavada (BUTTON et al., 1993).

Figura 4. Linha do tempo destacando os micro-organismos marinhos cultivados ao longo dos anos.
Fonte: Giovannoni e Stingl, 2007.

Sphingopyxis alaskensis, que foi formalmente classificado como *Sphingomonas alaskensis*, é o oligotrófico bacteriano mais bem estudado, cujas linhagens foram isoladas pelo método da diluição-até-extinção, através das amostras de água do ambiente marinho do Alasca, do Mar do Norte e Japão. Devido à habilidade em crescerem sob condições com baixas concentrações de nutrientes, terem uma baixa taxa de crescimento máximo e tamanho microbiano ultra-reduzido (menor do que $0,1 \mu\text{m}^3$), tornaram *S. alaskensis* como um importante modelo de estudo (SCHUT et al., 1993; VANCANNEYT et al., 2001).

O laboratório do pesquisador Stephen J. Giovannoni modificou os métodos realizados por Button et al. (1993), reduzindo o volume das culturas para microplacas, implementando técnicas de *screening* e adotando procedimentos que tinham sido desenvolvidos pela utilização da água do mar pelos oceanógrafos. Estas abordagens, que têm sido referidas como método de cultivo de alto desempenho (método HTC), possibilitou o isolamento de culturas puras de importantes novas linhagens heterotróficas marinhas que têm sido cultivadas até atualmente.

Em 2002, Cannon e Giovannoni publicaram os resultados obtidos através deste inovador método de cultivo, o qual permitiu um grande número de culturas serem eficientemente detectadas pelo crescimento e serem identificadas. Dentre os micro-organismos cultivados, foram quatro linhagens únicas, que pertencem aos clados marinhos do grupo *Proteobacteria* previamente descritos como "não-cultivados" ou sem descrição de

estudos de clones de amostras ambientais. Estas culturas são representantes dos clados SAR11 (*Alphaproteobacteria*), OM43 (*Betaproteobacteria*), SAR92 (*Gammaproteobacteria*) e OM60/OM241 (*Gammaproteobacteria*) (Figura 5). Assim, a partir deste estudo, possibilitou-se o avanço no cultivo de bactérias marinhas consideradas ainda "não-cultivadas", as quais têm sido consistentemente encontradas em bibliotecas metagenômicas do ambiente marinho.

Figura 5. Imagens de microscopia por epifluorescência dos novos isolados bacterianos obtidos pelo método HTC. As células estão coradas por DAPI. Tamanho das barras: 1 μ m.

Fonte: Cannon e Giovannoni, 2002.

O primeiro isolado bacteriano heterotrófico marinho, *Candidatus Pelagibacter ubique*, pertencente ao clado SAR11 do grupo *Alphaproteobacteria*, foi obtido pela implementação do método HTC. Esta técnica de cultivo se baseia em obter culturas puras utilizando o princípio de diluição-até-extinção, para apartar os possíveis competidores, mimetizar as condições naturais de crescimento usando como meio de cultura a própria água do mar e finalmente, pelo emprego de métodos de alto desempenho de *screening* com sondas fluorescentes específicas (RAPPÉ et al., 2002).

Candidatus Pelagibacter ubique são oligotróficos obrigatórios e atualmente conseguem crescer somente em água marinha estéril como meio de cultura, em que podem atingir densidade celulares de aproximadamente 10⁶ células por mL, sendo similar a densidade encontrada em suas populações nativas. O genoma de *P. ubique* é composto somente por um

milhão e 308 mil e 506 pares de bases, sendo suficiente para codificar todas as suas funções, que são necessárias para estas células viverem de forma livre e terem um dominante papel na oxidação do DOC presente no oceano. *P. ubique* apresentam mecanismos biossintéticos para os 20 aminoácidos e suas células expressam proteorodopsinas em cultura e *in situ* e são provavelmente a principal fonte desta molécula no sistema oceânico (RAPPE et al., 2002; GIOVANNONI et al., 2005).

O clado SAR11 é um dos clados que contém os mais abundantes micro-organismos existentes na Terra e consiste em pelo menos quatro diferentes subgrupos que podem ser discriminados pelas suas sequências do gene rRNA 16S. A abundância destes subgrupos muda espacialmente com a profundidade e em termos temporais, com as estações do ano, assim implica em diferentes adaptações no ambiente para cada um destes subgrupos (Figura 6). Estes atributos fazem do clado SAR11 ser um bom modelo para estudar a especiação bacteriana, além disso, ter importante relevância nos estudos, para compreender como a microdiversidade filogenética interfere na estimativa de produtividade e ciclagem de nutrientes orgânicos e inorgânicos, podendo assim, serem explorados nas relações entre mudanças climáticas, estrutura das comunidades bacterianas e ciclos biogeoquímicos (STINGL; TRIPP; GIOVANNONI, 2007; CARLSON et al., 2009).

Com o objetivo de isolar novas linhagens de SAR11 e também bactérias marinhas ainda "não-cultivadas", foram feitas modificações do método HTC com a adição de dimetil-sulfônico-propionato (DMSP) no meio da água do mar e pelo uso de microplacas constituídas a base de Teflon para otimizar a eficácia do cultivo de SAR11, uma vez que este clado apresenta uma importante função no ciclo marinho do enxofre e pode degradar DMSP. Dessa forma, isolados do clado SAR11 e representantes "não-cultivados" dos grupos SAR116 (o primeiro cultivado deste clado), OCS14, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes* e *Gammaproteobacteria* foram isolados das amostras de água provenientes da costa marítima de Oregon (EUA). E das amostras de água do mar Sargasso (área de estudo na região atlântica de Bermuda - BATS), linhagens de SAR11 e um representante "não-cultivado" do grupo *Alphaproteobacteria* foram isolados também (STINGL; TRIPP; GIOVANNONI, 2007).

Linhagens do grupo *Gammaproteobacteria* foram cultivados da região pelágica da costa do Oceano Pacífico, usando o método HTC em baixas concentrações de nutrientes da água do mar como meio de cultura. As análises filogenéticas mostraram que os isolados pertencem a cinco diferentes clados: SAR92, OM60, OM182, BD1-7 e KI89A; cujas

sequências para gene rRNA 16S haviam sido reportadas anteriormente em clones de bibliotecas metagenômicas de diferentes ecossistemas do ambiente marinho. Estes cinco clados não estão diretamente relacionados filogeneticamente com as outras principais linhagens marinhas do grupo *Gammaproteobacteria*, tais como o clado SAR86, *Vibrio*, *Alteromonas* e *Oceanospirillum* (CHO e GIOVANNONI, 2004).

Figura 6. Mapeamento das contagens das densidades celulares dos subclados Ia (a), Ib (b) e II (c) de SAR11 nas profundidades de 0-300 m, entre os anos 2003 e 2005. Linha branca tracejada demonstra os padrões de distribuições no contexto da mesclagem e estratificação das profundidades.
Fonte: Carlson et al., 2009.

Sequenciamentos dos genomas de linhagens bacterianas que foram isoladas pelo método HTC em trabalhos anteriores estão sendo realizados, indicando a presença de genes que têm significativa importância biotecnológica e diferentes potenciais metabólicos (OH et al., 2010; THRASH et al., 2010a; THRASH et al., 2010b; THRASH et al., 2010c).

O método de cultivo de alto desempenho também foi aplicado em ecossistemas lacustres, como no caso do trabalho realizado no Lago Crater, em Oregon (EUA) por Page; Connon e Giovannoni (2004), em que, através da identificação das sequências do gene rRNA 16S e análise filogenética, 55% dos isolados obtidos tiveram alta taxa de similaridade ($\geq 97\%$) com sequências de clones de bibliotecas metagenômicas encontrados anteriormente neste mesmo lago. Além disso, 65% destes isolados, pertencem a grupos taxonômicos distribuídos amplamente em ambientes aquáticos. Dessa forma, estes resultados puderam confirmar que o método HTC apresenta vantagens em relação às técnicas de isolamento tradicional, as quais tendem a isolar micro-organismos que não são predominantes do ambiente analisado e os quais raramente se relacionam com clones metagenômicos para o gene rRNA 16S.

Nos lagos de McMurdo Dry Valleys da Antártica, os quais ficam permanentemente congelados e possuem mínima influência antrópica, através do emprego da técnica de diluição-até-extinção e do método de cultivo de alto desempenho, isolados bacterianos quimiotróficos e psicrotolerantes foram obtidos, sendo que muitos destes micro-organismos são considerados ainda "não-cultivados" e pertencem aos grupos *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria* (STINGL et al., 2008).

Atualmente podemos encontrar na literatura diversas variações da aplicação da técnica de cultivo de alto desempenho, que foi adaptada e combinada com outras abordagens metodológicas a fim de isolar e cultivar determinados grupos de micro-organismos em diferentes ambientes aquáticos.

Uma das abordagens combinadas com o método HTC foi a utilização de um sistema automatizado com um microdispensador MicroDrop® (MicroDrop GmbH, Norderstedt, Alemanha) para inocular as amostras de água de três lagos da Alemanha em microplacas com 96-poços. Esta combinação de técnicas mostrou-se eficiente para obtenção de culturas isoladas, cujos representantes bacterianos ainda "não-cultivados" foram dos grupos α e β -*Proteobacteria*, *Flavobacteria*, *Actinobacteria* e *Firmicutes* (BRUNS; HOFFELNER; OVERMANN, 2003; GICH et al., 2005).

Até agora, na literatura, nada foi capaz de explicar por que alguns organismos são mais difíceis de cultivar do que outros. Grande parte do sucesso recente veio dos novos métodos que foram aplicados em organismos de crescimento lento, ou que obtiveram baixas densidades de células na cultura. Parece provável que a utilização de meios de cultura que derivam da água salgada natural, a fim de reconstruir a complexa composição de carbono orgânico dissolvido (DOC) e oligo-elementos presentes, pode contornar a necessidade de definir fatores de crescimento específicos. Além disso, alguns organismos exigem interações com outros organismos, crescendo apenas em sistema de consórcios e afetando o sucesso do cultivo (GIOVANNONI e STINGL, 2007).

Não existem dúvidas que as amostras ambientais de genomas microbianos marinhos permanecem distorcidas com relação aos oligotróficos facultativos, uma vez que os oligotróficos obrigatórios são mais difíceis de crescerem em laboratório. Dessa forma, muitos dos abundantes grupos filogenéticos de picoplânctons marinhos, tais como, SAR86, SAR202, SAR324, SAR406, *Actinobacteria*, permanecem sem serem cultivados (Figura 7), sugerindo que maiores inovações serão necessárias para se ter êxito no cultivo destes micro-organismos (CHO e GIOVANNONI, 2004).

Figura 7. Árvore filogenética mostrando os principais grupos bacterioplânctons marinhos e os tamanhos de seus genomas completos. Os abundantes grupos “não-cultivados” estão marcados com asteriscos. Táxons com tamanho do genoma menor ou igual a dois milhões de pares de bases (Mpb = Mbp) estão representados nas caixas retangulares.
Fonte: Giovannoni e Stingl, 2007.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo empregou duas técnicas de cultivo a fim de isolar as bactérias consideradas ainda "não-cultivadas" de ambiente marinho, que foram: (1) Método de cultivo de alto desempenho (Método HTC) e (2) Técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10.

3.1 Amostras

Para aplicação do método de cultivo de alto desempenho, as amostras de água do mar foram coletadas em duas áreas marítimas distintas (Tabela 2): próximo a Enseada do Flamengo, Ubatuba (Figura 8), São Paulo, Brasil e em Punta Ullmann, Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica (Figura 9).

As amostras de Ubatuba foram coletadas, em Abril de 2010, pelo Projeto Antares sob coordenação do Prof. Dr. Salvador A. Gaeta (Laboratório de Produção Primária, Instituto Oceanográfico-USP) e do Dr. Milton Kampel do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). A área de coleta de Ubatuba está localizada na Plataforma Continental Sudeste Brasileira (PCSE), a aproximadamente 18 milhas náuticas da costa de Ubatuba, no litoral norte do Estado de São Paulo (Figura 8) e possui um regime oceanográfico de transição entre águas costeiras e de plataforma continental.

As amostras de P. Ullmann foram coletadas durante a Operantar XXVII, em Fevereiro de 2009.

Tabela 2 - Localização georeferenciada dos pontos de amostragem e profundidade de coleta.

Metodologia	Local de Amostragem	Latitude	Longitude	Profundidade
Método HTC	Ubatuba, São Paulo	23°36,843'S	044°58,488'W	0, 25 e 38 m
	Punta Ullmann, Antartica	62° 0,848'S	58° 20,161'W	25 m
Técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10	Botany Point	62°05,817'S	58°20,157'W	1, 10 e 20 m
	Comandante Ferraz	62°05,141'S	58°23,359'W	1, 10 e 20 m
	Punta Ullmann	62°05,067'S	58°21,064'W	1 m

Figura 8. Localização do ponto de coleta (UBA) na região próxima a área da Enseada do Flamengo, Ubatuba, SP, Brasil, referente a amostragem para aplicação do método de cultivo de alto desempenho. Ilustração cedida por Dr. André Rosch Rodrigues (IO-USP).

Os três pontos de coleta de água marinha, localizados na Baía do Almirantado (Antártica), analisados pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10, foram: Punta Ullmann (PU), Botany Point (BP) e Comandante Ferraz (CF) (Tabela 2; Figura 9). Estas amostras foram coletadas durante a Operantar XXV, em Abril de 2007.

As garrafas de Niskin foram utilizadas para as amostragens das águas do mar das regiões estudadas.

Figura 9. Mapas de referências (A: Península Antártica; B: Ilha Rei George; C: Baía do Almirantado), destacando os três pontos de amostragem na Baía do Almirantado: Botany Point (P. BOT.), Comandante Ferraz (EACF) e Punta Ullman (P. ULL.). Os três pontos indicados com círculos totalmente preenchidos de cor preta se referem às amostras de água do mar coletadas para serem processadas pela técnica de inóculo me meio de cultura diluído 1/10. O ponto marcado em itálico, *Punta Ullman (P. ULL)*, representa a amostragem para aplicação do método HTC. Ilustração cedida por Dr. André Rosch Rodrigues (IO-USP).

3.2 Contagem de bactérias totais

Para determinar contagens de células viáveis pelo método tradicional de cultivo, 1000 µL da água coletada foram inoculados, pela técnica *pour plate*, em placas contendo os meios de cultura: Agar Marinho (MA2216, Difco), R2A, marca MERCK, (R2A Marinho, 75% água do mar estéril), e uma diluição de 1/10 de R2A (R2A Marinho 1/10, 75% água do mar estéril); estes dois últimos meios, foram preparados usando parcialmente a água do mar esterilizada. Pelo menos uma placa controle foi feita para cada método de contagem de células das amostras, nas quais não foram inoculadas. As placas com ágar foram incubadas no escuro a 15 °C (+/-2 °C) até apresentarem unidades formadoras de colônias (aproximadamente 10 dias).

3.3 Métodos de cultivo

Os fluxogramas do método de cultivo de alto desempenho (método HTC) (Figura 10) e da técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10 (Figura 11) estão apresentados abaixo.

Figura 10. Fluxograma do método de cultivo de alto desempenho (HTC).

Figura 11. Fluxograma da técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10.

3.3.1 Método de cultivo de alto desempenho (HTC)

O método de cultivo de alto desempenho, para isolamento de bactérias ainda "não-cultivadas", visa o princípio da diluição-até-extinção, buscando isolar culturas puras em pequenos volumes de meio de cultura com baixa concentração de nutrientes. Neste caso, a própria água do mar coletada foi utilizada como meio de cultura (CONNON e GIOVANNONI, 2002).

3.3.1.1 Preparação do meio de cultura e do inóculo

A amostra de água do mar coletada a ser empregada como meio de cultivo foi filtrada através de uma membrana de policarbonato 0,2 μm , diâmetro 47 mm (Millipore) e depois imediatamente autoclavada. Em seguida, foi feita troca atmosférica com a mistura do gás $\text{N}_2:\text{CO}_2$ (30% de CO_2) na amostra para recuperação do tampão bicarbonato perdido durante a

autoclavação. Cinco trocas atmosféricas foram feitas no total, sendo que por um minuto foi mantido sob vácuo e depois, um minuto de fluxonagem com a mistura do gás $N_2:CO_2$, retomando assim, este ciclo.

Antes da sua utilização, este meio de cultura líquido foi verificado quanto à esterilidade diretamente pela visualização de células marcadas com 4', 6' - diamidino - 2 - fenilindole (DAPI) e do kit Live/Dead BacLight Bacterial Viability (Invitrogen Life Technologies), através da microscopia de epifluorescência (microscópio Olympus, modelo BX51WI-PHIII). Utilizaram-se filtros adequados para excitação/emissão máxima de 358/461 e 480/635 nm para observação do DAPI e Live/Dead, respectivamente.

A inoculação de uma alíquota de 10 μ L da amostra de água do mar diluída até o fator 10^{-4} , para que seja alcançado uma média final de 1,1 a 5,0 células por poço, foi feita em microplacas de 48-poços. Em seguida, cada poço foi preenchido com 1 mL da água do mar esterilizada (meio de cultivo). As microplacas com 48-poços foram incubadas no escuro em estufa bacteriológica a 15 °C(+/-2 °C) por volta de 3 semanas.

3.3.1.2 Detecção de crescimento nas microplacas

A leitura foi feita após o período de incubação citado, a partir de cada poço das microplacas, para examinar os poços que tiveram crescimento positivo de bactérias. Cinquenta microlitros de cada poço foram utilizados para a coloração das células com o kit Live/Dead BacLight Viability (Invitrogen Life Technologies) em uma lâmina com 10 poços a serem visualizadas pela microscopia de epifluorescência.

3.3.1.3 Caracterização das culturas

3.3.1.3.1 Análise de restrição de fragmentos polimórficos (RFLP) e sequenciamento dos isolados obtidos

O DNA total dos isolados das microplacas positivas foi extraído com o kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) e foram selecionados pela técnica de RFLP. As quantificações dos

DNA extraídos foram determinadas pelo espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (Uniscience, Thermo Scientific, USA).

A identificação das culturas isoladas foi feita através de métodos de sequenciamento do gene rRNA 16S descritos a seguir.

Os genes rRNA 16S foram amplificados pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os isolados que apresentaram baixa concentração de amplificação (ou seja, a banda esperada do gene não pôde ser visualizada na eletroforese em gel de agarose a 1%), foram submetidos ao *nested* PCR.

Para amplificação, dois microlitros de cada amostra foram adicionados para o primeiro PCR, com um volume final de reação de 20 µL, e nos casos necessários (*nested* PCR), 1 µL do primeiro PCR foi transferido ao segundo PCR. A reação de PCR continha 0,025 U de *Platinum Taq* DNA Polimerase por µL, 5% acetamida, 1,5 mM Mg²⁺, 0,2 µM de cada iniciador, 220 µM dNTPs, e 1x tampão PCR (Invitrogen Life Technologies). As condições de amplificação para as reações de PCR foram: um ciclo inicial de desnaturação de 5 minutos a 94 °C; seguido de 38 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 55 °C (anelamento) e 2 minuto a 72 °C; com um ciclo de extensão final de 7 minutos a 72 °C.

Os iniciadores usados na primeira reação foram: 27F (5'-AGR GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') e 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'). Na segunda reação (*nested* PCR) foram: 519F (5'-CAG CMG CCG CGG TAA TWC-3') e 1401R (5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3'); estes iniciadores são variações dos iniciadores comumente utilizados em bactérias ou procariotos (CONNON e GIOVANNONI, 2002).

A técnica de RFLP foi realizada a partir do produto amplificado do gene rRNA 16S e empregou as enzimas de restrição *Mbo*I e *Hae*III (Invitrogen Life Technologies). Ao menos, uma cultura de cada perfil padrão do grupo de RFLP foi sequenciada e analisada filogeneticamente. Quando a soma dos fragmentos das bandas de cada digestão foi igual ou menor do que o comprimento do produto de PCR do gene rRNA 16S (~ 1500 pb), a cultura foi considerada pura.

Antes do sequenciamento, os produtos de PCR foram purificados com kit de purificação PureLink PCR Purification (Invitrogen Life Technologies). A concentração do produto purificado foi mensurada pelo espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (Uniscience). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados pelo ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems), nas reações de sequenciamento feitas, utilizando o BigDye®

Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (código 4337456), pelo Centro de Estudos do Genoma Humano - USP.

3.3.1.3.2 Análise Filogenética

As sequências nucleotídicas tiveram seus cromatogramas analisados e posteriormente foram editadas e alinhadas no programa BioEdit. Após a edição e remoção dos iniciadores, as sequências foram comparadas com as sequências disponibilizadas no banco de dados GenBank do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI), utilizando-se os programas Ribosomal Database Project (RDP II) e Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov>).

Após o alinhamento múltiplo das sequências obtidas dos isolados e das sequências depositadas no GenBank, as árvores filogenéticas foram construídas através dos programas MEGA 5.03 (TAMURA et al., 2007) e ARB (LUDWIG, 2004), pelo método de Neighbor-Joining (SAITOU e NEI, 1987), modelos de evolução: Jukes-Cantor (JUKES e CANTOR, 1969) e Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980) e valor de bootstrap de 1000 repetições.

3.3.1.3.3 Iniciadores degenerados para amplificação dos genes *alk*

Para a detecção e análise da diversidade dos genes *alk* (*alkB* e *alkM*), a partir dos isolados obtidos das amostras de água marinha, foi realizada a técnica de PCR convencional e utilizados os dois conjuntos de iniciadores degenerados (Tabela 3) desenhados por Belicanta (2004). A reação de amplificação dos genes *alk* consistiu na concentração de 1X do tampão de reação (20 mM Tris - HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTPs, 0,6 µM de cada iniciador, 1 U de *Platinum Taq* DNA Polimerase (Invitrogen Life Technologies), em um volume final de 25 µL.

Depois do processo de purificação dos produtos de PCR amplificados, a amostra foi preparada para envio ao sequenciamento, conforme descrito anteriormente.

Tabela 3 - Descrição dos iniciadores degenerados que foram utilizados para amplificar os genes que codificam as enzimas alceno-monooxigenase.

Primer	Seqüência [‡] (5'-3')	Fragmento amplificado	Reação de PCR	Cepa de Referência (Controle positivo)
Foralk	GCI CAI GAR ITI RKI CAY AA	542 pb	3' - 97°C	} 38x <i>Acinetobacter</i> sp ADP1 (<i>alkM</i>)
			1' - 94°C	
			1' - 48°C	
			1' - 72°C	
Revalk	GCI TGI TGI TCI SWR TGI CGY TG		5' - 72°C	

[‡] Y = (T/C); R = (G/A); S = (G/C); W = (T/A); K = (T/G); I = Inosina.

3.3.2 Técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10

As amostras foram coletadas na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica, em três diferentes pontos: Punta Ullmann e Botany Point, nas profundidades de 1, 10 e 20 m, e em Comandante Ferraz, na profundidade de 1 m (Tabela 2).

Após o isolamento em meio Ágar Marinho (Difco), diluído em 1:10, o DNA total dos isolados foi extraído, segundo protocolo descrito por Wilson (1987), e posteriormente, foram identificados pela análise das seqüências obtidas pela amplificação do gene rRNA 16S, através dos iniciadores universais 27F e 1401R. A reação de PCR continha 1 U de *Platinum Taq* DNA Polimerase, 1,5 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTPs, 0,2 µM de cada iniciador, e 1X tampão PCR (Invitrogen Life Technologies). As condições de amplificação para as reações de PCR foram: um ciclo inicial de desnaturação de 5 minutos a 94 °C; seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C (anelamento) e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C; com um ciclo de extensão final de 7 minutos a 72 °C.

O fragmento amplificado foi purificado através do kit PureLink PCR Purification (Invitrogen Life Technologies). A concentração do produto purificado foi mensurada pelo espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (Uniscience). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados pelo ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems), em que as reações de sequenciamento foram feitas, utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (código 4337456), pelo Centro de Estudos do Genoma Humano - USP.

As seqüências nucleotídicas tiveram seus cromatogramas analisados, editados e alinhados pelo programa BioEdit. As seqüências-referências foram obtidas do banco de dados GenBank do Centro de Informação Biotecnológica (NCBI), pelos programas Ribosomal

Database Project II (RDP II) e Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov>). Após o alinhamento múltiplo das sequências obtidas dos isolados e das sequências depositadas do GenBank, as árvores filogenéticas foram construídas com a utilização do programa MEGA5.03, pelo método de Neighbor-Joining, modelos de evolução: Jukes-Cantor e Kimura 2-parâmetros, e valor de *bootstrap* de 1000 repetições.

Para a amplificação e análise da presença dos genes *alk* nos isolados, utilizou-se um par de iniciadores degenerados (Tabela 3) previamente desenhado (BELLICANTA, 2004), os procedimentos foram realizados conforme descrito anteriormente. As sequências nucleotídicas foram comparadas com sequências disponibilizadas no banco de dados GenBank, utilizando o programa BLASTN e uma árvore filogenética foi construída com o programa MEGA3, pelo método de Neighbor-Joining, modelo de substituição de resíduos de aminoácidos por Matriz PAM (Dayhoff) e valor de *bootstrap* de 1000 repetições.

3.4 Testes Adicionais para caracterização dos isolados

3.4.1 Análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (Fatty Acid Methyl Ester - FAME)

Os isolados obtidos foram crescidos em meio de cultura líquida e enviado para extração e análises dos ácidos graxos da membrana (FAME) para o Laboratório Microbiologia Ambiental (LMA), EMBRAPA, que é coordenado pelo Dr. Itamar Soares.

As etapas da metodologia compreendem em: coleta da bactéria, saponificação, metilação, análise por cromatografia gasosa e identificação pelo banco de dados.

O sistema de identificação microbiano, utilizado pela análise do FAME, emprega o denominado *Sherlock® Analysis Software*, que é baseado em um valor numérico, denominado *Similarity Index* (SI). Este sistema expressa a distância relativa de uma amostra desconhecida com a média populacional, ou seja, é calculado o quanto é semelhante a composição dos ácidos graxos de um micro-organismo desconhecido com a média da composição dos ácidos graxos de linhagens usadas para criar a biblioteca de banco de dados. O SI assume que a distribuição dos ácidos graxos nas espécies microbianas tenha uma distribuição de Gauss, em que a máxima taxa de similaridade será igual a 1,000. Amostras com valor de SI maior ou

igual a 0,500 e com uma separação de 0,100 entre a primeira e segunda escolha são consideradas como boas comparações de identificação com o banco de dados (alta taxa de similaridade). Se o valor de SI for entre 0,300 e 0,500 e apresentar maior que 0,100 de separação entre as escolhas, indicará uma boa relação, entretanto, poderá ser uma linhagem atípica. Valores de SI menores que 0,300 sugerem que o micro-organismo não é a espécie indicada pela biblioteca do banco de dados (baixa taxa de similaridade), podendo ser uma espécie nova (KUNITSKY; OSTERHOUT; SASSER, 2006).

3.4.2 - Microscopia eletrônica de varredura e transmissão

As amostras submetidas para microscopia eletrônica de varredura, foram preparadas por lavagens simples com solução salina e fixação com solução *Karnowsky*, em seguida, foram filtradas em membranas de polycarbonato com poro 0,4 μm e 25 mm de diâmetro (Millipore). A captura das imagens foi realizada no Laboratório de Caracterização Tecnológica (LCT), Depto. de Engenharia de Minas e Petróleo, na Escola Politécnica - USP, através do equipamento QUANTA 600F, marca FEI.

A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada pelo laboratório de Biologia e Ultraestrutura de Procariotos, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo Góes - UFRJ. As células foram depositadas diretamente em grades de cobre revestidas com formvar e secas ao ar. As grades foram observadas no microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgagni, operando em 80 kV.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Contagem de bactérias totais

As amostras de água do mar de Ubatuba apresentaram, ao utilizar o kit Live/Dead BacLight Bacterial Viability (Invitrogen Life Technologies), concentração celular de $2,87 \times 10^{11}$, $2,48 \times 10^{11}$ e $1,05 \times 10^{11}$ células/mL nas profundidades de 0 m, 25 m e 38 m, respectivamente. Já as amostras da Antártica, na profundidade de 25 m, apresentaram $1,5 \times 10^7$ células por mL. As contagens de colônias bacterianas das placas contendo meios de culturas Agar Marinho, R2A Marinho e R2A Marinho diluído 1/10, estão representadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores correspondentes às contagens totais das amostras de água do mar coletadas neste estudo.

Local da coleta	Profundidade (m)	Live/Dead (células por mL)	Agar Marinho (UFC/ml)	R2A Marinho (UFC/ml)	R2A Marinho 1/10 (UFC/ml)
Ubatuba	0	$2,87 \times 10^{11}$	30	25	51
	25	$2,48 \times 10^{11}$	491	246	155
	38	$1,05 \times 10^{11}$	189	75	101
Antártica	25	$1,50 \times 10^7$	453	201	449

De acordo com os resultados obtidos nas contagens, observou-se que houve maior concentração de micro-organismos na profundidade de 25 m, tendo assim, a representação de bactérias heterotróficas.

A avaliação da abundância e biomassa da comunidade bacteriana em coluna da água e em sedimentos na região de Ubatuba foram realizadas por alguns estudos prévios (MESQUITA, 1993; YOSHINAGA; QUINTANA; SUMIDA, 2006; MORAES, 2007).

4.2 Método de cultivo de alto desempenho (HTC)

Pelo método de cultivo de alto desempenho, obteve-se, a partir de duas microplacas inoculadas, quatro culturas, nas quais três foram provenientes das amostras de água do mar de Ubatuba de profundidade 25 m e uma é da amostra de Punta Ullmann, Antártica. Os

resultados a seguir apresentam a caracterização destes isolados.

4.2.1 Detecção de crescimento nas microplacas

O crescimento das quatro culturas foi observado após incubação a 15 °C por três semanas. As células foram visualizadas com o uso do kit Live/Dead BacLight Viability (Invitrogen Life Technologies) pela microscopia de epifluorescência. As Figuras 12 e 13 apresentam imagens de dois campos microscópicos obtidos para cada cultura.

As células de ANT-01 e UBA-03 apresentaram tamanho e dimensão reduzidos, aproximadamente 1µm de comprimento, da mesma forma como as outras culturas isoladas pelo método HTC, que foram descritas em trabalhos prévios (CONNON e GIOVANNONI, 2002; CHO e GIOVANNONI, 2004; PAGE, CONNOR e GIOVANNONI, 2004).

Figura 12. Fotos da cultura (ANT-01) da amostra de água marinha de Punta Ullmann, Antártica, coradas com kit Live/Dead BacLight Bacterial Viability e visualizadas pela microscopia de epifluorescência. Coloração verde representa as células viáveis.

Dois isolados (UBA-01 e UBA-02) da amostra de água do mar de Ubatuba possuem células em formato de espirilo (Figura 13). As demais células apresentam forma de bacilo.

Figura 13. Fotos das culturas da amostra de água marinha de Ubatuba, coradas com kit Live/Dead BacLight Bacterial Viability e visualizadas pela microscopia de epifluorescência. Coloração verde representa as células viáveis. Coloração vermelha representa células mortas.

4.2.2 Extração de DNA total das culturas obtidas

O protocolo de extração para cada poço das microplacas com crescimento positivo foi realizado conforme as instruções contidas no kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen). A concentração de DNA total extraído das culturas isoladas foi baixa, variaram entre 1,0 e 3,3 ng/μL.

A obtenção de baixas densidades celulares após o período de incubação, é devido aos procedimentos adotados pelo método HTC, que emprega o princípio da diluição-até-extinção, pelo uso de microplacas para cultivar em volumes pequenos com concentração reduzida de

nutrientes do meio de cultura, resultando assim, em dificuldades na extração de DNA das culturas obtidas, e conseqüentemente, também na amplificação por PCR. O trabalho realizado por Connon e Giovannoni (2002) menciona que, a falha na amplificação das culturas isoladas por este método é provavelmente atribuído a estes fatores, e não por causa das condições de anelamento durante a reação de PCR.

4.2.3 Amplificação do gene *rRNA 16S*

As culturas, provenientes das amostras de água de Ubatuba, amplificaram o fragmento esperado para gene *rRNA 16S*, de aproximadamente 1500 pb (Figura 14).

Aplicou-se o *nested* PCR no isolado da amostra de água da Antártica, amplificando o fragmento para gene *rRNA 16S* de aproximadamente 882 pb (Figura 14).

Figura 14. Fotos de eletroforese em gel de agarose das amplificações para gene *rRNA 16S* das culturas isoladas pelo método HTC. M: Marcador molecular 1Kb DNA Ladder; C+: *Escherichia coli*; C-: Controle negativo.

4.2.4 Análise de restrição de fragmentos polimórficos (RFLP)

Os isolados foram amplificados pelo *nested* PCR, buscando obter uma concentração de DNA adequada para realizar a técnica de RFLP.

Os perfis dos fragmentos das bandas de cada digestão das enzimas de restrição *HaeIII* e *MboI* demonstraram diferentes padrões, exceto para as culturas UBA-01 e UBA-02, que apresentaram o mesmo padrão de bandas. Todos os isolados foram considerados culturas puras (Figura 15), uma vez que a soma dos fragmentos das bandas de cada digestão foi igual ou menor ao comprimento do produto do *nested* PCR para gene rRNA 16S (~ 882 pb).

Dessa forma, os produtos de PCR purificados das culturas isoladas puderam ser selecionados para o sequenciamento (Figura 16).

Figura 15. Foto do gel de agarose 4%, corado em brometo de etídeo, com as quatro culturas isoladas pelo método HTC, que foram submetidas pela técnica de RFLP com duas enzimas de restrição: *HaeIII* e *MboI*. M: Marcador molecular de 50 pb, 1: UBA-01; 2: UBA-02; 3: UBA-03; 4: ANT-01.

Figura 16. Fotos de eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR purificados para gene rRNA 16S das culturas isoladas pelo método HTC. M: Marcador molecular Low Mass.

4.2.5 Identificação e análise filogenética das culturas puras obtidas

As sequências nucleotídicas do gene rRNA 16S das culturas isoladas pelo método HTC, obtiveram taxas de similaridades mais altas com as sequências de clones de bibliotecas metagenômicas obtidas a partir de amostras ambientais que foram depositadas nos bancos de dados GenBank do NCBI e Ribosomal Database Project II (Tabela 5, sub-item a), indicando serem candidatos de bactérias ainda "não-cultivadas".

No entanto, verificou-se que as sequências nucleotídicas dos isolados, provenientes das amostras de água do mar de Ubatuba, apresentaram baixa similaridade ($< 93,4\%$) com as sequências de micro-organismos cultivados que foram depositadas nos bancos de dados GenBank do NCBI e Ribosomal Database Project II, como apresentado na Tabela 5 (sub-item b) e nas árvores filogenéticas construídas (Figuras 17 ao 20). Considerando que se uma sequência para gene rRNA 16S apresentar uma taxa menor do que 97% de similaridade com espécies de procariotos descritos, as culturas, UBA-01, -02 e -03 deste estudo, apresentam maior probabilidade de serem sequências de "não-cultivados" ou até mesmo de espécies novas (ROSSELLO-MORA e AMANN, 2001; PAGE; CONNON; GIOVANNONI, 2004).

Tabela 5 - Resultado das similaridades das sequências para gene rRNA 16S das culturas isoladas pelo método HTC quando comparadas com as sequências do banco de dados RDPII*.

Local de coleta	ID	Grupo Filogenético	Identificação para gene rRNA 16S	Taxa de similaridade	Tamanho das sequências nucleotídicas
Antártica	ANT-01	Beta proteobacteria	a) uncultured bacterium RB-C01, DQ065775 b) <i>Pelomonas puraquae</i> , AM501438	99,6 % 99,6 %	~753 pb
Ubatuba	UBA-01	Gamma proteobacteria	a) uncultured bacterium Hg91A7, EU236351 b) <i>Oleispira antarctica</i> , AJ426421	96,6 % 91,4 %	~1145 pb
	UBA-02		a) uncultured bacterium Hg91A7, EU236351 b) <i>Oleispira</i> sp., DQ530482	94,1 % 89,6 %	~1071 pb
	UBA-03	Gamma proteobacteria	a) uncultured bacterium 341-3, AY994047 b) <i>Acinetobacter</i> sp. CL1405, DQ857749	93,8 % 93,4 %	~1055 pb

* Ribosomal Database Project II (RDP): <http://rdp.cme.msu.edu/>

Sabe-se que para definição de uma nova espécie bacteriana diversas análises devem ser feitas para caracterização do fenótipo, genótipo e filogenético, tais como, descrição da morfologia, provas bioquímicas, determinação da composição celular de ácidos graxos, hibridização DNA/DNA, sequenciamento do genoma e etc. Desta forma, pretende-se dar continuidade ao estudo de características fenotípicas e microscópicas dos isolados para concluir sua classificação taxonômica ou assegurar sua similaridade com clones de "não-cultivados".

As árvores filogenéticas foram construídas com base no trabalho realizado por Cannon e Giovannoni (2002), sendo que neste estudo, para medida de comparações, utilizaram-se os programas MEGA e ARB e dois diferentes modelos de evolução: Jukes-Cantor e Kimura 2-parâmetros (Figuras 17 ao 20).

Figura 17. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pelo método HTC e as sequências com maiores identidades no banco de dados. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Jukes e Cantor e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas através do programa MEGA.

Figura 18. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pelo método HTC e as sequências com maiores identidades no banco de dados. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Kimura 2-parâmetros e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas através do programa MEGA.

Não houve diferença significativa dos índices de identidades entre as sequências dos isolados obtidos pelo método HTC e as sequências dos bancos de dados para os modelos Jukes-Cantor e Kimura 2-parâmetros ao utilizar cada um dos programas citados (Figuras 17 ao 20).

Figura 19. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pelo método HTC e as sequências com maiores identidades no banco de dados. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Jukes e Cantor e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas através do programa ARB.

Figura 20. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pelo método HTC e as sequências com maiores identidades no banco de dados. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Kimura 2-parâmetros e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas através do programa ARB.

Ao comparar os programas MEGA e ARB, as árvores filogenéticas apresentaram topologias diferentes, entretanto, ambas, com três clusters distintos, divididos em duas Classes: *Gammaproteobacteria*, para os isolados de Ubatuba, e *Betaproteobacteria*, para o isolado da Antártica (Figuras 17 ao 20).

As diferenças encontradas entre as árvores se deve ao fato de que o primeiro passo inicial crítico da análise filogenética baseado em sequenciamento é o alinhamento das estruturas primárias. O programa MEGA apresenta o CLUSTAL W como software de alinhamento múltiplo de sequências, enquanto o programa ARB permite usar um alinhador

que se baseia também nas estruturas secundárias das sequências, e além disso, filtros podem ser utilizados para reduzir a influência de posições altamente variáveis (LUDWIG et al., 2004). Dessa forma, o programa ARB permitiu obter conclusões filogenéticas mais seguras e confiáveis quando comparáveis ao MEGA, mostrando que os resultados foram consistentes, uma vez que não houveram diferenças consideráveis para a classificação filogenética dos isolados nos dois programas.

Para confirmar os resultados filogenéticos, três árvores foram construídas pelo programa ARB e modelo Jukes and Cantor, para cada agrupamento dos isolados analisados neste estudo (Figuras 21 ao 23), nas quais pode-se observar que as sequências dos isolados obtidos pelo método HTC tiveram relação de distância em nível de espécie ($< 0,03$) com as sequências de cultivados e clones ambientais depositados nos bancos de dados. Sendo que, para os isolados UBA-01 e UBA-02, a árvore demonstrou maior relação com clones ambientais (AF353237; EU236351) do que com representantes cultivados (Figura 21). No entanto, para os demais isolados (UBA-03 e ANT-01), não houve uma diferença significativa entre a relação de distâncias entre membros cultivados e clones metagenômicos (Figuras 22 e 23, respectivamente). Dessa forma, somente com os resultados obtidos pelas análises filogenéticas para gene rRNA 16S, não foi possível determinar a classificação taxonômica destes isolados.

Analizando individualmente os resultados de similaridade obtidos para as sequências (Tabela 5) e as análises filogenéticas (Figuras 21 ao 23), verificamos que os isolados UBA-01 e UBA-02, apresentaram similaridades com um clone bacteriano ambiental (EU236351) obtido de uma esponja marinha ainda não descrita do Norte do Pacífico, denominada *Halicona (?gellius)* sp. (Figuras 17 e 18). A sequência do clone descrito teve alta similaridade com os isolados *Oleispira* sp. e *Oleispira antarctica* (SIPKEMA et al., 2009).

As características taxonômicas dos representantes cultivados de *Oleispira antarctica* são descritas como bactérias psicrofílicas, aeróbicas, desde vibrio a helicoidal, Gram-negativas, presença de flagelo, pertencem ao grupo de bactérias marinhas hidrocarbonoclásticas e conseguem crescer nas temperaturas de 1° a 25 °C (YAKIMOV et al., 2003).

Como observado na Figura 21, as culturas UBA-01 e UBA-02 também se relacionaram com o clone ambiental, proveniente de amostras do oceano Ártico (AF353237), cujos insertos sequenciados apresentaram taxa de similaridade de 90% ao gênero

Oceanospirillum, pela análise de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) (BANO e HOLLIBAUGH, 2001).

Figura 21. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas UBA-01 e UBA-02 isoladas pelo método HTC e as sequências com maiores identidades no banco de dados. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Jukes e Cantor e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas através do programa ARB.

Já o isolado UBA-03, se relacionou com um cultivado bacteriano (DQ 857749) pertencente ao gênero *Acinetobacter* (Figura 22), que foi encontrado em simbiose com a espécie de hexacoral *Cirrhipathes lutkeni*, coletado na região da Flórida (EUA), oeste do oceano Atlântico. Muitos metabólitos bioativos têm sido isolados das bactérias simbiotes destes corais, porém pouco se conhece sobre a inter-relação entre eles. Neste mesmo trabalho, também identificaram *Acinetobacter johnsonii* em associação com este coral, embora esta espécie seja encontrada comumente em casos clínicos, lodo ativado e na área de alimentos, assim, maiores estudos são necessários para esclarecer se este grupo bacteriano tem como habitat natural os invertebrados marinhos ou se sua presença é devido a poluição em

ambientes marinhos (SANTIAGO-VÁZQUEZ et al., 2007).

Os representantes cultivados do gênero *Acinetobacter* possuem como principais características taxômicas: Gram-negativo, formato de bacilo, ausência de motilidade, formação de colônias de cor branca, ausência de oxidase e presença de catalase (MALIK et al., 2003).

Figura 22. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre a cultura UBA-03 isolada pelo método HTC e as sequências com maiores identidades no banco de dados. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Jukes e Cantor e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas através do programa ARB.

De acordo com as análises filogenéticas para gene rRNA 16S, podemos identificar o isolado ANT-01, proveniente da amostra de Punta Ullmann (Antártica), como uma linhagem pertencente ao gênero *Pelomonas* (Figura 23). Representantes de *Pelomonas saccharophila* (AJ440994) foram isolados de mantos microbianos do Lago Druzhby, Vestfold Hills, Antártica (VAN TRAPPEN et al., 2002), no entanto, temos a primeira contribuição na literatura de descrição de bactérias deste gênero serem isoladas do ambiente marinho na região antártica estudada.

Figura 23. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre a cultura ANT-01 isolada pelo método HTC e as sequências com maiores identidades no banco de dados. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Jukes e Cantor e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas através do programa ARB.

O isolado ANT-01 apresentou alta similaridade com representantes cultivados *Pelomonas puraquae* (Tabela 5; Figura 23), isolado de água de hemodiálise de um hospital da Espanha, considerado recentemente como uma espécie nova, segundo trabalho publicado em 2007. Esta espécie se caracteriza como Gram-negativa, formato de bacilo, formação de colônias circulares, com diâmetro de 4-5 mm e cor marrom claro, fermenta glicose, crescimento ocorre entre 10° e 37 °C (GOMILA et al., 2007).

4.2.6 Testes adicionais

A seguir serão descritos os resultados dos testes adicionais realizados para contribuir na classificação e caracterização taxonômica dos isolados obtidos pelo método HTC.

4.2.6.1 Análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (Fatty Acid Methyl Ester - FAME)

A análise de extração microbiana dos ésteres metilados de ácidos graxos (FAME), pela cromatografia gasosa, foi realizada para as culturas, UBA-03 e ANT-01. Esta técnica necessita de uma alta concentração celular para a medição na cromatografia e esta concentração só foi obtida nas duas culturas mencionadas.

Os perfis dos ácidos graxos microbianos são considerados únicos para cada espécie bacteriana, permitindo a identificação taxonômica das mesmas. Também pode contribuir para caracterização do isolado, o fato da presença de lipopolissacarídeos (LPS) contribuir na formação de ácidos graxos hidroxilados nas bactérias Gram-negativas. Dessa forma, a ausência destes compostos hidroxilados nos perfis dos ácidos graxos indica que o micro-organismo pertence ao grupo das bactérias Gram-positivas (KUNITSKY; OSTERHOUT; SASSER, 2006).

No caso dos perfis de FAME obtidos nos isolados UBA-03 (Tabela 6) e ANT-01 (Tabela 7), teve-se o indicativo de serem Gram-negativos.

Tabela 6 - Composição celular dos ácidos graxos da cultura isolada, UBA-03, pelo método HTC, proveniente das amostras de água do mar de Ubatuba.

Ácidos Graxos	% do total
14:0 iso	9.88
15:0 iso	18.41
15:0 anteiso	41.18
16:1 w7c alcohol	13.13
16:0 iso	5.17
16:0	2.85
Sum In Feature 4	5.38
17:0 anteiso	4.00

Valores de *Similarity Index* (Sherlock Version 6.1):

0.336	<i>Bacillus</i> -GC group 22 (No 16S match to known species)
0.333	<i>Brevibacillus-centrosporus</i> (48h, <i>Bacillus</i>)
0.230	<i>Brevibacillus-reuszeri</i>
0.223	<i>Bacillus-viscosus</i> " (was <i>Arthrobacter</i>)
0.206	<i>Sporosarcina-ureae</i>

Tabela 7 - Composição celular dos ácidos graxos da cultura isolada, ANT-01, pelo método HTC, proveniente das amostras de água do mar da Antártica.

Ácidos Graxos	% do total
14:0 iso	4.42
14:0	1.52
15:1 iso w9c	0.44
15:0 iso	11.86
15:0 anteiso	57.59
16:1 w7c alcohol	4.42
16:0 iso	1.18
16:1 w11c	9.64
16:0	3.29
17:1 iso w10c	1.36
Sum In Feature 4	2.41
17:0 anteiso	1.26
18:0	0.62

Valores de *Similarity Index* (Sherlock Version 6.1):

0.463	<i>Bacillus-viscosus</i> " (was <i>Arthrobacter</i>)
0.332	<i>Paenibacillus-validus</i> (<i>Bacillus gordonae</i>)
0.297	<i>Bacillus-megaterium</i> -GC subgroup A

Quanto a composição dos ácidos graxos dos dois isolados observou-se que as mesmas foram diferentes de linhagens cultivadas relacionadas com os grupos *Acinetobacter* e *Pelomonas*, descritos em estudos anteriores (VAZ-MOREIRA et al., 2011; GOMILA et al., 2007). Os valores de *Similarity Index* obtidos entre 0,463 e 0,206, sugerem serem linhagens bacterianas ainda desconhecidas ao banco de dados.

4.2.6.2 Microscopia eletrônica de varredura e de transmissão

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas das quatro culturas isoladas pelo método HTC neste estudo (Figura 25).

No isolado ANT-01, foi possível também realizar a microscopia eletrônica de transmissão, onde foi possível confirmar a presença do flagelo (Figura 24). As imagens de microscopia de transmissão para os outros isolados não foram obtidas.

Figura 24. Foto de microscopia eletrônica de transmissão do isolado ANT-01 obtido pelo método HTC.

Figura 25. Fotos de microscopia eletrônica de varredura das quatro culturas isoladas pelo método HTC.

Pelas identificações filogenéticas para gene rRNA 16S dos isolados obtidos, pode-se inferir que ao aplicar o método de cultivo de alto desempenho, foi possível isolar bactérias que tiveram maior relação com clones de bibliotecas metagenômicas, sendo mais evidente para as culturas UBA-01 e UBA-02. Apesar de não ter atingido a classificação taxonômica dos isolados em nível de espécie bacteriana, podemos considerá-los como linhagens ainda não descritas, pertencentes aos Gêneros identificados neste estudo. Em vista disso, de acordo com os resultados das caracterizações fenotípicas e moleculares obtidos (Tabela 8), pode-se observar que serão necessárias outras análises para determinação da espécie bacteriana, como por exemplo, provas bioquímicas e hibridização DNA/DNA.

Tabela 8 - Síntese dos resultados das análises realizadas neste estudo.

ID	Similaridade com sequências mais próximas de bactérias cultivadas (rRNA 16S)	Análise FAME	Dimensão celular (μm)	Técnica Gram	Morfologia Live/Dead	Morfologia MEV
UBA-01	<i>Oleispira</i> sp.	n.o.	2 - 5	G-	espirilo	espirilo
UBA-02	<i>Oleispira</i> sp.	n.o.	2 - 5	G-	espirilo	espirilo
UBA-03	<i>Acinetobacter</i> sp.	G-; <i>Bacillus</i> sp.	1 - 4	G-	bacilo	bacilo
ANT-01	<i>Pelomonas</i> sp.	G-, <i>Bacillus</i> sp.	1 - 3	G-	bacilo	bacilo

n.o.: dados não obtidos

Dessa forma, o método HTC possibilita a obtenção de culturas puras através da utilização de microplacas e do uso da água do mar esterilizada como meio de cultura, para mimetizar as condições naturais do ambiente marinho; apesar de apresentar uma baixa taxa de culturabilidade; a qual pode ser refletida pela intrínseca inabilidade das diversas populações microbianas crescerem em um único meio, em uma alta frequência de células dormentes ou "não-cultivadas", em limitadas concentrações de nutrientes presentes no meio usado, e/ou em condições inibitórias de cultivo (PAGE; CONNON; GIOVANNONI, 2004).

As culturas puras microbianas ainda representam o melhor método para estudar a fisiologia dos micro-organismos, incluindo investigações detalhadas do papel dos genes, proteínas e vias metabólicas; uma vez que diversas descobertas foram apresentadas após o isolamento de novas espécies pertencentes a táxons que já tinham sido previamente bem-documentadas. Enquanto várias dificuldades permanecem no cultivo de micro-organismos, algumas direções futuras poderiam ser: refinamento dos meios de cultura, mimetização das condições naturais através de sistemas de cultivo *in situ* ou criação de mecanismos que suportem a complexa interação célula-célula e desenvolvimento de procedimentos automáticos através da robótica. A partir das combinações dessas abordagens distintas, haverá um grande êxito no cultivo e isolamento de bactérias relacionadas aos grupos taxonômicos considerados ainda "não-cultivados" (ALAIN e QUERELLOU, 2009).

4.2.7 Detecção de genes *alk* nas culturas isoladas

Nenhuma das culturas bacterianas, isoladas pelo método HTC, obteve resultado positivo para a amplificação dos genes *alk* por PCR.

O isolado, UBA-01, proveniente da amostra de Ubatuba, apesar de não apresentar os genes *alk*, obteve taxa de similaridade de 91,4% com uma nova espécie isolada da costa marítima da Antártica e classificada como *Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov.. Estas bactérias pertencem a um grupo típico de micro-organismos marinhos hidrocarbonocláticos. Entretanto, não foi possível detectar genes *alk* neste isolado, similar ao demonstrado por Yakimov et al. (2003), apesar da espécie cultivada apresentar preferência por substratos de hidrocarbonetos alifáticos.

Da mesma forma, um outro representante isolado da mesma região de coleta (UBA-03), cuja taxa de similaridade com *Acinetobacter* sp. foi de 93,4%, os genes *alk* também não foram detectados, embora vias funcionais de degradação de hidrocarbonetos neste gênero terem sido avaliadas, segundo estudos prévios realizados (VAN BEILEN et al., 2003).

4.3 Técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10

Apresentamos a seguir, os resultados de isolamento pela aplicação da técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10 e identificação taxonômica de bactérias isoladas do ambiente marinho antártico, através das análises para gene rRNA 16S. Além disso, a detecção dos genes funcionais, que codificam para a enzima alcano monoxigenase (genes *alk*), nos isolados obtidos.

4.3.1 Isolamento através do Agar Marinho diluído 1/10

As amostras de água do mar coletadas na região da Baía do Almirantado e as respectivas profundidades estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Locais e profundidades das amostragens de água do mar coletadas na Península Antártica.

Pontos de coleta	Local	Profundidade (m)
17	Punta Ullmann	20
19	Punta Ullmann	10
22	Punta Ullmann	1
Heliponto 1m	Comandante Ferraz	1
26	Botany Point	20
30	Botany Point	10
33	Botany Point	1

Sabe-se que a Antártica é considerado um ambiente extremo e oligotrófico, a fim de reproduzir as condições de baixa concentração de nutrientes deste ecossistema marinho, empregou-se a utilização de um meio de cultura sintético, cuja composição química é semelhante ao habitat natural marinho.

O isolamento das bactérias foi realizado pelo plaqueamento em Ágar Marinho e cultivo em Caldo Marinho, ambos os meios diluídos em 1:10. A incubação foi feita em três temperaturas diferentes (14°, entre 18° e 22° e 37 °C) e mantidas em ambientes claro e escuro.

De acordo com cada condição pré-estabelecida, pode-se obter diferentes quantidades de isolados, sendo que para algumas amostras de água do mar, não foi possível visualizar unidades formadoras de colônias viáveis (Tabela 10).

Tabela 10 - Dados do isolamento de bactérias das amostras de água marinha antártica.

Temperatura cultivo (°C)	Ponto de coleta	UFC/mL
37	17	0
	19	3
	22	160
	CF 1m	0
	26	120
	30	6
	33	> 250
14	17	4
	19	35
	22	> 250
	CF 1m	13
	26	> 250
	30	100
	33	> 250
18 - 22	17	1
	19	75
	22	> 250
	CF 1m	11
	26	> 250
	30	89
	33	> 250
18 - 22 Sem Luz	26	95
	17	11
	19	85
	22	> 250
	CF 1m	13
	26	> 250
	30	150
	33	> 250

4.3.2 Extração de DNA e Amplificação do gene *rRNA 16S*

O DNA total dos 81 isolados obtidos foi extraído, segundo protocolo descrito por Wilson (1987). A concentração de DNA destes isolados variou entre 5,0 e 136 ng/μL

(Figura 26).

A maioria dos isolados apresentaram boa amplificação do gene rRNA 16S, cujos produtos de PCR foram preparados para o sequenciamento (Figura 27).

Figura 26. Foto de gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídeo, da extração de DNA total dos isolados obtidos pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10. Marcador molecular (M): λ HindIII.

Figura 27. Foto de eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR purificados para genes rRNA 16S dos isolados obtidos pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10. Marcador molecular (M): Low Mass.

4.3.3 Identificação do gene *rRNA 16S* e análise filogenética

Dos 81 isolados bacterianos obtidos, 94% pertencem ao Filo *Proteobacteria* e 6% ao Filo *Actinobacteria*, sendo que a Classe *Gammaproteobacteria*, distribuída nas três profundidades de coleta (1, 10 e 20 m), apresentou o maior número de representantes relacionados ao gênero *Pseudomonas* (Figura 28). Resultados similares foram relatados por Xiao et al. (2007), em que encontraram bactérias pertencentes aos grupos filogenéticos: *Gammaproteobacteria* (o gênero *Pseudomonas* foi dominante), *Actinobacteria*, *Flavobacteria* e *Firmicutes*, nas amostras de água do mar da região da Estação Antártica Chinesa ("Great Wall Station"), na Ilha Rei George, Antártica.

Figura 28. Representação gráfica dos representantes dos grupos taxômicos relacionados com os isolados obtidos na área de estudo antártico, através da técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10.

Os três pontos de coleta da região Península Antártica estudados apresentaram perfis distintos na distribuição dos Filos bacterianos encontrados. Em Punta Ullmann (PU), *Gammaproteobacteria* teve o maior número de representantes e em Botany Point (BP), *Alphaproteobacteria* foi o grupo dominante. Já no ponto Comte. Ferraz (CF), chama a atenção a ausência de bactérias pertencentes à Classe *Betaproteobacteria* (Figura 29).

Figura 29. Frequências dos grupos filogenéticos dos isolados bacterianos encontrados nos pontos de coleta pela análise do gene rRNA 16S.

Ao comparar as árvores filogenéticas originadas através de dois modelos de evolução: Jukes-Cantor, e Kimura 2-parâmetros, não houveram diferenças significativas nas taxas de identidades entre as sequências nucleotídicas das bactérias isoladas neste estudo e os representantes microbianos depositados nos bancos de dados. Além disso, a maioria destas bactérias apresentaram similaridade com micro-organismos provenientes de regiões polares descritos previamente na literatura (Figuras 30 ao 38).

Figura 30. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10 e as sequências com maiores identidades no banco de dados. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Jukes e Cantor e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas através do programa MEGA.

Considerando-se os resultados obtidos para as diferentes Classes, observamos que, em relação à Classe *Gammaproteobacteria*, no ponto de coleta em Punta Ullmann, na profundidade de 1 m, o gênero *Pseudomonas* foi o mais abundante. Em Botany Point, na profundidade de 20 m, o gênero *Serratia* foi o grupo mais dominante (Figuras 31 e 35).

Para a Classe *Alphaproteobacteria*, em BP, na profundidade de 10 m, os gêneros *Porphyrobacter*, *Sphingomonas* e *Blastomonas* apresentaram, respectivamente, maior representatividade em ordem decrescente. Em PU, detectou-se somente o gênero *Sphingomonas*, distribuído nas profundidades 20, 10 e 1 m (Figuras 32 e 36).

Referente à Classe *Betaproteobacteria*, em PU, apenas o gênero *Comamonas* foi encontrado nas profundidades 20, 10 e 1 m. E também em BP, o gênero *Delftia* foi o único que teve representatividade na profundidade de 20 m (Figuras 33 e 37).

As bactérias pertencentes ao Filo *Actinobacteria* foram isoladas dos três pontos amostrais e das profundidades de 1 (PU e CF) e 20 (BP) metros (Figuras 34 e 38).

Quanto aos resultados obtidos para os isolados que se relacionaram com bactérias provenientes de regiões polares, temos que, o isolado TA 19.4 (Figuras 31 e 35) foi relacionado com *Psychrobacter fozii* sp. nov. (AJ430827), que foi descrito como uma espécie nova proveniente de amostras de sedimento de Johnson's Dock (Ilha Livingston, Ilhas do Sul Shetland, Antártica), possui como principais características fenotípicas: as células são Gram-negativas, sem motilidade, sem pigmentação, não formadoras de esporos e formato de cocobacilos, seu crescimento ocorre entre 4 e 30 °C. Existem evidências que os ambientes frios constituem um nicho ecológico para os micro-organismos do gênero *Psychrobacter* e os ecossistemas antárticos são uma fonte de bactérias psicrófilas deste grupo taxonômico (BOZAL et al., 2003).

O isolado SL CF3 (Figuras 31 e 35) apresentou alta similaridade com a linhagem *Halomonas glaciei* (AJ431369), que foi isolada de amostras de gelo do Arquipélago Pointe-Geologie (Terra de Adelie, Antártica) e considerada uma espécie nova em um estudo feito em 2003, cujas células foram descritas como Gram-negativas, móveis, formato de bacilo, psicrotrófica (podem crescer em temperaturas na faixa de 4° a 30 °C), conseguem tolerar até 12% de concentração de NaCl e possuem crescimento ótimo em pH 7. O primeiro relato de uma espécie psicrotrófica do gênero *Halomonas*, encontrada em um lago hipersalino na Antártica, foi feito por Franzmann e colaboradores, no ano de 1987 (REDDY et al., 2003).

Figura 31. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para a Classe *Gammaproteobacteria*. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Jukes e Cantor e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas através do programa MEGA.

Figura 32. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para a Classe *Alphaproteobacteria*. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Jukes e Cantor e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas através do programa MEGA.

Figura 33. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para a Classe *Betaproteobacteria*. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Jukes e Cantor e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas através do programa MEGA.

O isolado SL CF2 (Figuras 32 e 36) teve similaridade com linhagens de *Loktanella salsilacus*, que foram descritas como espécies novas e provenientes dos lagos Ace e Organic (Vestfold Hills), Antártica, cujas células são Gram-negativas, formato de bacilos curtos, crescem entre 5° e 30 °C e formam colônias de cor bege e translúcidas. A abundância de alguns membros do grupo *Rhodobacter*, nestes ambientes aquáticos, tem sido relacionada com a presença de ressurgência de algas e que também possuem importante papel no ciclo do enxofre (VAN TRAPPEN; MERGAERT; SWINGS, 2004).

Figura 34. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para o Filo *Actinobacteria*. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Jukes e Cantor e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas através do programa MEGA.

O isolado EC CF3 (Figuras 34 e 38) foi similar a dois representantes cultivados do gênero *Arthrobacter* (DQ677867; AF041789), que foram isolados de ambientes antárticos: subglacial e interface água do mar-gelo, respectivamente, e ambos também se relacionaram filogeneticamente, conforme relatou o trabalho publicado por Mikucki e Priscu (2007). O isolado *Arthrobacter* sp. str. S23H2 (AF041789), cujas células têm formato de coco a bacilos, consegue crescer em abrangente faixa de salinidade e de temperatura, e foi considerado como a primeira evidência filogenética da presença de bactérias Gram-positivas que habitam ambiente na interface água do mar-gelo (JUNGE et al., 1998).

Figura 35. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para a Classe *Gammaproteobacteria*. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Kimura 2-parâmetros e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas através do programa MEGA.

Figura 36. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para a Classe *Alphaproteobacteria*. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Kimura 2-parâmetros e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas através do programa MEGA.

Figura 37. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para a Classe *Betaproteobacteria*. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Kimura 2-parâmetros e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas através do programa MEGA.

Três representante cultivados foram associados filogeneticamente com isolado SL CF5(L) (Figuras 34 e 38), sendo que dois deles não possuem dados publicados: um cultivado do gênero *Subtercola* (AM940948) provém de amostras de solo da Antártica e o outro, que pertence ao gênero *Clavibacter* (AJ864844) e foi isolado de amostras de água do Lago Joeri III, localizado nas regiões montanhosas da Suíça. O representante do gênero *Rhodoglobus* (AY439269), proveniente de amostras de gelo glacial da Groelândia, foi indicado como candidato para nova espécie do grupo de acordo com as análises filogenéticas e apresentou similaridade com cultivado *Rhodoglobus vestalii*, que foi descrito como uma nova bactéria psicrófila e isolado de um lago de McMurdo Ice Shelf ("Lago Vestal"), Antártica (MITEVA;

SHERIDAN; BRENCHLEY, 2004). Esta espécie nova possui como características taxonômicas: células são aeróbicas, Gram-positivas, não-formadoras de esporos, colônias de cor vermelha, crescem em temperatura ótima de 18 °C, e contém 62 % mol de concentração de GC para DNA genômico (SHERIDAN et al., 2003).

Figura 38. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre as culturas isoladas pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10 e as “sequências-vizinhas” com maiores identidades no banco de dados para o Filo *Actinobacteria*. Construída com o método Neighbor-Joining, modelo Kimura 2-parâmetros e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas através do programa MEGA.

O isolado SL CF5(L) (Figuras 34 e 38) apresentou similaridade com dois clones ambientais (AJ440992; DQ521562), que são provenientes de amostras de mantos microbianos do Lago Fryxell e de amostras de gelo do Lago Vida, respectivamente; ambos os lagos estão situados em McMurdo Dry Valleys, Antártica. Estes dois clones também se relacionaram filogeneticamente entre si. A composição de ácidos graxos do clone Antarctic bacterium R-8287 (AJ440992) indicou associação com grupo de bactérias Gram-positivas (alta %GC) e apresentou, pela análise para gene rRNA 16S, taxa de similaridade de 96,1% com isolado

Clavibacter michiganensis, depositado no banco de dados (VAN TRAPPEN et al., 2002). O clone ambiental ANTLV9_G02 (DQ521562) foi encontrado na região superficial do gelo (~ 4,8 m) do Lago Vida, que é considerado um lago pereno, congelado e com concentração alta de salinidade (MOSIER et al., 2007).

4.3.4 Testes Adicionais

4.3.4.1 Análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (Fatty Acid Methyl Ester - FAME)

Dois isolados deste estudo, SL CF5(L) e SL 26.9(L), cujas sequências nucleotídicas apresentaram baixa similaridade com as sequências do banco de dados, pertencentes ao Filo *Actinobacteria*, foram submetidos à análise microbiana dos ésteres metilados de ácidos graxos (FAME) para complementar na caracterização taxonômica.

O perfil da composição de ácidos graxos do isolado SL CF5(L), indica que o mesmo pertence ao grupo de bactérias Gram-negativas (Tabela 11). Adicionalmente, obteve valores de *Similarity Index* entre 0,456 e 0,326, sugerindo serem linhagens bacterianas ainda desconhecidas. As identificações microbianas indicadas por esta técnica diferem dos grupos taxonômicos obtidos das análises filogenéticas para o gene rRNA 16S (Figuras 31 e 35). Dessa forma, outras análises deverão ser realizadas para definir a sua classificação taxonômica.

O isolado SL 26.9(L) é um Gram-positivo conforme o perfil da composição dos ácidos graxos obtido neste análise (Tabela 12). E apresentou apenas um valor de *Similarity Index*, no qual designa ser pertencente ao gênero *Microbacterium*, entretanto, ainda não foi possível determinar em nível de espécie, uma vez que não houve compatibilidade com os resultados estabelecidos nas análises filogenéticas para gene rRNA 16S e maiores estudos são necessários para concluir a caracterização taxonômica deste isolado bacteriano.

Tabela 11 - Composição celular dos ácidos graxos da cultura isolada, SL CF5(L), pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10, proveniente das amostras de água do mar da Antártica.

Ácidos Graxos	% do total
14:0 iso	0.26
15:1 anteiso A	4.29
15:0 iso	1.09
15:0 anteiso	62.22
16:0 iso	9.82
16:0	1.10
17:0 anteiso	20.52
17:0 3OH	0.70

Valores de *Similarity Index* (Sherlock Version 6.1):

0.456	<i>Curtobacterium-flaccumfaciens</i>
0.441	<i>Curtobacterium-citreum</i>
0.410	<i>Kocuria-kristinae</i> -GC subgroup A
0.369	<i>Kocuria-kristinae</i> -GC subgroup B
0.326	<i>Bacillus</i> -GC group 22 (No 16S match to known species)

Tabela 12 - Composição celular dos ácidos graxos da cultura isolada, SL 26.9(L), pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10, proveniente das amostras de água do mar da Antártica.

Ácidos Graxos	% do total
14:0 iso	0.65
15:0 iso	4.52
15:0 anteiso	36.30
16:0 iso	18.65
16:0	2.21
17:0 iso	2.33
17:0 anteiso	35.33

Valores de *Similarity Index* (Sherlock Version 6.1):

0.815	<i>Microbacterium-barkeri</i> (<i>Aureobacterium</i> , <i>Corynebacterium</i>)
-------	--

De acordo com os resultados obtidos através das análises realizadas no estudo da aplicação da técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10, pode-se observar que foi

possível obter um elevado número de isolados bacterianos, pertencentes a diferentes grupos taxonômicos, e que apresentaram similaridades com representantes cultivados descritos em ambientes polares. No entanto, não houve o isolamento de bactérias de grupos considerados presentes exclusivamente em ambientes marinhos.

Além disso, ao empregar a técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10, apenas um isolado, SL CF5(L), pode ser considerado candidato de bactéria ainda "não-cultivada" ou até mesmo uma nova espécie. Neste caso, outras análises fenotípicas e genômicas deverão ser realizadas para confirmar sua classificação taxonômica.

4.3.5 Identificação dos genes *alk* e análise filogenética

A presença de genes funcionais, que codificam para a enzima alceno monooxigenase (genes *alk*), ligada à via de biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos, foi detectada nos representantes bacterianos dos Filos *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, encontrados nas amostras de água do mar da região Península Antártica estudada.

Vinte e três isolados amplificaram para os genes *alk* (Figura 39), dos quais, 11 foram sequenciados (Figura 40): seis apresentaram alta similaridade (98%) ao gene *alkB4* descrito previamente em *Rhodococcus* sp., cujos representantes são das Classes *Alpha*-, *Beta*- e *Gammaproteobacteria*, e do Filo *Actinobacteria*; quatro pertencem a outros grupos do gene *alkB*. Um dos isolados (*Sphingomonas* sp.) apresentou similaridade com uma sequência de gene *alkM*, encontrada, pela primeira vez, em clones ambientais de sedimentos antárticos, na mesma região de coleta - Botany Point, descritos em estudo prévio do nosso grupo na Antártica (KUHN; BELLICANTA; PELLIZARI, 2009), alcançando um dos objetivos deste trabalho. A identificação e detecção dos genes funcionais nos doze isolados restantes apresentaram resultados de bandas inespecíficas para genes *alk* através do uso de PCR, dessa forma, deverão ser repetidos.

Figura 39. Foto de eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR purificados para genes *alk* dos isolados obtidos pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10. M: Marcador molecular Low Mass.

Na amostra de BP (6 isolados), a presença dos genes *alk* se apresentou distribuída nas três profundidades de coleta (1, 10 e 20 m), sendo que o maior representação dos hospedeiros bacterianos encontrou-se na profundidade de 1 m. Enquanto que, em PU (3), somente na profundidade de 10 m, não se detectou a presença dos genes *alk* nos isolados obtidos. A diferença de composição da comunidade dos genes *alk* nos hospedeiros bacterianos isolados neste trabalho, pode ser resultado de atividades antropogênicas ao redor da Estação Antártica Brasileira (EACF), uma vez que estudos anteriores detectaram concentrações de hidrocarbonetos alifáticos nos sedimentos marinhos desta região da Baía do Almirantado, que podem ser provenientes das atividades logísticas e do efluente de esgoto (MARTINS et al., 2004).

Figura 40. Árvore filogenética das seqüências dos representantes dos genes *alk* dos isolados marinhos bacterianos relacionados com clones ambientais da Antártica. Os isolados estão marcados com caixa cinza; clones ambientais de CF em vermelho, de BP em azul, e de PU em verde.

Nove seqüências nucleotídicas dos genes *alk* dos isolados encontrados neste estudo, foram detectadas em grupos taxonomicamente diferentes das linhagens bacterianas depositadas nos bancos de dados, nas quais estes genes foram descritos anteriormente (Tabela 13), demonstrando que algumas bactérias que não são usualmente consideradas como degradadoras de hidrocarbonetos contêm genes homólogos aos genes alcano monoxigenases, podendo ser resultante de uma transferência horizontal de genes (HEAD; JONES; RÖLING, 2006).

De forma semelhante, um recente estudo obteve isolados bacterianos marinhos degradadores de óleo de amostras de água do mar coletadas da área superficial ao longo da região mediana, desde do Norte ao Sul, do Oceano Atlântico, em que se verificou a diversidade dos genes *alkB*. O gênero *Alcanivorax* foi o grupo dominante dentro dos isolados identificados pela análise do gene rRNA 16S. Além disso, a presença dos genes *alkB* foi detectada, pela primeira vez, nas bactérias representantes dos gêneros: *Bacillus*, *Brachybacterium*, *Kordiimonas*, *Gaetbulibacter*, *Leifsonia*, *Microbacterium*, *Solimonas* e *Tetrathiobacter* (WANG et al., 2010).

Tabela 13 - Identificação filogenética pela análise do gene rRNA 16S e genes *alk* das sequências nucleotídicas das bactérias isoladas de amostras de água marinha da Antártica.

genes <i>alk</i>	Hospedeiros bacterianos descritos na literatura	Hospedeiros bacterianos encontrados neste estudo
<i>alkB</i>	<i>Alcanivorax dieselolei</i> (EU853349) <i>Arthrobacter</i> sp. ITRH48 (FJ014912)	SL CF4; TA CF4: <i>Pseudomonas</i> sp.
<i>alkB4</i>	<i>Rhodococcus</i> sp. Q15 (AF388180)	SL 26.9(L): <i>Microbacterium</i> sp. TA 22.5 (A): <i>Comamonas</i> sp. SL 26.4 (BT); SL 26.8; SL 26.1: <i>Serratia marcescens</i> SL 30.4: <i>Blastomonas</i> sp.
<i>alkM</i>	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1 (CAA05333)	TA 33.8 (A): <i>Sphingomonas</i> sp.

O metabolismo de degradação de alcanos por determinadas espécies do gênero *Pseudomonas* já foi minuciosamente descrito, servindo dessa forma como referência para o entendimento do metabolismo de outros grupos taxonômicos (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003; SMITH e HYMAN, 2004; VAN BEILEN e FUNHOFF, 2005). Entretanto, a maior parte da comunidade microbiana ainda encontra-se desconhecida quanto aos seus mecanismos funcionais e fisiológicos, como podemos citar os gêneros *Microbacterium* e *Blastomonas* que foram isolados neste trabalho.

Os isolados bacterianos, nos quais foram detectados os genes *alk* foram depositados em coleções de cultura (CPQBA), sendo necessários estudos da sua capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e maiores conhecimentos das suas funções metabólicas, para posteriormente, ficarem disponíveis para bioprospecção tecnológica no Brasil.

A diversidade de genes responsáveis pela degradação de *n*-alcanos ainda permanece desconhecida. O tipo de alcano-hidroxilases pode estar associado com tamanho da cadeia de alcano, mas também, com o tipo de degradação, sugerindo que estas comunidades podem conter outros sistemas de degradação de alcanos, que não estão relatados com os genotipos *alk* testados e detectados até então; além disso, aparentemente, os genes alcano-hidroxilases parecem ser bastante divergentes em diferentes gêneros (LUZ et al., 2004).

Aparentemente, as bactérias degradadoras de óleo não são raras no ambiente marinho, sua ampla existência em ecossistemas oligotróficos indica que podem sobreviver, se alimentando obrigatoriamente ou facultativamente de alcanos, uma vez que a diversidade de genes P450, genes *alkB* e outras alcano-hidroxilases ainda não descritas, permite a utilização do vasto grupo de compostos de hidrocarbonetos (WANG et al., 2010).

Em suma, este projeto foi pioneiro em descrever o emprego de uma promissora metodologia adaptada da técnica de cultivo de alto desempenho em amostras de ambiente marinho de Ubatuba e Antártica, na qual foi possível obter isolados bacterianos, que podem ser considerados ainda "não-cultivados", de acordo com as análises para gene rRNA 16S. Além disso, pela técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10 (metodologia tradicional de cultivo), bactérias heterotróficas, encontradas no ambiente marinho antártico, foram isoladas e identificadas, sendo de grupos taxonômicos (Gênero) distintos em relação ao método HTC. E também resultados preliminares na identificação dos genes *alk* presentes nestes isolados foram analisados, alcançando assim, os principais objetivos.

Dessa forma, pode-se contribuir para o conhecimento da caracterização taxonômica e funcional de comunidades microbianas que constituem o ambiente marinho, e juntamente com outros estudos, possibilitar o entendimento do nicho ecológico que estes importantes procariotos realizam nos ciclos biogeoquímicos, sendo essenciais para sobrevivência e conservação dos ecossistemas e que podem apresentar potencial ainda não explorado para emprego biotecnológico, como na área de biodegradação de poluentes e entre outras.

5 CONCLUSÕES

5.1 Técnica de cultivo de alto desempenho

- No método HTC, quatro culturas bacterianas foram isoladas das amostras de água dos ambientes marinhos estudados: três isolados são provenientes das amostras de Ubatuba e um da amostra de Punta Ullmann, Antártica.
- As culturas UBA-01 e UBA-02 são candidatas de bactérias ainda "não-cultivadas", uma vez que tiveram maior relação com clones ambientais, conforme os resultados obtidos pelas análises filogenéticas para gene rRNA 16S.
- Embora a classificação taxonômica em nível de espécie bacteriana não ter sido determinada, pode-se considerar os isolados obtidos como linhagens ainda não descritas, pertencentes aos gêneros identificados através do gene rRNA 16S.

5.2 Técnica de inóculo em meio de cultura diluído 1/10

- Pela metodologia de diluição do meio de cultura em 1/10, foi possível isolar 81 bactérias de três pontos amostrais da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica: Botany Point, Comandante Ferraz e Punta Ullmann.
- O isolado SL CF5(L) pode ser candidato a uma nova espécie bacteriana cultivada ou a uma bactéria ainda "não-cultivada", de acordo com resultados obtidos das análises filogenéticas para gene rRNA 16S. Diferentes técnicas deverão ser aplicadas para determinar sua classificação taxonômica.
- A presença de genes funcionais *alk* (*alkB*, *alkB4* e *alkM*) foi detectada em onze isolados bacterianos, pertencentes às Classes *Alpha*-, *Beta*- e *Gammaproteobacteria*, e do Filo *Actinobacteria*.
- Um isolado bacteriano, representante do gênero *Sphingomonas*, apresentou similaridade com uma sequência de gene *alkM*, encontrada, pela primeira vez, em clones ambientais de sedimentos antárticos, na mesma região de coleta, Botany Point, descritos em estudo prévio.

REFERÊNCIAS*

ALAIN, K.; QUERELLOU, J. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. **Extremophiles**, v. 13, n. 4, p. 583-594, 2009.

ALMEIDA, W. I.; VIEIRA, R. P.; CARDOSO, A. M.; SILVEIRA, C. B.; COSTA, R. G.; GONZALEZ, A. M.; PARANHOS, R.; MEDEIROS, J. A.; FREITAS, F. A.; ALBANO, R. M.; MARTINS, O. B. Archaeal and bacterial communities of heavy metal contaminated acidic waters from zinc mine residues in Sepetiba Bay. **Extremophiles**, v. 13, n.2, p. 263–271, 2009.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol. Rev.**, v. 59, p.143–169, 1995.

AZAM, F.; Malfatti, F. Microbial structuring of marine ecosystems. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, p. 728-791, 2007.

BANO, N.; HOLLIBAUGH, J. T. Phylogenetic Composition of Bacterioplankton Assemblages from the Arctic Ocean. **ASM**, v. 68, n. 2, p. 505–518, 2002.

BARTSCHT, K.; CYPIONKA, H.; OVERMANN, J. Evaluation of cell activity and of methods for the cultivation of bacteria from a natural lake community. **FEMS: Microbiol. Ecol.**, v. 28, p. 249-259, 1999.

BELLICANTA, G. S. **Diversidade de Genes Catabólicos em Amostras de Sedimentos do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, SP**. 2004. 112 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2004.

BOZAL, M. N.; MONTES, J. J.; TUDELA, E.; GUINEA, J. Characterization of several *Psychrobacter* strains isolated from Antarctic environments and description of *Psychrobacter luti* sp. nov. and *Psychrobacter fozii* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 53, p. 1093–1100, 2003.

BROWN, M. V.; PHILIP, G. K.; BUNGE, J. A.; SMITH, M. C.; BISSETT, A.; LAURO, F. M.; FUHRMAN, J. A.; DONACHIE, S. P. Microbial community structure in the North Pacific ocean. **ISME J.**, v. 3, p. 1374–1386, 2009.

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

BRUNS, A.; HOFFELNER, H.; OVERMANN, J. A novel approach for high throughput cultivation assays and the isolation of planktonic bacteria. **FEMS: Microbiol. Ecol.**, v. 45, n. 2, p. 161-171, 2003.

BUTTON, D. K.; SCHUT, F.; QUANG, P.; MARTIN, R.; ROBERTSON, B.R. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 881-891, 1993.

CARLSON, C. A.; MORRIS, R.; PARSONS, R.; TREUSCH, A. H.; GIOVANNONI, S. J.; VERGIN, K. Seasonal dynamics of SAR11 populations in the euphotic and mesopelagic zones of the northwestern Sargasso Sea. **ISME J.**, v. 3, p. 283-295, 2009.

CASSLER, M.; PETERSON, C. L.; LEDGER, A.; POMPONI, S. A.; WRIGHT, A. E.; WINEGAR, R.; MCCARTHY, P. J.; LOPEZ, J. V. Use of real-time qpcr to quantify members of the unculturable heterotrophic bacterial community in a deep sea marine sponge, *Vetulina* sp. **Microbiol. Ecol.**, v. 55, n. 3, p. 384-394, 2008.

CHO, J. C.; GIOVANNONI, S. J. Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine *Gammaproteobacteria*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 1, p. 432-440, 2004.

CLEMENTINO, M. M.; VIEIRA, R. P.; CARDOSO, A. M.; NASCIMENTO, A. P. A.; SILVEIRA, C. B.; RIVA, T. C.; GONZALEZ, A. S. M.; PARANHOS, R.; ALBANO, R. M.; VENTOSA, A.; MARTINS, O. B. Prokaryotic diversity in one of the largest hypersaline coastal lagoons in the world. **Extremophiles**, v. 12, n. 4, p. 595-604, 2008.

COLWELL, R. R.; GRIMES, D. J. Semantics and Strategies. In:_____ (Ed.). **Nonculturable Microorganisms in the Environment**. Washington, DC: ASM Press, 2000. p. 1-6.

CONNON, S. A.; GIOVANNONI, S. J. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. **Appl. Environ. Microbio.**, v. 68, n. 8, p. 3878-3885, 2002.

DAI, X.; WANG, B. J.; YANG, Q. X.; JIAO, N. Z.; LIU, S. J. *Yangia pacifica* gen. nov., sp. nov., a novel member of the *Roseobacter* clade from coastal sediment of the East China Sea. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 56, p. 529-533, 2006.

DELONG, E. F. Microbial community genomics in the ocean. **Nat. Rev.: Microbiol.**, v. 3, p. 459-469, 2005.

DOJKA, M. A.; HARRIS, J. K.; PACE, N. R. Expanding the known diversity and environmental distribution of an uncultured phylogenetic division of bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 4, p. 1617–1621, 2000.

DUARTE, R. T. D. **Micro-organismos em ambientes criogênicos: gelo glacial, solos expostos por recuo de geleiras, e *permafrost* polares**. 2010. 201 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

EILERS, H.; PERNTHALER, J.; GLÖCKNER, F. O.; AMANN, R. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 7, p. 3044–3051, 2000.

ESCHENFELDT, W. H.; STOLS, L.; ROSENBAUM, H.; KHAMBATTA, Z. S.; QUAITE-RANDALL, E.; WU, S.; KILGORE, D. C.; TRENT, J. D.; DONNELLY, M. I. DNA from uncultured organisms as a source of 2,5-diketo-d-gluconic acid reductases. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 9, p. 4206–4214, 2001.

GICH, F.; SCHUBERT, K.; BRUNS, A.; HOFFELNER, H.; OVERMANN, J. Specific detection, isolation, and characterization of selected, previously uncultured members of the freshwater bacterioplankton community. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 10, p. 5908–5919, 2005.

GIOVANNONI, S. J.; TRIPP, J.; GIVAN, S.; PODAR, M.; VERGIN, K. L.; BAPTISTA, D.; BIBBS, L.; EADS, J.; RICHARDSON, T. H.; NOORDEWIER, M.; RAPPÉ, M. S.; SHORT, J. M.; CARRINGTON, J. C.; MATHUR, E. J. Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. **Science**, v. 309, n. 5738, p. 1242–1245, 2005.

GIOVANNONI, S.; STINGL, U. The importance of culturing bacterioplankton in the 'omics' age. **Nat. Rev.: Microbiol.**, v. 5, p. 820–826, 2007.

GOMILA, M.; BOWIEN, B.; FALSEN, E.; MOORE, E. R. B.; LALUCAT, J. Description of *Pelomonas aquatica* sp. nov. and *Pelomonas puraquae* sp. nov., isolated from industrial and haemodialysis water. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 57, p. 2629–2635, 2007.

GONTANG, E. A.; FENICAL, W.; JENSEN, P. R. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, n. 10, p. 3272–3282, 2007.

HARRIS, J. K.; KELLEY, S. T.; PACE, N. R. New perspective on uncultured bacterial phylogenetic Division OP11. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 2, p. 845–849, 2004.

HATAMOTO, M.; IMACHI, H.; OHASHI, A.; HARADA, H. Identification and cultivation of anaerobic, syntrophic long-chain fatty acid-degrading microbes from mesophilic and thermophilic methanogenic sludges. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, n. 4, p. 1332–1340, 2007.

HEAD, I.M.; JONES, D.M.; RÖLING, W.F.M. Marine microorganisms make a meal of oil nature. **Nat. Rev.: Microbiol.**, v. 4, p. 173-182, 2006.

HEYLEN, K.; VANPARYS, B.; WITTEBOLLE, L.; VERSTRAETE, W.; BOON, N.; DE VOS, P. Cultivation of denitrifying bacteria: optimization of isolation conditions and diversity study. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 4, p. 2637–2643, 2006.

HIRAYAMA, H.; SUNAMURA, M.; TAKAI, K.; NUNOURA, T.; NOGUCHI, T.; OIDA, H.; FURUSHIMA, Y.; YAMAMOTO, H.; OOMORI, T.; HORIKOSHI, K. Culture-Dependent and -Independent Characterization of Microbial Communities Associated with a Shallow Submarine Hydrothermal System Occurring within a Coral Reef off Taketomi Island, Japan. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, n. 23, p. 7642–7656, 2007.

HUNTER-CEVERA, J.; KARL, D.; BUCKLEY, M. A report from the American Academy of Microbiology Marine microbial diversity: The key to earth's habitability. **AAM**, p. 1-22, 2005.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H. N. (Ed.). **Mammalian Protein Metabolism**. New York: Academic Press, 1969. p. 21-132.

JUNGE, K.; GOSINK, J. J.; HOPPE, H. G.; STALEY, J. T. *Arthrobacter*, *Brachybacterium* and *Planococcus* isolates identified from antarctic sea ice brine. Description of *Planococcus mcmeekinii*, sp. nov. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 21, n.2, p. 306-314, 1998.

KIMURA, M. A. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KÖPKE, B.; WILMS, R.; ENGELEN, B.; CYPIONKA, H.; SASS, H. Microbial Diversity in coastal subsurface sediments: a cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 12, p. 7819–7830, 2005.

KUHN, E.; BELLICANTA, G. S.; PELLIZARI, V. H. New *alk* genes detected in Antarctic marine sediments. **Environ. Microbiol.**, v. 11, n.3, p. 669-673, 2009.

KUNITSKY, C.; OSTERHOUT, G.; SASSER, M. Identification of microorganisms using Fatty Acid Methyl Ester (FAME) analysis and the Midi Sherlock® Microbial identification system. In: MILLER, M. J. **Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods**. Newark: MIDI Inc., 2006. p. 1-18.

LUDWIG, W.; STRUNK, O.; WESTRAM, R.; RICHTER, L.; MEIER, H.; YADHUKUMAR; BUCHNER, A.; LAI, T.; STEPPI, S.; JOBB, G.; FORSTER, W.; BRETTSCHE, I.; GERBER, S.; GINHART, A.; GROSS, O.; GRUMANN, S.; HERMANN, S.; JOST, R.; KONIG, A.; LISS, T.; LUSMANN, R.; MAY, M.; NONHOFF, B.; REICHEL, B.; STREHLOW, R.; STAMATAKIS, A.; STUCKMANN, N.; VILBIG, A.; LENKE, M.; LUDWIG, T.; BODE, A.; SCHLEIFER, K. ARB: a software environment for sequence data. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1363-1371, 2004.

LUZ, A. P.; PELLIZARI, V. H.; WHYTE, L. G.; GREER, C. W. A survey of indigenous microbial hydrocarbon degradation genes in soils from Antarctica and Brazil. **Can. J. Microbiol.**, v. 50, n. 5, p. 323-333, 2004.

LUZ, A. P.; CIAPINA, E. M. P.; GAMBA, R. C.; LAURETTO, M. S.; FARIAS, E. W. C.; BICEGO, M. C.; TANIGUCHI, S.; MONTONE, R. C.; PELLIZARI, V. H. Potential for bioremediation of hydrocarbon polluted soils in the Maritime Antarctic. **Antarct. Sci.**, v. 18, n. 3, p. 335-343, 2006.

MALIK, A.; SAKAMOTO, M.; HANAZAKI, S.; OSAWA, M.; SUZUKI, T.; TOCHIGI, M.; KAKII, K. Coaggregation among Nonflocculating Bacteria Isolated from Activated Sludge. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 10, p. 6056-6063, 2003.

MARTINS, C. C.; BÍCEGO, M. C.; TANIGUCHI, S.; MONTONE, R. C. Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments in Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Antarct. Sci.**, v. 16, p. 117-122, 2004.

MESQUITA, H. S. L. Densidade e distribuição do bacterioplankton nas águas de Ubatuba (23°S 45°W), Estado de São Paulo. **Publ. Esp. Inst. Oceanogr.**, v. 10, p. 45-63, 1993.

MIKUCKI, J. A.; PRISCU, J. C. Bacterial Diversity Associated with Blood Falls, a Subglacial Outflow from the Taylor Glacier, Antarctica. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, n. 12, p. 4029-4039, 2007.

MITEVA, V. I.; SHERIDAN, P. P.; BRECHLEY, J. E. Phylogenetic and Physiological Diversity of Microorganisms Isolated from a Deep Greenland Glacier Ice Core. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 1, p. 202-213, 2004.

MORAES, P. C. **Dinâmica bacteriana em sedimentos costeiros de Ubatuba, São Paulo.** 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MOSIER, A. C.; ALISON E.; MURRAY, A. E.; FRITSEN, C. H. Microbiota within the perennial ice cover of Lake Vida, Antarctica. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 59, p. 274-288, 2007.

NICHOLS, D.; CAHOON, N.; TRAKHTENBERG, E. M.; PHAM, L.; MEHTA, A.; BELANGER, A.; KANIGAN, T.; LEWIS, K.; EPSTEIN, S. S. Use of Ichip for High-Throughput *In Situ* Cultivation of “Uncultivable” Microbial Species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, n. 8, p. 2445–2450, 2010.

OH, H.; KANG, I.; FERRIERA, S.; GIOVANNONI, S. J.; CHO, J. Genome sequence of an oligotrophic marine Gammaproteobacterium HTCC2143 isolated from Oregon coast. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 17, p. 4530–4531, 2010.

PAGE, K. A.; CONNON, S. A.; GIOVANNONI, S. J. Representative freshwater bacterioplankton isolated from Crater Lake, Oregon. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 11, p. 6542–6550, 2004.

PEDRÓS-ALIÓ, C. Marine microbial diversity: can it be determined? **Trends Microbiol.**, v. 14, n. 6, p. 257–263, 2006.

PIZA, F. F.; PRADO, P. I.; MANFIO, G. P. Investigation of bacterial diversity in Brazilian tropical estuarine sediments reveals high actinobacterial diversity. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, p. 317–328, 2004.

RANCHOU-PEYRUSE, A.; HERBERT, R.; CAUMETTE, P.; GUYONEAUD, R. Comparison of cultivation-dependent and molecular methods for studying the diversity of anoxygenic purple phototrophs in sediments of an eutrophic brackish lagoon. **Environ. Microbiol.**, v. 8, n. 9, p. 1590–1599, 2006.

RAPPÉ, M. S.; CONNON, S. A.; VERGIN, K. L.; GIOVANNONI, S. J. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. **Nature**, v. 418, n. 8, p. 630–633, 2002.

RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 57, p. 369–94, 2003.

REDDY, G. S. N.; RAGHAVAN, P. U. M.; SARITA, N. B.; PRAKASH, J. S. S.; NAGESH, N.; DELILLE, D.; SHIVAJI, S. *Halomonas glaciei* sp. nov. isolated from fast ice of Adelie Land, Antarctica. **Extremophiles**, v. 7, p. 55–61, 2003.

ROSSELLO-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS: Microbiol. Rev.**, v. 25, n. 1, p. 39–67, 2001.

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

SANTIAGO-VÁZQUEZ, L. Z.; BRÜCK, T. B.; WOLFRAM M BRÜCK, W. M.; DUQUE-ALARCÓN, A. P.; MCCARTHY, P. J.; KERR, R. G. The diversity of the bacterial communities associated with the azooxanthellate hexacoral *Cirrhipathes lutkeni*. **ISME J.**, v. 1, p. 654–659, 2007.

SAPP, M.; WICHELS, A.; GERDTS, G. Impacts of cultivation of marine diatoms on the associated bacterial community. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, n. 9, 3117–3120, 2007.

SCHUT, F.; DE VRIES, E. J.; GOTTSCHAL, J. C.; ROBERTSON, B. R.; HARDER, W.; PRINS, R. A.; BUTTON, D. K. Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 2150–2160, 1993.

SHERIDAN, P. P.; LOVELAND-CURTZE, J.; MITEVA, V. I.; BRECHLEY, J. E. *Rhodoglobus vestalii* gen. nov., sp. nov., a novel psychrophilic organism isolated from an Antarctic Dry Valley lake. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 53, p. 985–994, 2003.

SIMU, K.; HOLMFELDT, K.; ZWEIFEL, U. L.; HAGSTRÖM, A. Culturability and coexistence of colony-forming and single-cell marine bacterioplankton. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 8, p. 4793–4800, 2005.

SIPKEMA, D.; HOLMES, B.; NICHOLS, S. A.; BLANCH, H. W. Biological Characterisation of *Haliclona* (?gellius) sp.: Sponge and Associated Microorganisms. **Microbiol. Ecol.**, v. 58, n. 4, p. 903–920, 2009.

SMITH, C. A.; HYMAN, M. R. Oxidation of methyl *tert*-butyl ether by alkane hydroxylase in dicyclopropylketone-induced and *n*-octane-grown *Pseudomonas putida* GPo1. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 8, p. 4544–4550, 2004.

STEVENSON, B. S.; EICHORST, S. A.; WERTZ, J. T.; SCHMIDT, T. M.; BREZNAK, J. A. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 8, p. 4748–4755, 2004.

STINGL, U.; TRIPP, H. J.; GIOVANNONI, S. J. Improvements of high-throughput culturing yielded novel SAR11 strains and other abundant marine bacteria from the Oregon coast and the Bermuda Atlantic Time Series study site. **ISME J.**, v. 1, p. 361–371, 2007.

STINGL, U.; CHO, J. C.; FOO, W.; VERGIN, K. L.; LANOIL, B.; GIOVANNONI, S. J. Dilution-to-extinction culturing of psychrotolerant planktonic bacteria from permanently ice-covered lakes in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. **Microbial Ecol.**, v. 55, n. 3, p. 395–405, 2008.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596–1599, 2007.

TAN, G. L.; SHU, W. S.; HALLBERG, K. B.; LI, F.; LAN, C. Y.; HUANG, L. N. Cultivation-dependent and cultivation-independent characterization of the microbial community in acid mine drainage associated with acidic Pb/Zn mine tailings at Lechang, Guangdong, China. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 59, p. 118–126, 2007.

THRASH, J. C.; CHO, J. C.; VERGIN, K. L.; GIOVANNONI, S. J. The genome sequences of *Oceanicola granulosus* HTCC2516 and *O. batsensis* HTCC2597. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 13, p. 3549–3550, 2010a.

THRASH, J. C.; STINGL, U.; CHO, J. C.; FERRIERA, S.; JOHNSON, J.; VERGIN, K. L.; GIOVANNONI, S. J. Genome Sequence of the Novel Marine Member of the *Gammaproteobacteria* Strain HTCC5015. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 14, p. 3838–3839, 2010b.

THRASH, J. C.; CHO, J. C.; FERRIERA, S.; JOHNSON, J.; VERGIN, K. L.; GIOVANNONI, S. J. Genome Sequence of strains HTCC2148 and HTCC2080, belonging to the OM60/NOR5 clade of the *Gammaproteobacteria*. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 14, p. 3842–3843, 2010c.

VAN BEILEN, J. B.; LI, Z.; DUETZ, W. A.; SMITS, T. H. M.; WITHOLT, B. Diversity of alkanes hydroxylases systems in the environment. **Oil Gas Sci. Technol.**, v. 58, n. 4, p. 427–440, 2003.

VAN BEILEN, J. B.; FUNHOFF, E. G. Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 16, p. 308–314, 2005.

VAN BEILEN, J. B.; FUNHOFF, E. G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 74, n. 1, p. 13–21, 2007.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 67, n. 4, p. 503–549, 2003.

VAN TRAPPEN, S.; MERGAERT, J.; VAN EYGEN, S.; DAWYNDT, P.; MARGO C. CNOCKAERT, M. C.; SWINGS, J. Diversity of 746 Heterotrophic Bacteria Isolated from Microbial Mats from Ten Antarctic Lakes. **System. Appl. Microbiol.**, v. 25, p. 603–610, 2002.

VAN TRAPPEN, S.; MERGAERT, J.; SWINGS, J. *Loktanella salsilacus* gen. nov., sp. nov., *Loktanella fryxellensis* sp. nov. and *Loktanella vestfoldensis* sp. nov., new members of the *Rhodobacter* group, isolated from microbial mats in Antarctic lakes. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 54, p. 1263–1269, 2004.

VANCANNEYT, M.; SCHUT, F.; SNAUWAERT, C.; GORIS, J.; SWINGS, J.; GOTTSCHAL, J. C. *Sphingomonas alaskensis* sp. nov., a dominant bacterium from a marine oligotrophic environment. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 73–79, 2001.

VAZ-MOREIRA, I.; NOVO, A.; HANTSIS-ZACHAROV, E.; LOPES, A. R.; GOMILA, M.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M.; HALPERN, M. *Acinetobacter rudis* sp. nov. isolated from raw milk and raw wastewater. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2011. doi:10.1099/ij.s.0.027045-0. In press.

VIEIRA, R. P.; GONZALEZ, A. M.; CARDOSO, A. M.; OLIVEIRA, D. N.; ALBANO, R. M.; CLEMENTINO, M. M.; MARTINS, O. B.; PARANHOS, R. Relationships between bacterial diversity and environmental variables in a tropical marine environment, Rio de Janeiro. **Environ. Microbiol.**, v. 10, n. 1, p. 189-199, 2008.

WANG, L.; WANG, W.; LAI, Q.; SHAO, Z. Gene diversity of CYP153A and AlkB alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean. **Environ. Microbiol.**, v. 12, n. 5, p. 1230–1242, 2010.

WATVE, M.; SHEJVAL, V.; SONAWANE, C.; RAHALKAR, M.; MATAPURKAR, A.; SHOUCHE, Y.; PATOLE, M.; PHADNIS, N.; CHAMPHENKAR, A.; DAMLE, K.; KARANDIKAR, S.; KSHIRSAGAR, V.; JOG, M. The ‘K’ selected oligophilic bacteria: a key to uncultured diversity? **Curr. Sci.**, v. 78, p. 1535–1542, 2000.

WEID, I. V. D.; MARQUES, J. M.; CUNHA, C. D.; LIPPI, R. K.; DOS SANTOS, S. C.; ROSADO, A. S.; LINS, U.; SELDIN, L. Identification and biodegradation potential of a novel strain of *Dietzia cinnamomea* isolated from a petroleum-contaminated tropical soil. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 30, p. 331-339, 2007.

WILSON, K. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Ed.). **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: Wiley, John & Sons, Inc., 1987. p. 2.4.1.- 2.4.2.

WHYTE, L. G.; SCHULTZ, A.; VAN BEILEN, J. B.; LUZ, A. P.; PELLIZARI, V. H.; LABBÉ, D.; GREER, C. W. Prevalence of alkane monooxygenase genes in arctic and antarctic hydrocarbon contaminated and pristine soils. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 41, n. 2, p. 141–150, 2002.

XIAO, X.; LI M.; YOU Z.; WANG, F. Bacterial communities inside and in the vicinity of the Chinese Great Wall Station, King George Island, Antarctica. **Antarct. Sci.**, v. 19, n. 1, p. 11-16, 2007.

YAKIMOV, M. M.; GIULIANO, L.; GENTILE, G.; CRISAFI, E.; CHERNIKOVA, T. N.; WOLF-RAINER ABRAHAM, W.; LÜNSDORF, H.; TIMMIS, K. N.; GOLYSHIN, P. N. *Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 53, p. 779–785, 2003.

YASUMOTO-HIROSE, M.; NISHIJIMA, M.; NGIRCHECHOL, M. K.; KANO, K.; SHIZURI, Y.; MIKI, W. Isolation of marine bacteria by in situ culture on media-supplemented polyurethane foam. **IMB**, v. 8, p. 227–237, 2006.

YING, J. Y.; WANG, B. J.; DAI, X.; YANG, S. S.; LIU, S. J.; LIU, Z. P. *Wenxinia marina* gen. nov., sp. nov., a novel member of the *Roseobacter* clade isolated from oilfield sediments of the South China Sea. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 57, p. 1711–1716, 2007.

YOSHINAGA, M. Y.; QUINTANA, C. O.; SUMIDA, P. Y. G. Sedimentary chlorophyll-*a* and microbial biomass as indicators of benthic processes in coastal and shelf areas of the SE Brazilian coast (Ubatuba, SP). **J. Coastal Res.**, v. SI 39, p. 1098–1101, 2004.

ZENGLER, K.; TOLEDO, G.; RAPPÉ, M.; ELKINS, J.; MATHUR, E. J.; SHORT, J. M.; KELLER, M. Cultivating the uncultured. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, n. 24, p. 15681–15686, 2002.