



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

SINARA CARLA DA SILVA ARAÚJO

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE BIOSURFACTANTES
IDENTIFICADOS EM BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS**

**NATAL
2014**

SINARA CARLA DA SILVA ARAÚJO

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE BIOSSURFACTANTES
IDENTIFICADOS EM BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Lucymara Fassarella Agnez Lima.

**NATAL
2014**

Catálogo da Publicação na Fonte
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Araújo, Sinara Carla da Silva.

Expressão heteróloga de biossurfactantes identificados em bibliotecas metagenômicas / Sinara Carla da Silva Araújo. - Natal, 2014.

65f: il.

Orientadora: Profa. Dra. Lucymara Fassarella Agnez-Lima.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Biossurfactantes - Dissertação. 2. Metagenômica - Dissertação. 3. Proteína hipotética - Dissertação. I. Agnez-Lima, Lucymara Fassarella. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE01

CDU 577.1

Dedico esta obra

A Deus, meus pais, minha família, meus amigos, meu noivo
pelo apoio e incentivo.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por estar comigo em todos os momentos, sempre me dando forças.

A minha família, em especial ao meu pai que sempre me incentivou e investiu nos meus estudos. E minha mãe que em meio às dificuldades permaneceu ao meu lado.

A minha querida vovó Zefa (*in memoriam*) que sempre, sempre, sempre me incentivava e me dava os melhores conselhos.

Ao meu noivo Marcio Miranda por ter aguentado meus estresses e por esta ao meu lado nos momentos difíceis.

A minha orientadora Lucymara pela oportunidade, por ter me proporcionado tamanho aprendizado e por acreditar na minha capacidade.

A melhor turma de mestrado que o programa da Bioquímica já teve, sem vocês seria ainda mais árdua essa batalha. Obrigada a Kahena, Jota, Jonalson, Tonho, Marina, Diego, Paula e Demétrios, Rômulo e Evellyn por terem me proporcionado momentos que jamais serão esquecidos, obrigada pelas risadas, pelas ajudas e tudo que vivemos, espero que nada disso acabe. Além dos agregados Ricardo, Rosa e Anderson.

Ao grupo metagenoma, em especial a Rita que sempre que eu precisei (e não foram poucas vezes) estava disposta a me ajudar. Pessoa com a qual aprendi muuuuuuuuuuito, então muito obrigada Ritinha!!!!

A família LBMG, a todos que me ajudaram de alguma forma ou fizeram meus dias mais alegres. Abi, Fabíola, Daniel, Geka, Lela, Rai, Jana, Fernanda, Uaska, Del, Amanda, Tirzah...todos!!!

Amigas especiais e biólogas: Márcia e Larissa.

Aos amigos de laboratório que fiz e pretendo levar por toda vida. A Piri (Julliane), Fafa e Rai que ficaram comigo várias vezes até altas horas da noite, a Mulher Rica (Aninha) pelas ajudas, Dani que me deu várias caronas, Henrique, Rita.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

“Não sabendo que era impossível,
foi lá e fez”. Jean Cocteau.

RESUMO

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e estão presentes em toda biosfera, no entanto estima-se que apenas 1% das espécies pode ser cultivada por técnicas laboratoriais padrão. Dentro dessa diversidade existe um enorme *pool* genético e biológico a ser explorado. A metagenômica tornou possível o acesso direto ao genoma microbiano derivado de amostras ambientais. A metodologia permite obter informação funcional de proteínas, assim como a identificação de potenciais produtos com interesse biotecnológico e de novos recursos biológicos industrialmente exploráveis, a exemplo de novas soluções para impactos ambientais. Áreas contaminadas com petróleo são caracterizadas por um grande acúmulo de hidrocarbonetos e os surfactantes são utilizados como coadjuvantes em biorremediação. Sendo assim, a abordagem metagenômica foi utilizada para selecionar genes envolvidos no processo de degradação e emulsificação de hidrocarbonetos. Em um trabalho anterior, o DNA ambiental (eDNA) foi extraído de amostras de solo coletadas em duas diferentes áreas (Caatinga e de um rio salino) do Rio Grande do Norte (Brasil), as bibliotecas metagenômicas foram construídas e analisadas funcionalmente. Os clones capazes de degradar o óleo foram avaliados quanto à capacidade de sintetizar biosurfactante. Vários clones foram analisados e sequenciados e um clone revelou uma ORF com 897 pb, 298 aminoácidos, referente uma proteína de peso molecular próximo a 34 kDa. A busca por homologia no *GenBank* revelou similaridade com a sequência que codifica uma proteína hipotética de representantes da família *Halobacteriaceae*, que foram mostradas recentemente como produtoras de biosurfactantes. A presença da sequência codificante inserida e do fenótipo adquirido foram confirmadas. *Primers* foram desenhados e suas ORFs amplificadas por PCR. Em seguida, foram subclonadas em vetor de expressão pETDuet-1, contendo uma cauda de histidina, para expressão e posterior purificação da proteína de interesse. Os testes de emulsificação, atividade emulsificante e degradação de hidrocarbonetos foram realizados para confirmação da atividade e apresentaram resultados positivos. O ensaio de imunodeteção (*western blot*) com a utilização do anticorpo monoclonal *Anti-His®* confirmou a presença da proteína ambiental. Esse estudo foi o primeiro a relatar uma possível proteína com atividade biosurfactante obtida a partir de uma abordagem metagenômica.

PALAVRAS-CHAVE: Metagenômica, biosurfactantes, proteína hipotética, degradação de hidrocarbonetos.

ABSTRACT

The microorganisms have a vast genetic diversity and they are present throughout the biosphere, however, only about 1% of the species can be cultivated by traditional cultivation techniques. Within this diversity there is a huge *pool* genetic and biological being explored. The metagenomics has enabled direct access to microbial genome derived from environmental samples using independent methods of cultivation. The methodology enables to obtain functional information about the proteins, as well as identify potential products with biotechnological interest and new industrially exploitable biological resources, such as new solutions to environmental impacts. Oil-contaminated areas are characterized by a large accumulation of hydrocarbons and surfactants may be used for bioremediation. Thus, the metagenomic approach was used in this study in order to select genes involved in the degradation and hydrocarbon emulsification. In a previous work, the environmental DNA (eDNA) was extracted from soil samples collected from two different areas (Caatinga and Saline River) of Rio Grande do Norte (Brazil), the metagenomic libraries were constructed and functionally analyzed. The clone able to degrade the oil was evaluated for the ability to synthesize biosurfactants. The sequence analysis revealed an ORF with 897 bp, 298 amino acids and a protein with around 34 kDa. The search for homology in *GenBank* revealed sequence similarity with a hypothetical protein of representatives *Halobacteriaceae* family, who were recently shown as strains producing biosurfactants. The presence of the inserted coding sequence and the acquired phenotype was confirmed. *Primers* were designed and the ORF amplified by PCR. The ORF was subcloned into pETDuet-1 expression vector for subsequent purification of the protein of interest containing a histidine tail. The tests performed to confirm the biosurfactant activity and the ability of hydrocarbon degradation showed positive results. The immunodetection test (western blot) using the monoclonal *Anti-His®* confirmed the presence of the environmental protein. This study was the first to report a possible protein with biosurfactant activity obtained from a metagenomic approach.

KEY WORDS: Metagenomic, biosurfactants, hypothetical protein, degradation hydrocarbon.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Mapa físico do vetor de expressão pETDuet-1	17
FIGURA 2- Alinhamento utilizando as sequências mais intimamente relacionadas à sequência da proteína hipotética do clone 3C6.....	23
FIGURA 3- Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento destacando a proteína hipotética e a maior similaridade com três espécies pertencentes à mesma família.....	24
FIGURA 4- Resultado obtido pelo servidor <i>online HHPred</i>	25
FIGURA 5- Análise da similaridade estrutural prevista para a proteína recombinante usando o servidor <i>online PHYRE 2</i>	25
FIGURA 6- Inseto purificado a partir do gel de agarose, após digestão para retirada do vetor pCR®-Blunt.....	26
FIGURA 7- Eletroforese dos produtos da PCR utilizando <i>primers</i> específicos para amplificação do inseto.....	26
FIGURA 8- Imunodeteção mostrando o produto proteico com diferentes tempos de indução.....	27
FIGURA 9- Otimização da produção da emulsão.....	28
FIGURA 10- Ensaio de emulsificação.....	29
FIGURA 11- Índice de emulsificação.....	30
FIGURA 12- Ensaio de emulsificação, 6 meses após sua realização.....	31
FIGURA 13- Atividade emulsificante.....	32
FIGURA 14- Ensaio de degradação de hidrocarbonetos.....	33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Sequências dos <i>primers</i>	14
TABELA 2- Clones e enzimas de restrição específicas usadas nas respectivas digestões.....	16
TABELA 3- E24% obtido em diferentes condições de cultivo pelo clone e controle.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

E24% - índice de emulsificação 24 horas

IPTG - isopropiltio- β -D-galactosidase

kDa - kilodalton

LB - Luria-Bertani

ORF - (Open Reading Frame) Janela de leitura

pb - pares de base

PCR - reação de polimerase em cadeia

rpm - rotações por minutos

SDS - dodecil sulfato de sódio

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Diversidade microbiana.....	1
1.2- Metagenômica.....	2
1.3- Bioprospecção de genes.....	3
1.4- Bibliotecas metagenômicas.....	4
2- Aplicações econômicas.....	6
2.1- Petróleo.....	6
2.2- Biorremediação.....	7
2.3- Biodegradação.....	8
2.4- Surfactantes e Biossurfactantes.....	9
3- OBJETIVOS.....	12
3.1- Objetivo geral.....	12
3.2- Objetivos específicos.....	12
4- MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1- Análise de sequência utilizando ferramentas de bioinformática.....	13
4.2- Desenho de <i>primers</i>	13
4.3- Amplificação das ORF's, purificação e clonagem.....	14
4.4- Preparo de células competentes.....	15
4.5- Transformação bacteriana por choque térmico.....	15
4.6- Digestão para confirmação da presença do inserto.....	16
4.7- Tratamento das extremidades.....	17
4.8- Ligação ao vetor de expressão.....	17
4.9- Transformação em cepa <i>Rosetta</i> TM (<i>DE3</i>).....	17
4.10- Confirmação da transformação.....	18

4.11- Indução da expressão.....	18
4.12- Análise das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (<i>SDS-PAGE</i>).....	18
4.13- Imunodeteccção (<i>Western Blot</i>).....	19
4.14- Ensaio para confirmação da atividade de biossurfactante e degradação de hidrocarbonetos.....	19
4.14.1- Ensaio de emulsificação.....	20
4.14.2- Determinação da atividade emulsificante.....	21
4.14.3- Ensaio de degradação de petróleo.....	21
4.15- Análise estatística.....	21
5- RESULTADOS.....	22
5.1- Análise de sequência através de ferramentas de bioinformática.....	22
5.2- Subclonagem em vetor de expressão.....	25
5.3- Indução da expressão e imunodeteccção.....	26
5.4- Otimização do cultivo para produção de emulsão.....	27
5.5- Ensaio de emulsificação.....	29
5.6- Atividade de emulsificação.....	31
5.7- Ensaio de degradação de hidrocarbonetos.....	33
6- DISCUSSÃO.....	34
7- CONCLUSÃO.....	39
8- PERSPECTIVAS.....	40
9- REFERÊNCIAS.....	41

1- INTRODUÇÃO

1.1- Diversidade microbiana

Os microrganismos estão presentes em toda parte da biosfera, participando de importantes processos biológicos. Eles regulam a composição da atmosfera, influenciam o clima, reciclam nutrientes, degradam poluentes, participam da fixação de nitrogênio inorgânico associado a raízes, promovem a digestão de celulose em ruminante, entre outras (HUSE *et al.*, 2008). Sua presença e atividade são indispensáveis para o equilíbrio e funcionamento dos ecossistemas, além disso, representam uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico (HANDELSMAN *et al.*, 2007).

O número total de espécies procarióticas na Terra é estimado em aproximadamente 10^{30} , sendo que a maioria destas, ainda não foi descrita (TURNBAUGH e GORDON, 2008). Estimativas apontam que a diversidade microbiana presente no solo está entre 3.000 e 11.000 genomas por grama de solo, menos de 1% acessível através de técnicas de cultivo (TORSVIK e OVREAS, 2002; TORSVIK *et al.*, 2002; CURTIS e SLOAN, 2004).

Apesar de seu papel vital na Terra e suas aplicações biotecnológicas atuais e potenciais, a maior parte da diversidade e da capacidade metabólica dos microrganismos ainda permanece inexplorada (SINGH, 2010). A maior parte da biodiversidade microbiana é representada por microrganismos não cultiváveis, ou seja, não há conhecimento de técnicas de cultivo adequadas, o que dificulta a compreensão do funcionamento dos ecossistemas microbianos (ROLING *et al.*, 2010).

Essa diversidade microbiana representa um enorme *pool* genético e biológico que precisa ser melhor investigada para se obter um maior entendimento sobre as relações existentes nos ciclos naturais, além de proporcionar a busca de novos genes, vias metabólicas completas e seus produtos (COWAN *et al.*, 2005). Uma crescente variedade de importantes ferramentas se encontra em constante aprimoramento, o que está começando a facilitar a investigação relacionada aos microrganismos e suas comunidades (FERRER *et al.*, 2009).

1.2- Metagenômica

A metagenômica é uma abordagem que vem revolucionando e permitindo uma melhor compreensão das características genéticas do mundo microbiano. Essa nova ferramenta abre as portas para exploração científica de diversos microrganismos desconhecidos presentes em diferentes nichos, o que poderá ajudar a resolver desafios complexos nas áreas médica, ambiental, agrícola e industrial do mundo atual (HANDELSMAN *et al.*, 2007). A metagenômica possibilita o acesso ao genoma de comunidades microbianas transcendendo as limitações da genética e microbiologia clássicas, permitindo, por exemplo, a descoberta de novas espécies e de genes codificantes de novas enzimas ou enzimas mais eficientes do ponto de vista biotecnológico.

O termo metagenoma foi utilizado pela primeira vez por Handelsman *et al.* (1998) para estudar o genoma de todos os microrganismos presentes em um ambiente específico em oposição ao genoma do organismo isolado do ambiente e cultivado *in vitro*. Em grego, meta significa "transcendente", ou seja, capacidade de superar seus limites normais, e genômica significa o estudo completo do genoma de um determinado microrganismo. Qualquer estudo que aborde todos os indivíduos de uma comunidade de microrganismos como um único *pool* genômico pode ser visto como um exercício de metagenômica (KOWALCHUK *et al.*, 2007), sendo esta considerada a ciência das comunidades de microrganismos.

Os estudos metagenômicos consistem, inicialmente, na obtenção de uma amostra de um determinado ambiente que pode ser solo, água do mar, saliva humana, dentre outros, sem um passo de cultivo anterior. O DNA presente na amostra é extraído, fragmentado, ligado a um vetor e transferido para uma cepa bacteriana cultivável, geralmente de *Escherichia coli*, para então ser construída a biblioteca metagenômica. Existem outras propostas para fazer um estudo metagenômico, como no caso da *next generation sequencing*, em que o DNA é diretamente sequenciado sem que haja a necessidade de passar pela etapa de clonagem. A escolha da abordagem a ser utilizada, dependerá dos objetivos propostos pelo estudo (ELAINE, 2008).

Devido às limitações da exploração genética dependente de cultura, muitas tecnologias têm sido desenvolvidas com a finalidade de explorar essa riqueza de informações (COWAN *et al.*, 2005). A metagenômica é considerada uma potente abordagem que tem permitido elucidar genomas de microrganismos não cultiváveis e, conseqüentemente, a descoberta de novos produtos de interesse biotecnológico, como enzimas e biomoléculas (SCHMEISSER *et al.*, 2007). Tem sido crescente a identificação de novos genes, codificadores de produtos com potencial biotecnológico, tais como: esterase/lipase (HENNE *et al.*, 2000), protease (GUPTA *et al.*, 2002), amilase e β -lactamase (GABOR, 2004), lipase termoestável alcalina (MEILLEUR, 2009), genes de resistência a antibióticos (ALLEN, 2014), e β -glicosidasas (BERGMANN *et al.*, 2014).

Sendo assim, a metagenômica é uma poderosa ferramenta para explorar novas moléculas a partir de microrganismos não cultiváveis associados a ecossistemas naturais. A técnica permite a clonagem e sequenciamento de todo DNA presente em uma determinada amostra, assim como identificar ORFs (Open Reading Frame) ou genes que codificam as vias que podem direcionar a síntese de moléculas complexas, tais como biosurfactantes, que podem atuar na remediação de ambientes contaminados, entre outras aplicações.

1.3- Bioprospecção de genes

Segundo a Organização das Nações Unidas (UNESCO), bioprospecção é a pesquisa de material biológico com a finalidade de explorar os recursos genéticos de forma a garantir o uso sustentável. Sendo assim, se faz necessária à utilização de estratégias de conservação, a garantia de distribuição justa e equitativa dos benefícios advindos de sua utilização e a promoção e regulamentação de novas tecnologias, uma vez que este material biológico tornou-se um recurso e a informação genética tem valor de mercado (AZEVEDO, 2003).

Os microrganismos potencialmente exploráveis podem gerar inúmeros benefícios econômicos nos processos biotecnológicos para a produção de antibióticos e agentes terapêuticos, probióticos, produtos químicos, enzimas e

polímeros para aplicações industriais e tecnológicas, biorremediação de poluentes, dentre outros (CANHOS e MANFIOS, 2002). Sendo assim, se faz necessário investir em tecnologias que auxiliem no aprimoramento do conhecimento a respeito desses organismos (GARCIA, 1995).

A prospecção de genes em bibliotecas metagenômicas pode ser realizada de três formas distintas: prospecção funcional, prospecção baseada na sequência e prospecção baseada na expressão gênica induzida pelo substrato (UCHIYAMA e WATANABE, 2009).

Os avanços recentes obtidos na procura por novos produtos com atividades biológicas interessantes, fazem da clonagem metagenômica e da prospecção dos clones resultantes, uma tecnologia oportuna e factível (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Assim, bibliotecas de fragmentos de DNA vêm sendo estudadas para buscar novas biomoléculas que resultam na caracterização de clones com as mais diversas atividades.

1.4- Bibliotecas metagenômicas

Análises metagenômicas envolvem abordagens baseadas na análise de sequências ou análise funcional (GABOR *et al.*, 2007). As informações contidas em uma biblioteca metagenômica podem ser usadas para determinar a diversidade da comunidade microbiana, a presença de microrganismos específicos ou vias biossintéticas, bem como simplesmente pesquisar a presença de genes individuais (STEELE, 2005).

A análise funcional envolve a seleção de clones com um fenótipo particular como, por exemplo, tolerância a sal, produção de antibióticos ou atividade enzimática, e posterior identificação da origem filogenética do DNA clonado a partir do sequenciamento (DINSDALE *et al.*, 2008). A vantagem é a detecção de genes inteiros e produtos gênicos funcionais; independente das informações de sequências ou de similaridade entre sequências de genes conhecidos (SIMON e DANIEL, 2009).

Por outro lado, a análise baseada na sequência envolve o sequenciamento completo de clones contendo genes âncoras como o gene 16S rRNA e o gene de reparo de DNA *radA* (archaeal), que indicam o grupo

taxonômico dos organismos dos quais derivam tais clones (SINGH *et al.*, 2009). Dessa forma, tal análise é limitada à identificação de novos membros de famílias gênicas conhecidas. Genes alvos são identificados, geralmente, por *primers* desenhados a partir de sequências gênicas conhecidas depositadas em bancos de dados, através de métodos como hibridização e reação em cadeia da polimerase (PCR) (DANIEL, 2005; HANDELSMAN, 2004).

Um dos genes mais utilizados nas análises baseadas em sequências é o gene 16S uma vez que: (i) está presente em todas as bactérias, (ii) apresenta tanto regiões conservadas, como regiões variáveis, o que torna possível o desenho de *primers* e sondas com diferentes níveis de especificidade, (iii) sua sequência tem informação suficiente para inferência filogenética, e (iv) um grande número de sequências já se encontram disponíveis em base de dados de livre acesso (MUYZER *et al.*, 1993). Ainda na seleção por sequência, é possível encontrar novos genes através do sequenciamento aleatório da biblioteca metagenômica e análise das sequências geradas por meio de ferramentas de bioinformática baseadas em busca por homologia (DANIEL, 2005; HANDELSMAN, 2004). Novas enzimas como quitinase, álcool oxirredutases, diol desidratases, e outras que conferem resistência a antibióticos vêm sendo descobertas a partir dessa abordagem (SIMON e DANIEL, 2009). A vantagem dessa estratégia de seleção é a independência da expressão de genes exógenos no hospedeiro utilizado na construção de uma biblioteca metagenômica (LORENZ *et al.*, 2002).

Várias bibliotecas metagenômicas já foram construídas a partir dos mais distintos tipos de amostras, tais como: solo (RONDON *et al.*, 2000), água (ELEND *et al.*, 2006), biofilmes (SCHMEISSER *et al.*, 2003), rumem bovino (FERRER *et al.*, 2005), mucosa bucal humana (DIAZ-TORRES *et al.*, 2003), intestino de cupim (WARNECKE *et al.*, 2007), esponja marinha (ABE *et al.*, 2012), fezes de panda gigante (FANG *et al.*, 2012) e intestino humano (CULLIGAN *et al.*, 2014).

No presente trabalho, os clones analisados foram derivados de diferentes bibliotecas metagenômicas construídas a partir de solos da região do Rio Grande do Norte. As bibliotecas foram anteriormente analisadas no

Laboratório de Biologia Molecular e Genômica (LBMG), através de diferentes ensaios para detecção da produção de biossurfactantes. Este trabalho tem como finalidade confirmar a atividade biossurfactantes dos clones previamente selecionados, após a subclonagem em um sistema de expressão heterólogo.

2- Aplicações dos microrganismos e de seus produtos em biotecnologia ambiental

2.1.- Petróleo

O petróleo é considerado a principal fonte de energia, seus derivados desempenham um importante papel na economia mundial. É composto por uma mistura complexa de hidrocarbonetos, sendo um recurso natural limitado em grandes depósitos na crosta terrestre. Sua exploração, transporte e refino inadequados, podem inserir no ambiente uma grande quantidade de hidrocarbonetos. Os derramamentos acidentais de petróleo causam poluição de águas e solo, o que causa grande preocupação das indústrias mundiais (JOSHI *et al.*, 2014), pois hidrocarbonetos de petróleo são poluentes orgânicos que, devido à baixa solubilidade podem persistir por um longo período no ambiente, além de serem altamente tóxicos.

Acidentes envolvendo petróleo bruto ou seus derivados representam um problema de magnitude crescente em todo o mundo (OKOH e TREJO - HERNANDEZ, 2006; SCHNOOR, 2010) e o problema é agravado devido aos altos custos das metodologias utilizadas na eliminação destes poluentes (DAS e MUKHERJEE 2007; RAHMAN *et al.*, 2003). Uma vez liberado no meio ambiente, os produtos do petróleo estão sujeitos a processos físicos, químicos e biológicos que alteram ainda mais a sua composição, toxicidade, disponibilidade e distribuição dentro do ambiente, sendo necessárias estratégias para sua remoção.

A exploração de petróleo é uma atividade com grande importância econômica, tanto para o Brasil como para o Rio Grande do Norte. Segundo a ANP (Agência Nacional de Petróleo), a produção de petróleo e gás natural no Brasil foi de aproximadamente 2.109 Mbbl/d (mil barris por dia) e 81,6 MMm³/d (milhões de m³ por dia), respectivamente, totalizando em torno de 2.622

Mboe/d (mil barris de óleo equivalente por dia), em dezembro de 2013. O Rio Grande do Norte tem como uma das atividades de maior destaque econômico a extração e processamento do petróleo. No ano de 2011, foi responsável pela produção de 21,4 milhões de barris de petróleo, o que corresponde a 2,8% da produção nacional (ANP).

A exploração de petróleo no estado do Rio Grande do Norte acontece desde 1951 e o primeiro campo descoberto foi o de Ubarana, na costa de Guamaré, que se encontra em operação desde 1976. Desde então as perfurações de poços têm sido intensificadas. O RN já atingiu a marca de segundo maior produtor de petróleo em 1994 e primeiro lugar em produção terrestre (ANP – Agência Nacional de Petróleo).

A produção e consumo de petróleo vem aumentando gradativamente em escala mundial, concomitantemente também aumenta a consciência acerca da poluição e danos que uma contaminação por petróleo pode causar ao ambiente. A busca por processos que auxiliem na limpeza de áreas contaminadas, que não causem danos ao meio ambiente e que sejam de baixo custo, é de extrema importância.

2.2- Biorremediação

A biorremediação pode ser definida como um processo que utiliza microrganismos ou suas enzimas para reverter alterações ambientais causadas, por exemplo, por poluentes, de forma que este retorne a sua condição original. Biorremediação é uma estratégia que vem sendo aplicada em áreas ambientais impactadas, a fim de remover agentes poluentes ou tóxicos de forma natural, e pode ser realizada por plantas ou microrganismos. Podendo ser empregada para atuar em poluentes específicos, como derramamentos de petróleo. Dentre as técnicas que são utilizadas está a adição de biossurfactante no local, facilitando assim sua degradação por bactérias (JUWARKAR *et al.* 2008)

Estratégias de biorremediação incluem: a utilização de microrganismos autóctones, ou seja, do próprio local, sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação (biorremediação intrínseca ou natural); a adição de

agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio e biossurfactantes (bioestimulação); e a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (bioaumento) (BENTO *et al.*, 2003). As plantas também são utilizadas em biorremediação por um processo denominado fitorremediação, que consiste na utilização de sistemas vegetais para remover, capturar ou degradar substâncias tóxicas de ambientes impactados (DINARDI, 2003).

A participação das comunidades microbianas é essencial na eliminação de uma enorme variedade de compostos tóxicos e poluentes em diversos ambientes, pois são capazes de transformar resíduos químicos potencialmente perigosos em formas intermediárias assimiláveis para os seres vivos e para o meio ambiente. A biorremediação é uma técnica viável para limpeza e restauração de locais que foram contaminados superficialmente por produtos derivados de petróleo (GALLEGO *et al.*, 2007).

A bioestimulação é um método promissor capaz de melhorar a eficácia da biorremediação em ambientes contaminados por hidrocarbonetos através da utilização de biossurfactantes. Eles podem favorecer a biorremediação de hidrocarbonetos por dois mecanismos: o primeiro é aumentando a biodisponibilidade do substrato para os microrganismos, enquanto que o segundo mecanismo envolve a interação com a superfície da célula, o que aumenta a hidrofobicidade da superfície, permitindo que substratos hidrofóbicos se associem mais facilmente com células bacterianas (MULLIGAN *et al.* 2004).

2.3- Biodegradação de hidrocarbonetos

A biodegradação de compostos orgânicos poluentes é uma das principais medidas de recuperação de ecossistemas poluídos e requer a interação de muitos grupos de organismos vivos diferentes que trabalham juntos ou sequencialmente na degradação dos compostos (KATAOKA, 2001).

Os hidrocarbonetos são insolúveis, ou seja, possuem pouca ou nenhuma solubilidade em água, e devido a esse fato, o processo de biodegradação pode levar muito tempo para ser concluído (SNAPE *et al.*, 2006). Bactérias que são capazes de degradar hidrocarbonetos liberam

biossurfactantes no meio, o que facilita a assimilação destes hidrocarbonetos insolúveis (BICCA *et al.*, 1999). O processo de biodegradação é maximizado quando o substrato insolúvel em água é dissolvido ou emulsionado, que são os mecanismos pelos quais biossurfactantes são capazes de aumentar a biodisponibilidade de hidrocarbonetos.

O petróleo é uma mistura extremamente complexa e podem ser reconhecidas várias classes contendo centenas de componentes individuais. As quatro classes principais são: (1) saturados - inclui os n-alcanos, alcanos ramificados e cicloalcanos (naftenos); (2) aromáticos; (3) asfaltenos (fenóis, ácidos graxos, cetonas, ésteres e porfirinas) e as (4) resinas (piridinas, quinolina, carbazol, sulfóxido e amidas). Tem sido observado que os componentes saturados do petróleo cru (alcanos), particularmente os alcanos de comprimento intermediário (C10–C20), são biodegradados mais prontamente (MEHDI e GITI, 2008). Uma vez que os hidrocarbonetos diferem em sua susceptibilidade ao ataque microbiano, a seguinte ordem decrescente pode ser sugerida: n-alcanos > alcanos ramificados > aromáticos de baixo peso molecular > alcanos cíclicos, o que influencia consideravelmente nas taxas de biodegradação (SUN *et al.*, 2005).

2.4- Surfactantes e Biossurfactantes

Os surfactantes são moléculas anfipáticas que possuem em sua estrutura uma porção hidrofóbica que se direciona para a superfície e uma porção hidrofílica que se direciona para a solução (MULLIGAN, 2005). Surfactantes sintéticos são sintetizados a partir do petróleo e são classificados em: aniônicos, catiônicos e anfóteros (SWISHER, 1987; ASH e ASH, 1993; SCHMITT, 2001). Dentre os surfactantes sintéticos conhecidos pode-se citar o sódio n-dodecil sulfato (SDS) e o triton x-100. Em uma subclasse dos surfactantes estão os emulsificantes, que estabilizam as dispersões de um líquido com diferentes polaridades, como emulsões água-óleo (RON e ROSENBERG, 2001).

Surfactantes são utilizados no auxílio à limpeza em derramamentos de petróleo, eles permitem a emulsificação dos hidrocarbonetos, facilitando assim, sua subsequente degradação por microrganismos degradadores de petróleo.

Sendo assim, o maior mercado para os surfactantes é a indústria petrolífera, pois são amplamente utilizados na remoção e mobilização de resíduos de óleo e na biorremediação (RON *et al.*, 2002). Porém, devido a sua toxicidade e baixa biodegradabilidade seu uso em ambientes marinhos é limitado.

Os surfactantes podem ser produzidos por microrganismos, nesse caso, são denominados biossurfactantes, que são produtos extracelulares ou partes da membrana das células de bactérias, fungos e leveduras (MULLIGAN, 2005). Os biossurfactantes são compostos anfipáticos que reduzem a energia livre do sistema por meio da substituição da maioria das moléculas de maior energia situadas nas interfaces. Eles contêm partes hidrofóbicas que não interagem com grande parte do meio aquoso e partes hidrofílicas que interagem com a maior parte do meio (PIETRO, *et al.*, 2008).

Estas biomoléculas anfifílicas reduzem a tensão superficial na interface ar/água e a tensão interfacial nas interfaces óleo/água (SATPUTE *et al.*, 2010, BANAT *et al.*, 2010). Os biossurfactantes constituem um grupo de diversas moléculas sintetizadas por vários gêneros microbianos (CAMEOTRA e MAKKAR, 2004; NITSCHKE *et al.*, 2005) e são classificados de acordo com sua composição química e origem microbiana em: (1) glicolipídios, (2) lipopeptídeos e lipoproteínas, (3) surfactantes poliméricos, (4) surfactantes particulados e (5) fosfolipídios e ácidos graxos (PACWA-PLOCINICZAK *et al.*, 2011; CAMEOTRA *et al.*, 2010; AMARAL *et al.*, 2010).

Os biossurfactantes oferecem muitas vantagens em relação aos surfactantes de origem sintética, tais como: aceitabilidade ecológica, pois são potencialmente aplicáveis em proteção ambiental (RAHMAN *et al.*, 2002); baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (COSTA *et al.*, 2006; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; RAHMAN *et al.*, 2002; ZHANG e XIANG, 2010; IBRAHIM *et al.*, 2013); efetividade em ampla faixa de temperatura, pH e salinidade, ou seja, atividade sob condições extremas (BANAT *et al.* 2000; KOSARIC, 2001; MULLIGHAN, 2005); produção a partir de fontes renováveis (NITSCHKE *et al.*, 2005, BENINCASA *et al.*, 2002); e maior eficiência em relação aos surfactantes sintéticos (LIMA, *et al.*, 2011).

A indústria petrolífera é o maior mercado para os biossurfactantes, com aplicações que incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem e a recuperação melhorada de petróleo. Porém, atualmente, as aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais (PIRÔLLO, 2006), como na indústria farmacêutica, de cosméticos, e indústrias de alimentos (RODRIGUES *et al.*, 2006; NITSCHKE e COSTA, 2007; LOURITH e KANLAYAVATTANAKUL, 2009; BANAT *et al.*, 2010; DAS *et al.*, 2010). Eles também podem aumentar a degradação de certos inseticidas químicos que são acumulados no solo agrícola (ZHANG *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2009; SHARMA *et al.*, 2009; WATTANAPHON *et al.*, 2008; WHITE *et al.*, 2006; NEILSON *et al.*, 2003).

Dados da literatura indicam 79 gêneros de bactérias que podem utilizar hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia. Foram também descritos 9 gêneros de cianobactérias e 103 gêneros de fungos com capacidade de degradar ou transformar hidrocarbonetos (HEAD *et al.*, 2006; HASSANSHAHIAN *et al.*, 2012). Existem várias patentes depositadas que descrevem a produção de biossurfactantes por diversos microrganismos como: *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Bacillus spp.*, e *Candida spp.* o que demonstra sua potencial aplicação industrial (SHETE *et al.*, 2006).

Ensaio funcionais realizados anteriormente por Silveira (2010) em nosso laboratório permitiram a seleção de clones metagenômicos com atividade potencial de biossurfactante e o sequenciamento desses clones geraram sequências que apresentaram similaridade com proteínas hipotéticas. Assim, este trabalho teve como objetivos a subclonagem dos insertos em vetor de expressão e a avaliação da atividade biossurfactante destas proteínas visando a posterior caracterização bioquímica.

3-OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Expressão heteróloga de genes com potencial biotecnológico relacionados com a produção de biossurfactantes e/ou degradação de hidrocarbonetos a partir de bibliotecas metagenômicas, obtidas de solo de João Câmara (Caatinga) e das margens de um Rio Jundiáí (Salino).

3.2- Objetivos Específicos

- 1- Analisar as sequências através de ferramentas de bioinformática;
- 2- Clonar as ORFs identificadas, cuja função de atividade biossurfactante já foi identificada, em vetor pETDuet-1;
- 3- Realizar ensaios funcionais para avaliar a atividade biossurfactante;
- 4- Expressar as proteínas de interesse.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de DNA ambientais, obtidas de solo da caatinga de João Câmara/RN e solo junto às margens do Rio Jundiáí/RN (Salino), ambos no RN, foram isoladas e purificadas para construção de bibliotecas metagenômicas. Sendo essas construídas por fragmentação mecânica do DNA ambiental (sonicação), inserção dos fragmentos em vetor pBC e tendo como bactéria hospedeira a *Escherichia coli* (cepa DH10B). Os clones foram submetidos a ensaios funcionais para detectar a existência de genes funcionais com atividade de produção biossurfactantes e/ou degradação de hidrocarbonetos (SILVA, 2009; SILVEIRA, 2010).

Os clones, anteriormente selecionados com atividade para biossurfactante por Silva (2009) e Silveira (2010), foram sequenciados e tiveram suas sequencias analisadas através de ferramentas de bioinformática. Os clones 12A, 12H, 22C e 3C6 que apresentaram ORF's completas e similaridade com proteínas hipotéticas, tiveram *primers* desenhados para

amplificação das ORF's e posterior subclonagem em vetor pETDuet-1™ (MerckMillipore) para expressão e função das proteínas recombinantes.

4.1- Análise de sequência utilizando ferramentas de bioinformática

O clone 3C6 teve sua sequência de nucleotídeos convertida em sequência proteica por meio do programa ORF *Finder* disponível no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), para encontrar a ORF completa, contendo códons de iniciação e de parada. Em seguida foi realizada uma busca no *GenBank* não redundante com auxílio da ferramenta BlastP, utilizando o parâmetro PSI-Blast (*Position-Specific Iterated BLAST*).

As sequências foram alinhadas utilizando o programa MAFFT (KATOH *et al.*, 2009) versão 7.0 usando o parâmetro de alinhamento L-INS-i. Para a análise filogenética foi realizado um teste do modelo de substituição com auxílio do programa MEGA-5 versão 5.2 (TAMURA *et al.*, 2011). O passo seguinte foi realizar a reconstrução filogenética empregando o método *Neighbor-joining* e o teste *Bootstrap* com medida de suporte com adição de 500 repetições, para verificar a consistência e confiança nas topologias, e o modelo de *Jones-Taylor-Thornton* (JTT) mais distribuição *gamma* 0,78.

Foi também realizada uma pesquisa por proteínas homólogas através de dois diferentes servidores *online*: o *PHYRE 2* e o *HHPred*. Ambos realizam buscas por proteínas homólogas com estruturas preditas através de algoritmos baseados em alinhamentos HMM-HMM (Modelos ocultos de Markov). Ocorre busca da sequência versus estruturas molde compatível para predição de um modelo (SODING, 2005; KELLEY e STERNBERG, 2011).

4.2- Desenho de primers

Para isolar as ORF's através de amplificação, foram desenhados *primers* específicos. O *primer forward* contendo o códon de iniciação e o *primer reverse* contendo o códon de terminação, além dos sítios de restrição para as enzimas (Tabela 1). As enzimas foram escolhidas de acordo com o vetor de expressão utilizado, nesse caso, o pETDuet-1, de forma que após a subclonagem, o vetor

permita a expressão da proteína fusionada com uma cauda de histidina na sua extremidade carbóxi-terminal para facilitar posterior purificação.

Tabela 1- Sequências dos *primers*. Sítios de restrição em negrito. Códon de iniciação (FW) e terminação (RV) sublinhados.

Clones	Sequências <i>primers</i> (Forward e Reverse)
12 A	FW5' - CGTCTCC <u>AT</u> GCGTATCTGTCCGCACATT- 3' RV3' - CTCGAGT <u>CA</u> TGATGATGATGGTGTGTAGTTGTGCGGCCCGAACGTCC- 5'
22 C	FW5' - CGTCTCC <u>AT</u> GGGGCCTCCTGCGACGCGG- 3' RV3' - GTCGACT <u>CA</u> TGGTGTGGTGTGATGCCCTGCCGCGCAGGGTGACGATG- 5'
12 H	FW5' - CGTCTCC <u>AT</u> GCGACATCACACATTCCATCAGC- 3' RV3' - CTCGAGT <u>CA</u> TGGTGTGGTGTGATGCAAGCCTATTGGTGCTTGGGCATCC- 5'
3C6	FW5' - GGTCTCC <u>CA</u> TGAGTGATCAATATCTAGATT- 3' RV3' - AAGCTT <u>TA</u> TGATGATGGTGTGATGATGAGTCGAGTCCTGACCCGCTTTGCT- 5'

4.3- Amplificação das ORF's, purificação e clonagem

Os clones das bibliotecas obtidos anteriormente foram construídos em vetor pBC SK (Stratagene) tendo a *Escherichia coli* (cepa DH10B) como bactéria hospedeira. Para isolamento dos insertos (clones 12A, 12H, 22C e 3C6) do vetor *pBC SK* (Stratagene), foi realizada a amplificação das ORF's através de PCR.

A PCR foi realizada com todos os clones utilizando os *primers* específicos, visando amplificação da ORF de interesse e posterior clonagem no vetor pCR®-Blunt (Invitrogen). As reações de PCR foram realizadas em volume final de 20 µl contendo 0,2 µM de cada *primer*, 50 ng de DNA, 1,5 mM de dNTPs, 2 U de *Phusion HF DNA polimerase*, 1 X *buffer HF Phusion* (NEB) e água ultrapura autoclavada para completar o volume. O DNA genômico foi inicialmente desnaturado a 98 °C por 2 min e a amplificação por 35 ciclos constituído dos seguintes passos: (1) desnaturação a 98 °C por 10 segundos, (2) anelamento a 63,4 °C por 30 seg, (3) extensão a 72 °C por 30 seg. A extensão final foi realizada 72 °C por 5 min.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, 40 mA. Como padrão de peso molecular foi usado o 1 Kb DNA ladder (Promega).

Em seguida foi realizada a purificação dos fragmentos obtidos na PCR através do *GeneJET™ Gel Extraction Kit* (Fermentas), de acordo com a metodologia sugerida pelo fabricante. A quantificação dos produtos da purificação foi realizada no espectrofotômetro tipo *nanovue* (GE Healthcare).

Os fragmentos de interesse gerados na PCR, foram clonados no vetor pCR®-Blunt (Invitrogen), seguindo-se a metodologia sugerida pelo fabricante.

4.4- Preparação de células competentes

Células competentes para transformação por choque térmico foram preparadas conforme descrito em Sambrook (2001). A cepa de *Escherichia coli* DH5 α isolada foi inoculada em 3 mL de meio SOB e crescida sob agitação a 37 °C por 16-18 h. A cultura foi transferida para um *erlenmeyer* de 1L contendo 100 mL de meio LB (Luria-Bertani), e incubado a 37 °C até atingir a densidade óptica (OD₆₀₀) entre 0,4-0,5 (fase exponencial de crescimento). A cultura foi então transferida para 2 tubos cônicos de 50 mL previamente resfriados (as células foram mantidas no gelo em todas as etapas) e incubados por 30 min em gelo. Após, os tubos foram centrifugados por 10 min, a 4000 rpm a 4 °C, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuscitado em 30 mL de cloreto de cálcio 100 mM estéril e gelado por agitação suave e mantido por mais 30 min em gelo. Uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições descritas anteriormente, o precipitado foi ressuscitado em 2 mL de cloreto de cálcio 100 mM estéril gelado através de agitação suave e incubado novamente por 30 min em gelo. As células foram mantidas durante 16-18 h a 4 °C. No final, adicionou-se 850 μ L de glicerol 50% e fizeram-se alíquotas de 50 μ L que foram armazenados a -80 °C.

4.5- Transformação bacteriana por choque térmico

Para a transformação bacteriana por choque térmico, foram adicionado 5 μ L do produto de cada reação de clonagem em pCR®-Blunt (Invitrogen) a 50 μ L de células competentes. As reações foram incubadas em gelo durante 15

min, em seguida colocadas em banho-maria a 42 °C por 1 min. Adicionou-se 500 µL de meio SOC às reações e estas foram incubadas a 37 °C durante 1 h sob agitação de 180 rpm. As células foram depois plaqueadas (250 µL) em meio LB ágar contendo antibiótico canamicina (50 mg/mL) e incubadas em estufa a 37 °C por 16 - 18 h.

4.6- Digestão para confirmação da presença do inserto

O DNA plasmidial dos clones 22C, 12H, 12A e 3C6 foi submetido a dupla digestão para confirmação da presença do inserto. A digestão foi realizada em volume final de 20 µl contendo 0,1 µg de DNA, 20U de cada enzima específicas para cada clone (Tabela 2), BSA 1 X, tampão 1 X NEB3 e (NEB2 para 3C6) e água ultrapura autoclavada para completar o volume. As reações foram incubadas a 37 °C por 2 h com a enzima 1, decorrido o tempo, adicionou-se a reação a enzima 2 e as condições descritas anteriormente foram repetidas.

Tabela 2- Clones e enzimas de restrição específicas usadas nas respectivas digestões.

Clones	Enzima 1	Enzima 2
12 A	<i>BsmBI</i> (Biolabs)	<i>XhoI</i> (Biolabs)
22 C	<i>BsmBI</i> (Biolabs)	<i>Sall</i> (Biolabs)
12 H	<i>BsmBI</i> (Biolabs)	<i>XhoI</i> (Biolabs)
3C6	<i>BsaI</i> (Biolabs)	<i>HindIII</i> (Biolabs)

O vetor pETduet-1™ (MerckMillipore) também foi digerido para gerar extremidades adequadas a ligação ao inserto, a reação foi realizada em volume final de 100 µL contendo 12 µg do vetor, 20 U da enzima *EcoRV* (Biolabs), BSA 1 X, tampão NEB3 (Biolabs) e água ultrapura autoclavada para completar o volume. A reação foi incubada a 37 °C por 2 h.

Os produtos da digestão foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose 1%, 40 V, 40 mA e posteriormente purificados com o *GeneJET™ Gel Extraction Kit* (Fermentas), conforme as instruções do fabricante.

4.7- Tratamento das extremidades

Foi necessário gerar extremidades cegas, tanto no vetor como no inserto, e fosforilar a extremidade 5' dos fragmentos. Na reação de polimerização foi utilizado: 1,5 µg de DNA e vetor, 1 X tampão NEB2 (Biolabs), 0,5 mM de dNTPs, 2 U de enzima T4 DNA Polimerase (Biolabs) e água ultrapura autoclavada para o volume final de 40 µL. A reação foi mantida a 12 °C por 30 min e logo após a 75 °C por 20 min, para inativação da enzima. Para a reação de fosforilação, foi adicionado ao mesmo tubo da reação anterior: 1 X tampão da *quinase* (Biolabs), 2 mM de ATP, 10 U de T4 *Polinucleotide quinase* (Biolabs) e água ultrapura autoclavada para o volume final de 80 µL. A reação foi incubada por 10 min a 37 °C e, para inativação da enzima, a reação foi mantida a 65 °C por 10 min.

4.8- Ligação ao vetor de expressão

A ligação do inserto ao vetor de expressão se deu na proporção 3:1 (inserto: vetor). Assim, para a reação foi utilizado 0,02 µg do vetor pETDuet-1 (fig 1), 0,07 µg de DNA (inserto), 4 U de T4 DNA Ligase (Biolabs), tampão 1X da Ligase (Biolabs) e água ultrapura autoclavada para o volume final de 10 µL. A reação foi mantida a 16 °C por 16-18 h.

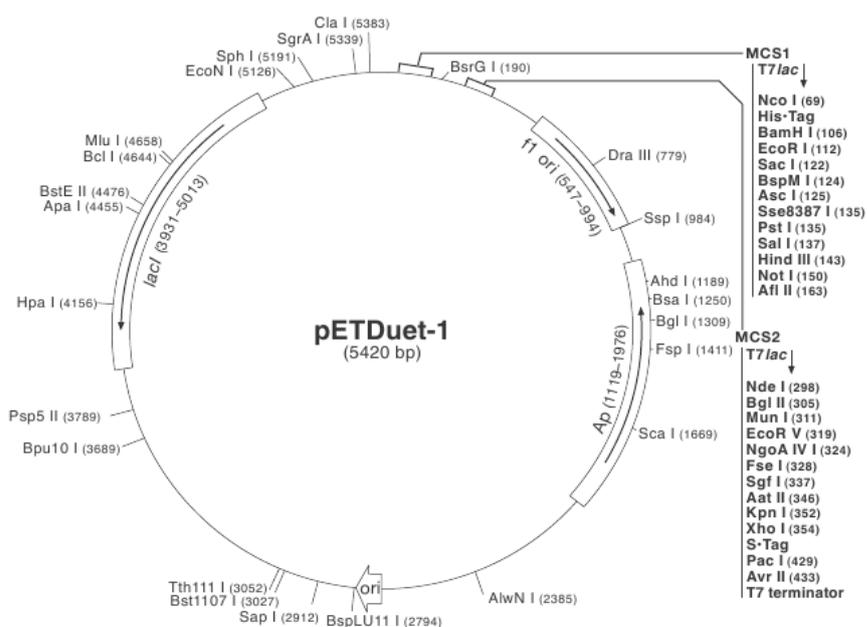


Figura 1. Mapa físico do vetor de expressão pETDuet-1.

4.9- Transformação em cepa *Rosetta*TM (DE3)

A ligação do inserto ao vetor (3C6-pETDuet) obtida foi transformada por choque térmico na cepa de *E. coli* denominada *Rosetta*TM(DE3), utilizada como o sistema de expressão heterólogo. O preparo das células competentes e a transformação foram realizados conforme já descrito nos itens 4.4 e 4.5, respectivamente.

4.10– Confirmação da transformação

Oito colônias resultantes da transformação foram selecionadas aleatoriamente para confirmação da presença do inserto. Primeiramente o DNA plasmidial foi extraído utilizando o *GeneJET Plasmid Miniprep Kit*, seguindo instruções do fabricante. Foi aplicado ao gel de agarose 0,7% para confirmar a extração e seus relativos tamanhos. Com os produtos da extração foi feita uma PCR com os *primers* específicos, para também confirmar a eficiência da clonagem com a amplificação da região de interesse.

4.11– Indução da expressão

O clone 3C6/pETDuet-1 foi inoculado em 5 mL de meio LB líquido contendo os antibióticos: ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL), permanecendo sob agitação (180 rpm), a 37 °C por 16-18 h. O pré-inóculo (0,5 - 1 mL) foi usado para inocular 30 mL de LB+antibióticos que ficou sob agitação (180 rpm, 37 °C), até atingir a fase exponencial de crescimento OD₆₀₀, correspondendo a 0,45-0,60. Uma alíquota da cultura não induzida foi retirada e centrifugada por 10 min a 12.000 rpm (controle negativo). A expressão da proteína foi induzida por adição de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactospiranosídeo) na concentração final de 1 mM, sob agitação 180 rpm a 37 °C por 16 h. Em seguida, a cultura foi centrifugada durante 10 min a 8.500 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular armazenado a -20 °C.

4.12- Análise das proteínas utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As proteínas expressas em *E. coli* foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 12% (*SDS-PAGE*) (LAEMMLI, 1970). As amostras proteicas referentes a indução da expressão foram solubilizadas em 20 µL de tampão laemmli, aquecidas a 95 °C durante 5 min e aplicadas no gel de poliacrilamida a 12% contendo SDS. A eletroforese foi realizada a 200 mV e 70 mA por 40 min, utilizando o *Mini-Proteome SDS-PAGE* (Bio-rad). Após a corrida, o gel foi corado em solução azul de *Coomassie* R-250 e descorado em solução contendo 40% de metanol e 10% de ácido acético glacial em água destilada.

4.13- Imunodeteção (*Western Blot*)

As proteínas separadas na eletroforese foram transferidas para uma membrana de PVDF, utilizando-se o equipamento *Mini Trans-Blot® Cell* (Bio-Rad). A membrana estava equilibrada em tampão de transferência 1 X (20% de metanol, 10% de tampão tris/gli 10 X, 70% de água), e a transferência ocorreu a 90 V por 120 min. A membrana foi bloqueada em solução bloqueadora (5% de leite desnatado em solução salina de TBS contendo 0,1% de Tween – TBST) e posteriormente incubada, sob agitação, com o anticorpo monoclonal *Anti-His®* (1:3000, Invitrogen) por 16-18 h. Em seguida, três lavagens de 10 min foram realizadas e um anticorpo secundário monoclonal específico para cadeia pesada do IgG de camundongo, ligado a uma peroxidase foi utilizado (1:5000, Southern Biotech), para detecção da proteína específica. Para revelação dos filmes contendo a marcação das proteínas, as membranas foram submetidas a uma reação de quimioluminescência dependente da ativação da peroxidase presente no anticorpo secundário. A revelação foi feita utilizando o *AP conjugate substrate Kit* (Bio-Rad), seguindo as instruções do fabricante.

4.14- Ensaios para confirmação da atividade de biossurfactante e degradação de hidrocarbonetos

Para confirmar se os clones transformados possuíam atividade de biossurfactante e biodegradação de hidrocarbonetos, foram realizados ensaios após indução da expressão. Existem diversos fatores que podem afetar a produção de um biossurfactante, destacando-se: temperatura, pH, componentes do meio de cultivo, fonte de carbono, estresse bacteriano,

aeração, entre outros. Sendo assim, as condições de cultivo foram otimizadas para verificar aquela em que o clone apresentaria melhor índice de emulsificação. As condições testadas foram: temperaturas (16 °C e 37 °C), meios de cultura (LB e YPG - *yeast peptone glucose*), volumes (50 mL, 60 mL e 70 mL), tempos de indução (4 h, 16 h, 18 h e 24 h), indução com IPTG em duas determinadas OD₆₀₀ (0,04 e 0,4).

A metodologia seguiu idêntica para todas as condições citadas. Para isso, uma colônia isolada do clone 3C6 e do vetor vazio pETDuet-1 foram crescidas, a 37 °C por 16-18 h sob agitação de 180 rpm, em 10 mL meio (LB ou YPG) contendo os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL). Depois de 16 – 18 h de crescimento, 1 mL de cada cultura foi transferido para *erlenmeyers* com diferentes volumes (50 mL, 60 mL e 70 mL) de meio de cultura e antibióticos e incubados a 180 rpm a temperatura (16 °C e 37 °C) até atingir as OD₆₀₀ (0,04 e 0,4), com OD₆₀₀= 0,4 correspondente a fase exponencial de crescimento. Em seguida foi adicionado 1 mM de IPTG e após 4 h, 16 h, 18 h e 24 h de indução foram retiradas alíquotas para o ensaio de emulsificação.

A condição na qual o clone apresentou melhor índice de emulsificação foi selecionada para realização dos demais testes de atividade emulsificante e de degradação de hidrocarbonetos.

4.14.1- Ensaio de emulsificação

Ensaio baseado na capacidade de emulsificação dos biossurfactantes, sendo desenvolvido por Cooper e Goldenberg (1987). É utilizado para expressar a capacidade do biossurfactante produzido em emulsificar hidrocarbonetos a partir do cálculo do índice de emulsificação, sendo esse calculado após 24 h da realização do ensaio (E24%). O índice de emulsificação é calculado como a razão entre a altura da camada de emulsão e a altura total do sistema multiplicado por 100, como mostrado na equação:

$$E24\% = \frac{\text{altura da camada emulsificada}}{\text{altura total do sistema}} \times 100$$

O ensaio foi realizado de acordo com Iqbal *et al.* (1995), com algumas modificações. Em um tubo teste foram adicionados 2 mL de querosene, 2 mL da cultura ou sobrenadante (obtido após centrifugação de 2 mL da cultura, a 13.000 rpm, por 10 min a temperatura ambiente) e 200 µL do corante azul de metileno (0,05%), para melhor visualização das fases. Os ensaios foram realizados em triplicatas e o SDS 1% foi utilizado como controle positivo. Os tubos foram agitados em vórtex por 2 min e após 24 h, o índice de emulsificação foi calculado.

4.14.2- Determinação da atividade emulsificante

Para a determinação da atividade de emulsificação, foi seguido o ensaio proposto por Cirigliano e Carman (1984). Para tanto, foram adicionados em tubos testes: 2 mL da cultura ou sobrenadante (obtido pela centrifugação a 10.000 rpm, por 15 min a 5 °C) do clone 3C6 e do vetor vazio pETDuet-1, 2 mL de acetato de sódio (0,1M e pH 3) e 1 mL de querosene. Os tubos foram agitados por 2 min em vórtex e após 10 min, coletou-se apenas a emulsão, para realizar a leitura da absorbância em leitor de microplaca (BIOTEK) usando um comprimento de onda de 540 nm. O valor de absorbância é apresentado em UAE (Unidade de Atividade de Emulsificação). O ensaio foi realizado em duplicatas, o SDS 1% foi utilizado como controle positivo e o meio LB como controle negativo.

4.14.3- Ensaio de degradação de hidrocarbonetos

O ensaio de degradação de hidrocarbonetos foi realizado em placa de poliestireno com 24 poços contendo 1,8 mL de LB + antibióticos, 100 µL da cultura ou sobrenadante respectivo e 20 µL de petróleo bruto (SILVA, 2009). A placa contendo triplicatas, tanto do clone como do vetor vazio, foi mantida na estufa a 30 °C durante 15 dias e fotografada ao longo do tempo.

4.15- Análise estatística

Os dados foram analisados usando o programa *Prism 5.0* (GraphPad, San Diego, CA, USA). Para os ensaios de emulsificação e de atividade de

emulsificante, diferenças entre dois grupos foram analisados com o *unpaired t test* quando a distribuição era normal. Os dados estão expressos como média e erro padrão. Para todos os testes estatísticos, valores obtidos com o $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5-RESULTADOS

5.1- Análise de sequência usando ferramentas de bioinformática

A pesquisa de sequências no *GenBank* resultou na seleção de 14 sequências de proteínas hipotéticas representantes da família *Halobacteriaceae* com uma média de 290 a 320 aminoácidos, como pode ser visualizado na fig 2. A melhor similaridade encontrada foi com uma proteína hipotética de *Haloferax lucentense*, com identidade de 93%, *e-value* igual a 0.0 e similaridade de 96%.

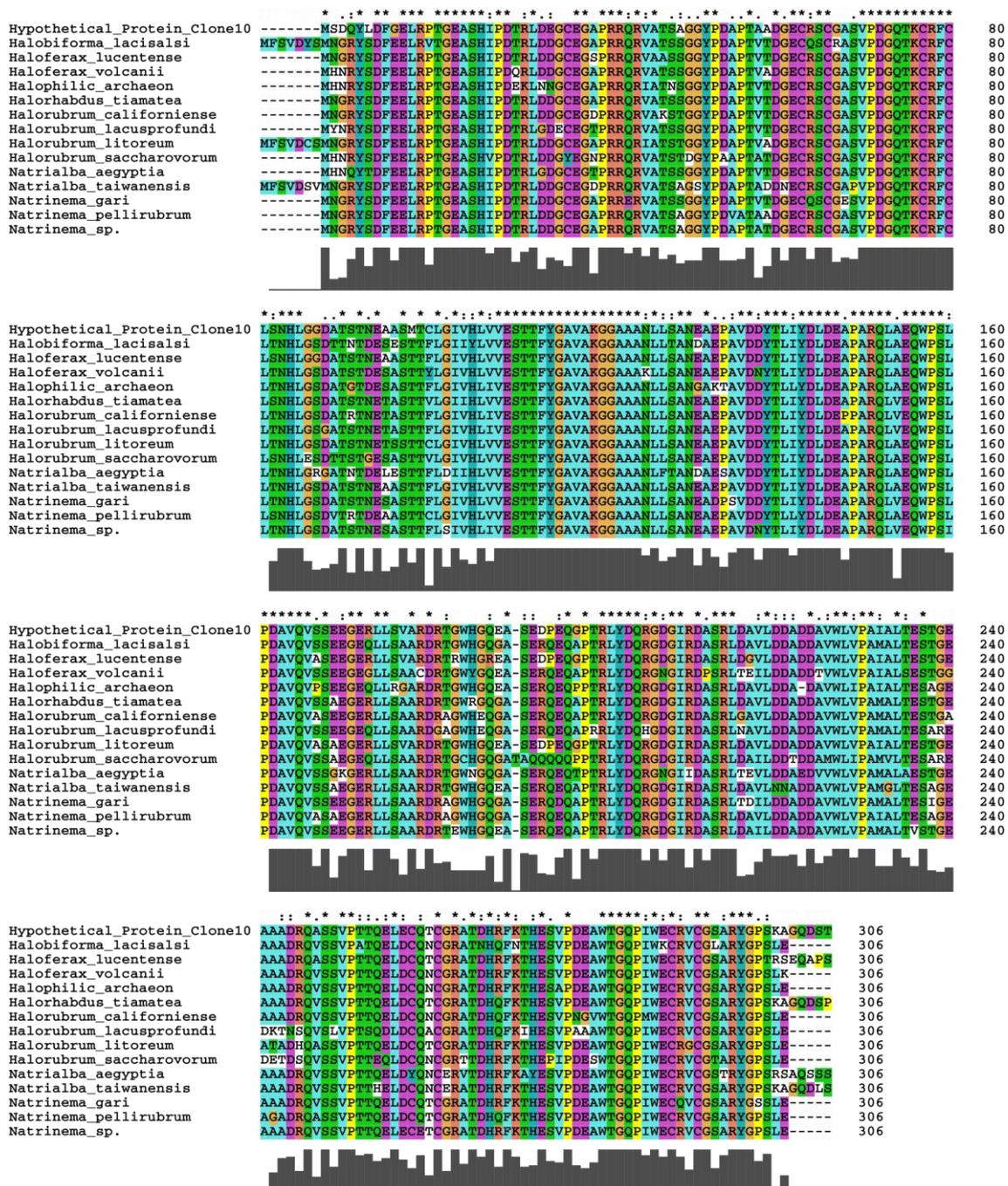


Figura 2. Alinhamento utilizando as sequências mais intimamente relacionadas à sequência da proteína hipotética do clone 3C6. Todas as proteínas hipotéticas são de representantes da família *Halobacteriaceae*.

A árvore obtida foi visualizada e editada no MEGA-5. Como mostrado na fig 3, a proteína está incluída em um ramo, juntamente com as proteínas de arqueias halofílicas *Haloferax lucentense* e *Halorubrum litoreum*, com elevado *bootstrap*, sendo esse parâmetro um indicativo da confiabilidade do resultado.

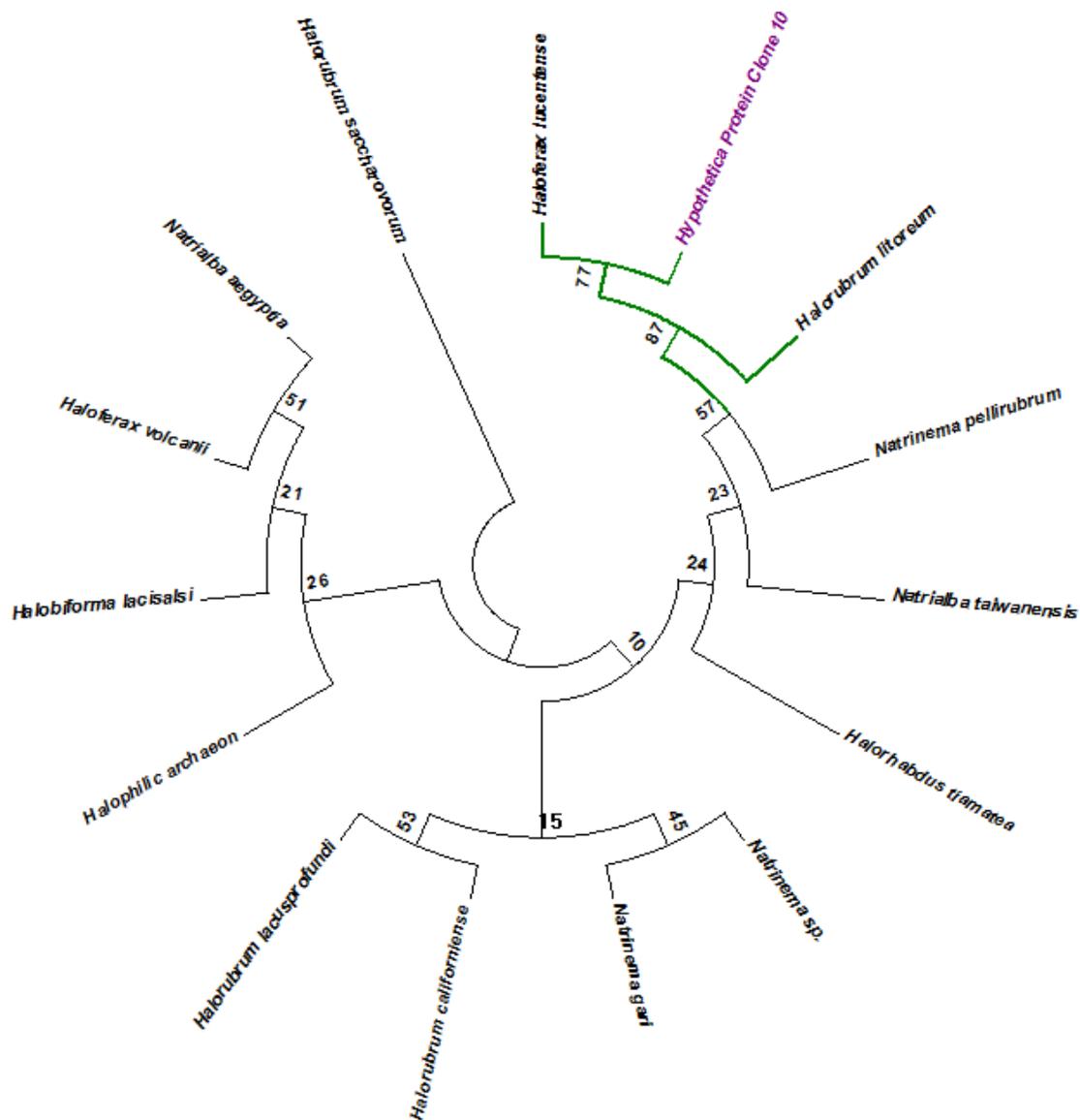


Figura 3. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento destacando a proteína hipotética e a maior similaridade com proteínas de três espécies pertencentes à mesma família.

A sequência foi analisada nos servidores *online* *HHpred* e *PHYRE 2* e sua estrutura foi predita. No *HHpred* (fig 4) os melhores *hits* foram semelhantes estruturalmente a proteínas hipotéticas e rubredoxina, respectivamente, apresentando a segunda uma probabilidade de alinhamento de 74% e e-value de 1,4. O *PHYRE 2* (fig 5) também apresentou homologia estrutural a proteína rubredoxina.

No Hit		Prob	E-value	P-value	Score	SS Cols	Query HMM	Template HMM
<input type="checkbox"/>	1 2m6o_A Uncharacterized protein	80.1	0.88	2.7E-05	32.7	1.9	32 247-286	4-35 (48)
<input type="checkbox"/>	2 3j21_j 50S ribosomal protein L	74.7	2.1	6.6E-05	34.4	2.9	43 242-284	3-75 (94)
<input type="checkbox"/>	3 4rxn_A Rubredoxin; electron tr	74.5	1.4	4.3E-05	32.0	1.6	31 246-287	2-46 (54)
<input type="checkbox"/>	4 1yk4_A Rubredoxin, RD; electro	74.0	1.5	4.5E-05	31.8	1.6	30 247-287	2-45 (52)
<input type="checkbox"/>	5 6rxn_A Rubredoxin; electron tr	72.9	1.6	4.9E-05	30.9	1.6	31 246-287	3-40 (46)

Figura 4. Análise da sequência obtida pelo servidor *online HHPred*. Em destaque a similaridade obtida com a rubredoxina.

#	Template	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% I.d.	Template Information
3	diffkw			63.4	30	Fold: Rubredoxin-like Superfamily: Zn-binding ribosomal proteins Family: Ribosomal protein L37ae

Figura 5. Análise da similaridade estrutural prevista para a proteína recombinante usando o servidor *online PHYRE 2*. Similaridade estrutural a rubredoxina.

5.2 – Subclonagem em vetor de expressão

Os clones 12A, 12H, 22C e 3C6 foram escolhidos para subclonagem em vetor de expressão pETDuet-1, pois apresentaram melhor resultado nos testes funcionais realizados anteriormente por Silveira (2010). Todos os clones exibiram similaridade com proteínas hipotéticas, quando comparados ao banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), o que pode indicar que se trata de novas proteínas. No entanto, até o momento, o clone 3C6 foi o que apresentou resultado positivo para todas as metodologias desenvolvidas. Os outros clones se encontram no vetor pCR®-Blunt, e os experimentos estão em andamento.

O inserto do clone 3C6 pode ser observado na fig 6. Após a digestão para retirada do vetor pCR®-Blunt e purificação a partir do gel de agarose, apresentou o tamanho esperado de 827 pb, comparado ao marcador 1 Kb DNA *ladder* (Fermentas).

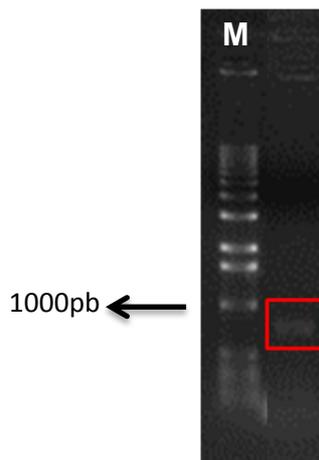


Figura 6. Inseto purificado a partir do gel de agarose após digestão para retirada do vetor pCR®-Blunt. O inseto destacado está de acordo com o tamanho esperado de 827 pb. M. Marcador molecular 1kb *ladder* (Fermentas).

A confirmação da ligação do vetor de expressão pETDuet-1 ao inseto, depois da transformação bacteriana em cepa *Rosetta*, pode ser confirmada pela PCR de colônia (fig 7). Na PCR foram utilizados os *primers* específicos para amplificação do inseto.

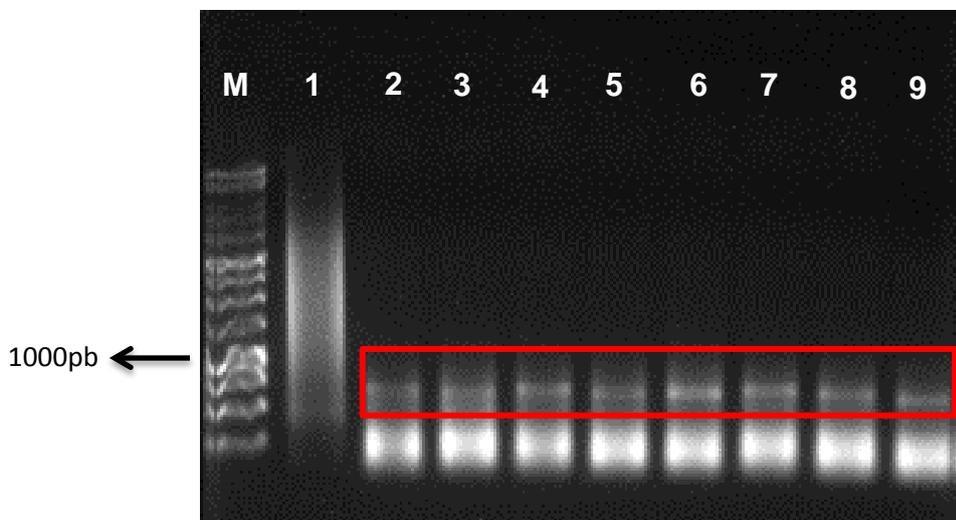


Figura 7. Eletroforese dos produtos da PCR utilizando *primers* específicos para amplificação do inseto. M. Marcador molecular 1 Kb *ladder* (Fermentas). 1. Controle negativo (água). 2 a 9. Produtos de PCR do clone 3C6 escolhidos aleatoriamente.

5.3- Indução da expressão e imunodetecção

A indução das células *Rosetta* contendo o plasmídio de interesse resultou na produção da proteína hipotética. A possível proteína foi ligada a

cauda de seis histidinas em sua porção N-terminal para permitir a detecção por *imunoblotting* e a posterior purificação por cromatografia de afinidade. O perfil de expressão pôde ser visualizado através do *western blot* utilizando o anticorpo primário específico para cauda de histidina. A indução se deu por até 24 h, retirando amostras em diferentes tempos (4 h, 18 h, 20 h e 24 h), como pode ser observado na fig 8. O produto proteico corresponde ao extrato total e o peso molecular aproximado da proteína é de 34 kDa.

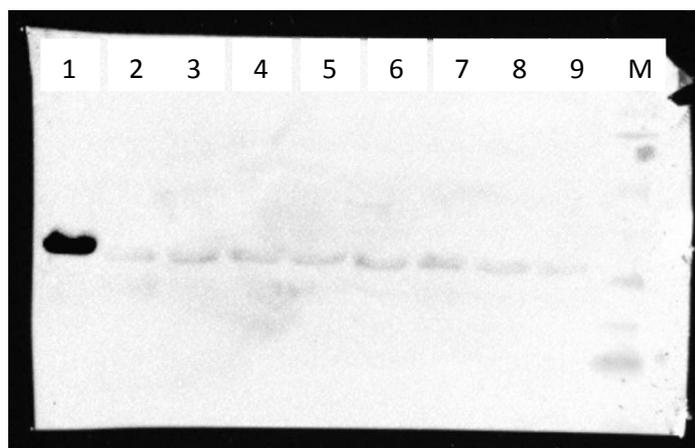


Figura 8. Imunodeteção mostrando o produto proteico com diferentes tempos de indução. M. Marcador de peso molecular *Broad Range* de 202 kD (Bio-rad). 1. Proteína com peso molecular conhecido de 37 kDa e com his-tag, utilizada como controle. 2 e 3. Indução por 24 h. 4 e 5. Indução por 20 h. 6 e 7. Indução por 18 h. 8 e 9. Indução por 4 h.

5.4- Otimização do cultivo para produção de emulsão

Uma das principais características de um bom biossurfactante é a capacidade de emulsionar líquidos não miscíveis. A condição ideal para melhor produção de emulsão foi determinada após realização do ensaio de emulsificação com todas as condições estabelecidas. Para cada condição, a cepa transformada com o vetor vazio foi utilizada como controle negativo. A tabela 3 mostra as condições que apresentaram algum indício da produção de emulsão, com o resultado da média de E24%. A condição 1 se refere a adição de 1 mM de IPTG quando a cultura atingiu $DO_{600} = 0,04$, e a condição 2 é referente a adição de 1 mM de IPTG quando a cultura atingiu uma $DO_{600} = 0,4$. As duas condições ocorreram a 37 °C, utilizando o meio LB em um volume de 50 mL. E como pode ser observado, o maior E24% do clone foi obtido após

indução de 24 h. O ensaio foi realizada em triplicata e o resultado apresentado é uma média dos valores.

O querosene não emulsionado e emulsionado pelo clone 3C6 em algumas das condições descritas, pode ser observado na fig 9. O clone não produziu emulsão a 16 °C e no meio YPG, assim como a cepa transformada com vetor vazio. Para as condições em que o clone não apresentou emulsão, o resultado se manteve semelhante.

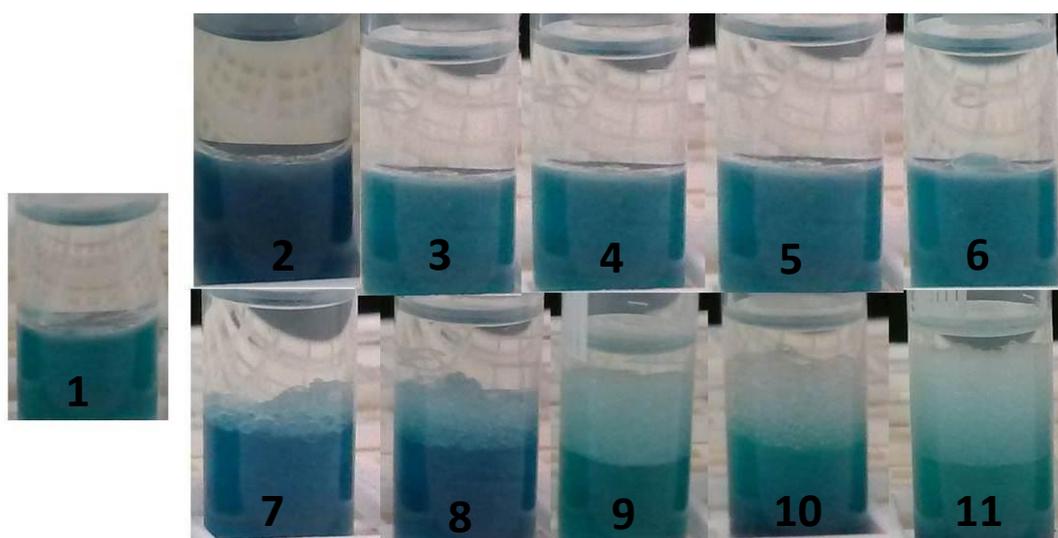


Figura 9. Produção da emulsão em diferentes condições. 1. Controle, vetor vazio. 2. Cultura crescida a 16 °C por 24 h. 3. Sobrenadante livre de células crescido a 37 °C por 4 h. 4. Cultura crescida a 16 °C por 18 h. 5. Cultura crescida a 37 °C por 18 h. 6. Sobrenadante livre de células crescido 24 h. 7. Condição 1, cultura, 18 h. 8. Condição 2, sobrenadante, 18 h. 9 a 11. Condição 2, cultura, nos tempos 4 h, 18 h e 24 h, respectivamente.

Tabela 3- Média do índice de emulsificação E24% obtido em diferentes condições de cultivo pelo clone 3C6 e controle (sem inserto).

Tempo de indução com IPTG (horas)	Condição 1				Condição 2			
	Cultura		Sobrenadante		Cultura		Sobrenadante	
	Controle	Clone	Controle	Clone	Controle	Clone	Controle	Clone
18	0	31,06	0	36,6	0	35,5	0	15,5
24	0	41,1	0	29,9	32,2	51,1	0	47,7

5.5 -Ensaio de emulsificação

O ensaio foi realizado com diferentes tempos de indução, temperaturas e aeração. A melhor emulsificação foi obtida após 24 h de indução utilizando IPTG, para cultura e o sobrenadante, como pode ser observado na fig 10. As medições foram realizadas 24 h após a realização do ensaio e se mantiveram constantes por meses, com pouca alteração, fig 12. As células transformadas com o vetor vazio pETDuet-1 formaram emulsão, porém o índice de emulsificação apresentado pelo clone contendo o inserto foi superior e comparável ao obtido pelo controle positivo SDS 1% (fig 10), pode ser comprovado pelo resultado do cálculo do índice de emulsificação (E24%), representado na fig 11.

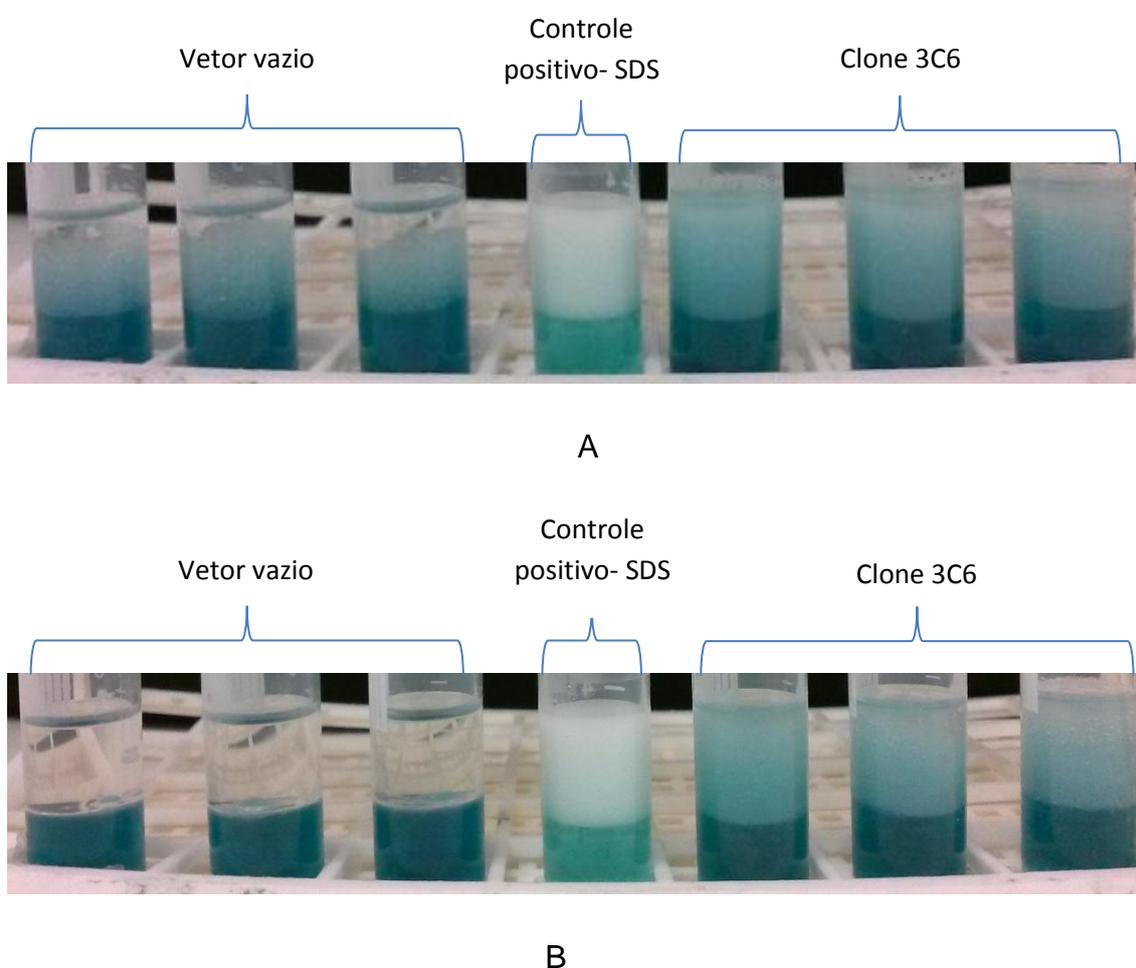


Figura 10. Ensaio de emulsificação. A) Cultura. Células transformadas com o vetor vazio (esquerda), SDS 1% (centro) e clone 3C6 (direita). B) Sobrenadante livre de células. Vetor vazio (esquerda), SDS 1% (centro) e clone 3C6 (direita).

A análise estatística mostrou que os valores do índice de emulsificação do clone 3C6 foram significativos com $p < 0,0001$, como pode ser mostrado na fig 11.

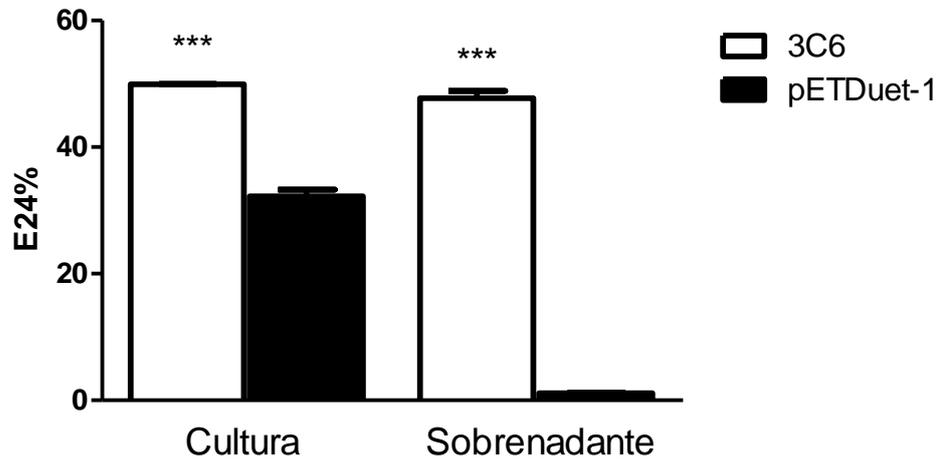
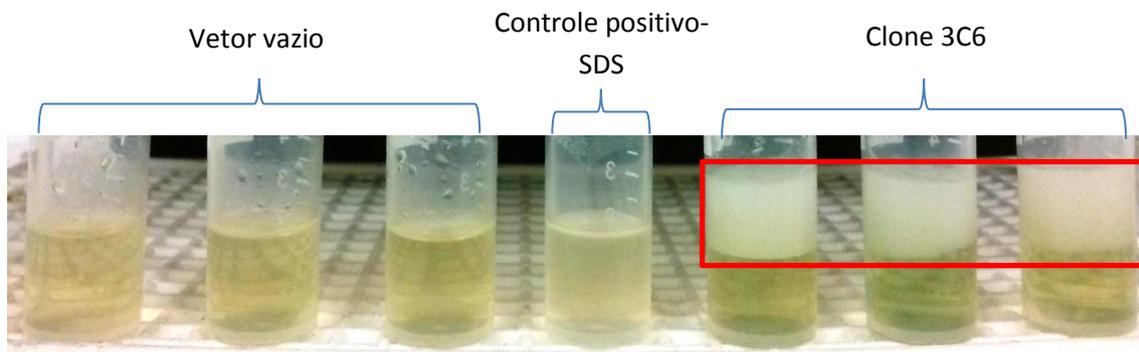
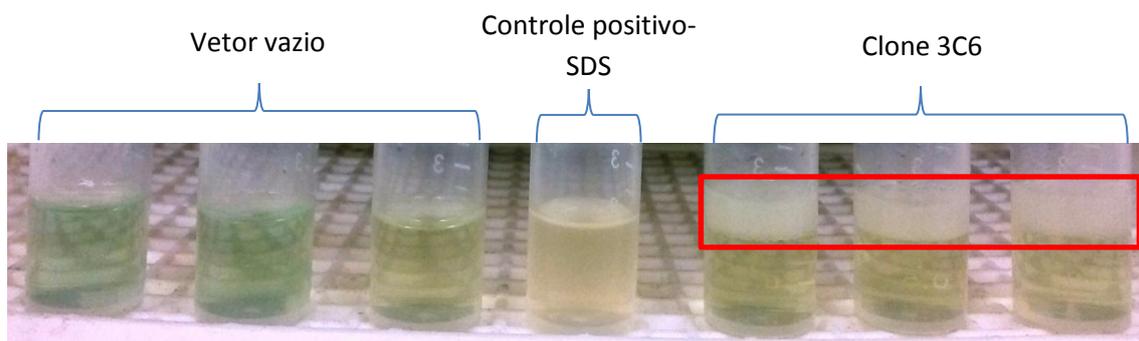


Figura 11. Índice de emulsificação. Comparação entre a cultura e o sobrenadante do clone 3C6 contra o vetor vazio pETDuet-1. *** $p < 0,0001$.

Após 6 meses da realização do ensaio, o clone manteve estável a emulsão produzida, enquanto que o controle positivo e o vetor vazio não mantiveram a emulsão estável, como pode ser observado na fig 12.



A



B

Figura 12. Ensaio de emulsificação, 6 meses após sua realização. A) Cultura. Células transformadas com o vetor vazio (esquerda), SDS 1% (centro) e clone 3C6 (direita). B) Sobrenadante livre de células. Vetor vazio (esquerda), SDS 1% (centro) e clone 3C6 (direita).

5.6- Atividade de emulsificação

O ensaio mostrou que quanto maior a densidade óptica, maior é a atividade de emulsificação, como pode ser observado na fig 13. O controle positivo SDS 1% possui atividade emulsificante e alcançou um valor igual 2,61 de absorbância. O meio LB puro utilizado como controle negativo, apresentou pouca ou nenhuma atividade. O clone 3C6 mostrou atividade de emulsificação próxima a do controle positivo (SDS 1%), tanto na cultura como no sobrenadante, sendo estes estatisticamente significativos em relação ao controle negativo. O vetor vazio pETDuet-1 apresentou valores inferiores, tanto para a cultura quanto para o sobrenadante, como pode ser mostrado na fig 13.

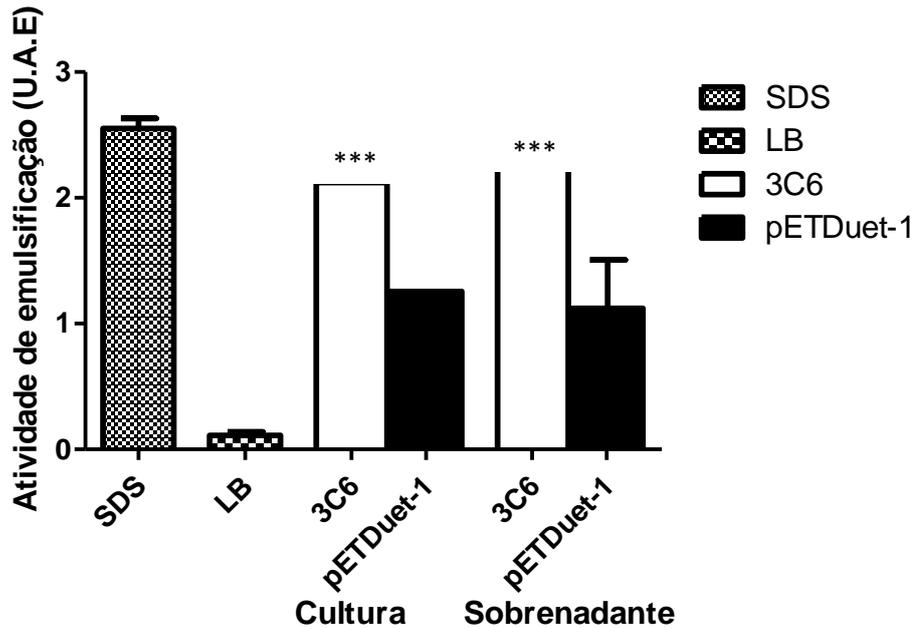
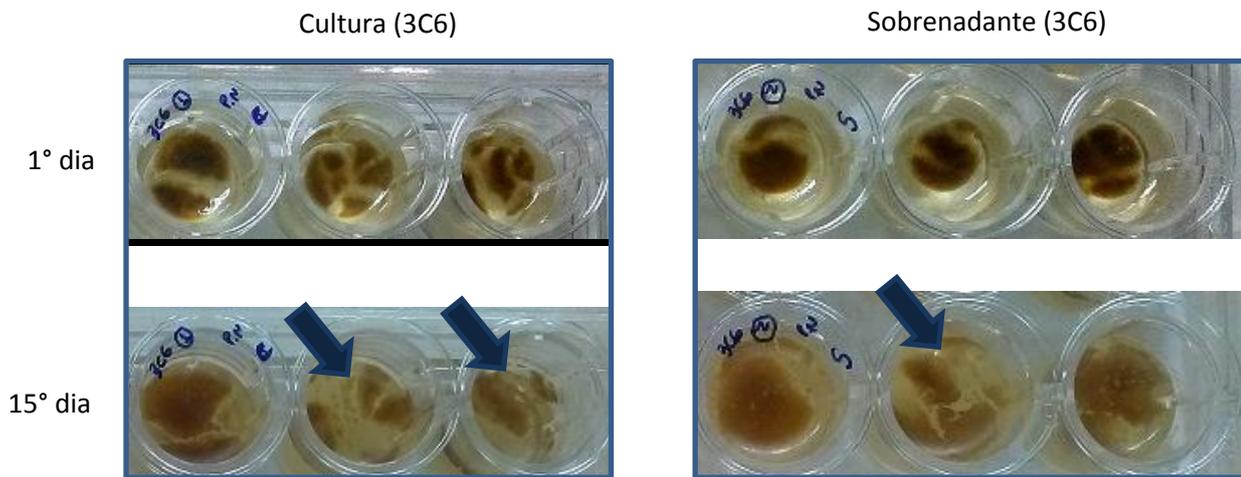


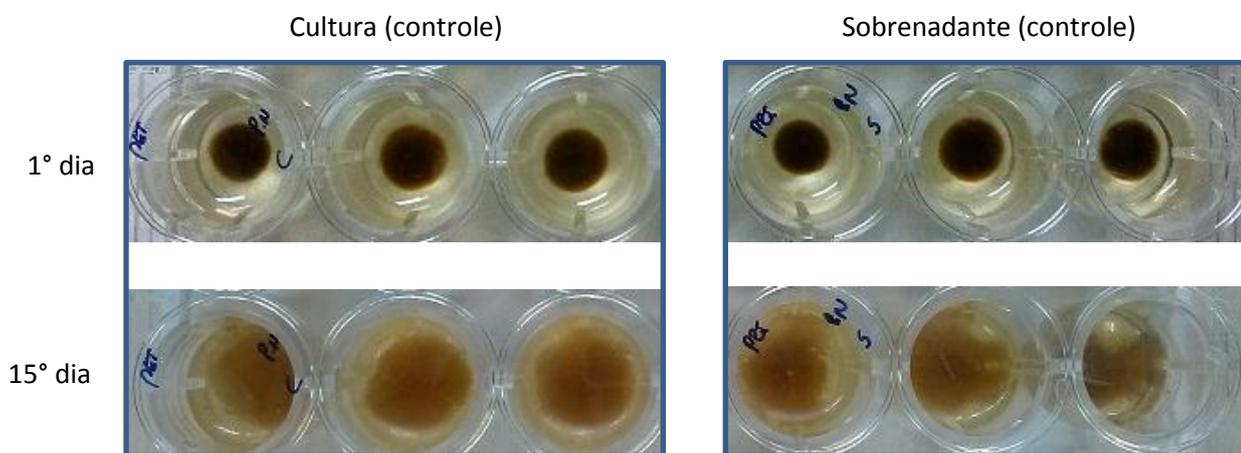
Figura 13. Atividade emulsificante. Clone 3C6 e vetor pETDuet-1, tanto a cultura como o sobrenadante. SDS foi usado como controle positivo e o meio LB puro como controle negativo. *** $p < 0,0001$.

5.6- Ensaio de degradação de hidrocarbonetos

O ensaio de degradação de hidrocarbonetos mostrou que o clone 3C6 foi capaz de degradar o petróleo, provavelmente devido a sua habilidade de síntese de biossurfactante. Tanto as células transformadas com o vetor carregando o inserto, durante 24 h com IPTG, como o sobrenadante apresentaram indícios de degradação, como pode ser observado na fig 14 A. O controle negativo, contendo células transformadas com o vetor vazio pETDuet-1 não apresentou degradação em nenhuma das amostras contendo hidrocarbonetos, fig 14 B.



A



B

Figura 14. Ensaio de degradação de hidrocarbonetos. A) Clone 3C6 mostrando a cultura (esquerda) e o sobrenadante (direita) no 1º dia e no 15º dia evidenciando a degradação de hidrocarbonetos, como indicado pelas setas. B) Vetor vazio pETDuet-1 mostrando a cultura (esquerda) e o sobrenadante (direita) no 1º dia e no 15º dia, não apresentando atividade de degradação.

6- DISCUSSÃO

O presente trabalho propôs a clonagem de ORF's identificadas anteriormente por Silveira (2010), envolvidas no processo de degradação de hidrocarbonetos e na síntese de biossurfactantes. No presente estudo, 12 clones foram testados para produção de biossurfactantes, a partir de diferentes ensaios, e 9 clones apresentaram atividade positiva.

Vários estudos comprovaram que a abordagem metagenômica se tornou uma excelente ferramenta para acessar a biodiversidade genética dos organismos. Diversos genes com potencial biotecnológico já foram encontrados em bibliotecas metagenômicas, no entanto, não se tem relato de proteínas com atividade biossurfactante ou de uma proteína participante de alguma via que produza surfactante, isoladas a partir de uma abordagem metagenômica. A maioria dos estudos apenas descrevem microrganismos isolados a partir de cultura pura, principalmente os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* (OCHSNER *et al.*, 1994; CHAVÉZ *et al.*, 2005; HSIEH *et al.*, 2004). Adicionalmente não há registro na literatura de investigação relacionada com a produção de biossurfactantes usando clones derivados de bibliotecas metagenômicas, o que torna ainda mais relevante os resultados obtidos neste trabalho.

Trabalhos recentes realizados no LBMG comprovaram o potencial das bibliotecas metagenômicas na busca de genes com potencial biotecnológico. Em seu trabalho, Melo (2012) encontrou 8 clones com atividade de degradação de hidrocarbonetos em uma biblioteca de eDNA da microbiota estuarina. Enquanto Silva (submetido) caracterizou uma nova exonuclease derivada de uma biblioteca de João Câmara (Caatinga).

A produção de biossurfactante pelo clone 3C6 foi confirmada através de três metodologias: ensaio de emulsificação, determinação da atividade emulsificante e de degradação de hidrocarbonetos. Os resultados obtidos nos ensaios sugerem que a melhor fase de crescimento em que ocorre a liberação do composto se dá após 24 h de indução, período em que há maior probabilidade de acúmulo de metabólitos. A análise de sequência revelou uma ORF completa de maior similaridade com proteínas hipotéticas, o que pode evidenciar uma proteína ainda não descrita nos bancos de dados.

O clone 3C6 foi obtido de uma biblioteca metagenômica construída a partir de um rio salino. Em geral, os microrganismos produtores de biossurfactantes são isolados de locais contaminados com hidrocarbonetos, no entanto existem relatos de produtores isolados de locais não contaminados (JENNINGS *et al.* 2000). Apesar do clone 3C6 constituir um sistema de expressão heteróloga em células de *Escherichia coli*, Pruthi e Cameotra (1997) bem como Lee *et al.* (2007) relataram a inabilidade de *Escherichia coli* em produzir biossurfactante, através da avaliação da hidrofobicidade e tensão superficial, respectivamente. Sendo assim, essa capacidade foi adquirida devido, provavelmente, à presença do inserto derivado da biblioteca metagenômica de rio salino.

Uma das principais funções do biossurfactante é a capacidade de emulsificar e solubilizar hidrocarbonetos. Um biossurfactante pode ser avaliado pela sua habilidade emulsificante e pela capacidade de reduzir a tensão superficial, porém essas duas características não estão correlacionadas (YOUSSEF *et al.*, 2004). Dois importantes parâmetros na avaliação do poder emulsificante são o índice de emulsificação (E24%) e a estabilidade da emulsão (COOPER e GOLDENBERG, 1987; ABU-RUWAIDA *et al.* 1991; COSTA, 2005; NITSCHKE e PASTORE, 2006). Os biossurfactantes de alto peso molecular estão em geral associados à produção de emulsão, enquanto que os de baixo peso molecular estão associados à redução da tensão superficial (CHRISTOFI e IVSHINA, 2002; RON e ROSENBERG, 2002, LANG, 2002; SULLIVAN, 1998; ROSENBERG, 1999). Biossurfactantes com elevado peso molecular são conhecidos por suas propriedades emulsificantes que atuam no aumento da recuperação e mobilidade de óleo pesado (BANAT *et al.*, 2010). Serão ainda realizados ensaios para verificar a capacidade do biossurfactante produzido pelo clone 3C6 em reduzir a tensão superficial.

O clone 3C6 após subclonagem em vetor de expressão foi capaz de produzir uma emulsão estável em querosene por mais de 24 h e após 6 meses da realização do ensaio, tanto nos testes realizados com a cultura (meio de cultivo) como no sobrenadante livre de células. Um bom emulsificante está descrito como sendo capaz de formar emulsão com hidrocarboneto, e esta deve se manter estável por 24 horas ou mais (WILLUMSEN e KARLSON,

1997). Neste trabalho, o valor máximo de emulsificação utilizando querosene como fonte de hidrocarboneto foi de 50%, tanto no teste realizado com a cultura (meio de cultivo) como com o sobrenadante livre de células. Alguns trabalhos já relataram valores de 50% para o índice de emulsificação utilizando o querosene comercial como fonte de hidrocarboneto (BENINCASA, 2004; BATISTA *et al.* 2006; BICCA *et al.* 1999). Haba *et al.* (2000) mostrou o índice de emulsificação variando de 12 a 64% para o metabólito sintetizado por diversos tipos de *Pseudomonas*.

Segundo alguns autores, bactérias com atividade biossurfactante produzem emulsões estáveis após 24 h (E24%), pelo fato de produzirem substâncias anfifílicas (MESQUITA, 2004; BANAT *et al.*, 2000, NITSCHKE e PASTORE, 2002). A capacidade para estabilizar uma emulsão é uma indicação de que o microrganismo produz biossurfactante (BATISTA *et al.*, 2006) e uma boa atividade de emulsificação é fundamental na aplicabilidade dos biossurfactantes (BANAT *et al.*, 2000).

O fato de o sobrenadante livre de células do clone 3C6 apresentar a capacidade de emulsionar o querosene, como mostrado na figura 7, é interessante do ponto de vista biotecnológico, pois facilitaria os passos de purificação. Nesse caso, o produto possivelmente está sendo liberado no meio extracelular, o que diminuiria os custos com as etapas de purificação (ABOUSEOUD *et al.*, 2008).

A atividade de emulsificação do clone 3C6 apresentou maior densidade óptica de 2,15 e 2,24, para a cultura e sobrenadante, respectivamente. Quanto maior a densidade óptica, maior será a atividade emulsificante. O surfactante denominado emulsan é sintetizado por bactérias do tipo *Acinetobacter calcoaceticus* e tem sido comercializado para recuperação e tratamento de áreas contaminadas por hidrocarbonetos (ASSADI, *et al.*, 2010). O emulsan atinge uma densidade óptica de 2,44 a 600 nm (LANG, 2002), que quando comparada a densidade óptica do clone 3C6, apresenta um valor aproximado.

A atividade de degradação do petróleo foi observada, sendo esse apenas um ensaio qualitativo. Essa degradação poderá ser mensurada posteriormente. Microrganismos como *Nocardia* e *Exiguobacterium* foram

relatados como degradadores de hidrocarbonetos e produtores de biossurfactantes (KASTNER *et al.*, 1994; VOMBERG e KLINNER, 2000; HAMAMURA *et al.*, 2006; ZEINALI *et al.*, 2007, WANG *et al.*, 2008). Assim como o clone 3C6 que apresentou uma possível atividade emulsificante e de degradação.

A análise de sequência da proteína hipotética revelou semelhanças com proteínas de duas arqueias pertencentes à família *Halobacteriaceae*, que foram mostradas recentemente, como produtoras de biossurfactantes (KEBBOUCHE-GANA *et al.*, 2009). Ambas apresentaram uma alta capacidade de estabilização de emulsão e foram capazes de reduzir a tensão superficial do meio de crescimento.

Organismos halófilos são capazes de se desenvolver em ambientes com altas concentrações salinas e são ditos extremófilos por se desenvolverem em condições extremas. As arqueias halofílicas (Archaea) habitam, preferencialmente, locais com elevadas concentrações de sal (HARTMAN *et al.*, 2010), o que coincide com o ambiente salino (rio salino) do qual o clone 3C6 é derivado, margens do Rio Jundiá-RN.

Na literatura foram descritos alguns microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos alifáticos e hidrocarbonetos aromáticos sob altas concentrações salinas (>15%) (BERTRAND *et al.*, 1990; KULICHEVSKAYA *et al.*, 1991, EMERSON *et al.*, 1994; SEI e FATHEPURE 2009; AL-MAILEM *et al.*, 2010; TAPILATU *et al.*, 2010; BONFÁ *et al.*, 2011; DALVI *et al.*, 2012; ERDOGMUS *et al.*, 2013). Sendo, então, o rio salino um ambiente favorável a prospecção de genes com atividade de biossurfactante em virtude das condições de estresse.

Apesar do número de microrganismos halófilos conhecidos capazes de crescer em hidrocarbonetos como sua única fonte de carbono e energia esteja em constante crescimento, as informações disponíveis sobre o papel desempenhado por arqueia na biodegradação de poluentes orgânicos em ambientes hipersalinos ainda é limitada (LE BORGNE *et al.*, 2008). Uma arqueia extremamente halófila identificada como *Haloferax mediterranei* apresentou crescimento tendo petróleo como única fonte de carbono

(ZVYAGINTSEVA *et al.*, 1995). Em outro exemplo, a produção de biossurfactantes pela bactéria halotolerante *Bacillus* já foi descrita, assim como seu potencial uso na limpeza de áreas contaminadas (JENNEMAN *et al.*, 1983). Nicholson e Fathepure (2005) demonstraram a capacidade de algumas bactérias halófilas e halotolerantes degradarem benzeno e tolueno.

O processo de biorremediação na recuperação de áreas contaminadas é bastante conhecido, no entanto ainda pouco se sabe sobre a utilização de microrganismos halófilos nessa técnica e numerosos problemas permanecem sem solução (PATZELT, 2005).

Os resultados obtidos nas análises através dos servidores *online PHYRE 2* e *HHPred* apresentaram resultados semelhantes quanto a similaridade da proteína clonada a uma rubredoxina. A rubredoxina é uma proteína pequena com um sítio ativo ferro-enxofre que está envolvida na oxidação de alcanos em bactérias, que teve sua via metabólica melhor caracterizada em *Pseudomonas putida (oleovorans)* GPo1 (van BEILEN *et al.*, 1994). O metabolismo de alcanos normalmente ocorre via oxidação sequencial de um grupo metil terminal que será convertido em álcool, aldeído e finalmente ácido graxo. A reação é realizada por um complexo enzimático denominado “sistema Alk B”, composto por uma alcano hidroxilase transmembrana (Alk B), uma ou duas rubredoxinas (Alk F e Alk G) e uma rubredoxina redutase (Alk T) (van BEILEN *et al.*, 2002). A rubredoxina está envolvida no transporte de elétrons da rubredoxina redutase para a alcano hidroxilase (LEE, *et al.*, 1998). Fiala e Stetter (1986) isolaram uma rubredoxina de espécie extremofílica do domínio Archaea denominada *Pyrococcus furiosus*. Apesar de a maior similaridade ter sido com proteínas hipotéticas, a semelhança estrutural com a rubredoxina sugere que a sequência de DNA do clone 3C6 poderá codificar uma nova proteína com função relacionada à degradação de hidrocarbonetos.

7- CONCLUSÃO

Neste trabalho, um clone selecionado funcionalmente, em um estudo anterior, em uma biblioteca metagenômica derivada das margens de um rio salino, foi subclonado em vetor de expressão, para confirmar sua possível atividade biossurfactante. A expressão do produto proteico foi induzida e testada em diferentes condições de cultivo. Os resultados se mostraram satisfatórios para emulsificação e degradação de hidrocarbonetos. A presença do produto proteico foi comprovada por imunodeteção. A análise da sequência do clone através de ferramentas de bioinformática mostrou maior similaridade com proteínas hipotéticas, o que pode indicar um novo gene. A sequência também apresentou similaridade estrutural com a proteína denominada rubredoxina, que é descrita na literatura como sendo envolvida na oxidação de hidrocarbonetos.

8- PERSPECTIVAS

Para trabalhos futuros, se faz necessário ampliar os resultados obtidos até o momento. Sendo assim, a próxima etapa será purificar e caracterizar a proteína, além de estabelecer protocolos para comprovação de sua atividade. Bem como extrair o surfactante e realizar ensaios específicos para sua caracterização. Deste modo será possível concluir as observações que foram obtidas neste trabalho.

9- REFERÊNCIAS

ABE, T., SAHIN, F. P., AKIYAMA K., NAITO T., KISHIGAMI M., MIYAMOTO K., SAKAKIBARA Y., UEMURA D. Construction of a metagenomic library for the marine sponge *Halichondria okadai*. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.76, p.633-639, 2012.

ABOUSEOUD, M., YATAGHENE, A., AMRANE, A., MAACHI, R. Biosurfactant production by free and alginate entrapped cells of *Pseudomonas fluorescens*. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v.35, p.1303-1308, 2008.

ABU-RUWAIDA, A. S., BANAT I. M., HADITIRTO, S. *et al.* Isolation of biosurfactant producing bacteria: Product characterization and evaluation. **Acta Biotechnol**, v.2, p.315–324, 1991.

ALLEN, H. K. Antibiotic resistance gene discovery in food-producing animals. **Current Opinion in Microbiology**, v.19, p.25-29, 2014.

AL-MAILEM D. M., SORKHOH N. A., AL-AWADHI H., ELIYAS M., RADWAN S.S. Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian Gulf. **Extremophiles**, v.14, p.321-328, 2010.

AMARAL P. F., COELHO M. A., MARRUCHO I. M., COUTINHO J. A. Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application. **Adv Exp Med Biol**, v.672, p.236–249, 2010.

ANP- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/>

ARONSTEIN B. N., CALVILLO, Y. M., ALEXANDER, M. Effect of surfactants of low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. **Environment Science & Technology**, v.25, p.127-33, 1992.

ASSADI, M., TABATABAEE, M. S. Biosurfactants and their use in upgrading petroleum vacuum distillation residue: A review. **Int. J. Environ. Res.**, v.4, p. 549–572, 2010.

ASH, M., ASH, I. Handbook of industrial surfactants. **Gower Publishing Company**, 1993.

ATLAS, R.M. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. **Microbiol Rev**, v.45, p.180-209, 1981.

AZEVEDO C. M. A. Bioprospecção: coleta de material biológico com a finalidade de explorar recursos genéticos. Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. Série Cadernos da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. Caderno nº 17, 2003.

BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A Review. **Bioresource Technology**, v.51, p.1-12, 1995.

BANAT I. M., FRANZETTI A., GANDOLFI I., BESTETTI G., MARTINOTTI M. G., FRACCHIA L., SMYTH T. J., MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.87, p.427–444, 2010.

BANAT, I. M., MAKKAR, R. S., CAMEOTRA, S. S. Potencial Applications of Microbial Surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.495-508, 2000.

BATISTA, S. B., MOUNTEER, A. H., AMORIM, F. R., TÓLOLA, M. R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**, v.97, p.868-875, 2006.

BENINCASA, M., ABALOS, A., OLIVEIRA, I., MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 85, p.1–8, 2004.

BENTO, F. M., CAMARGO, F. A. O., OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.65-68, 2003.

BERGMANN, J. C., COSTA, O. Y., GLADDEN, J. M. *et al.* Discovery of two β -glucosidases from an Amazon soil metagenomic library. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.351, p.147-155, 2014.

BERTRAND J. C, ALMALLAH, M., ACQUAVIVA, M., MILLE, G. Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic *archae* bacterium. **Lett Appl Microbiol.**, v.11, p.260–263, 1990.

BICCA, F. C., FLECK, L. C., AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *rhodococcus ruber* and *rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p.231-236, 1999.

BONFÁ, M. R. L., GROSSMAN, M. J., MELLADO, E., DURRANT, L. R. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by *Haloarchaea* and their use for the reduction of the chemical oxygen demand of hypersaline petroleum produced water. **Chemosphere**, v.84, p.1671-1676, 2011.

CAMEOTRA, S. S., MAKKAR, R. S., KAUR, J., MEHTA, S. K. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. **Adv Exp Med Biol**, v.672, p.261–280, 2010.

CAMEOTRA, S. S., MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Curr Opin Microbiol**, v.7, p.262-266, 2004.

CANHOS V. P., MANFIO G. P. Recursos Microbiológicos para Biotecnologia. Diretrizes e estratégias do Fundo Setorial da Biotecnologia. Comitê Gestor do Fundo Setorial de Biotecnologia, Centro de Referência em Informação ambiental. **Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia**, 2002.

- CHAVÉZ, G. S., LÉPINE, F., DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v.68, p.718–725, 2005.
- CHRISTOFI, N., IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p.915-929, 2002.
- CIRIGLIANO, M. C., AND CARMAN, G. M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Appl Environ Microbiol**, v.48, p.747-50, 1984.
- COOPER, D. G. AND GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus species*. **Appl. Env. Microbiol.**, v.53, p.224-229, 1987.
- COSTA, G. A. N. **Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações**. Campinas, 2005. 87 f. Dissertação (Mestrado). Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- COSTA, S. G. V. A. O., *et al.* Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v.41, p.438-488, 2006.
- COWAN, D., MEYER Q., *et al.* Metagenomic gene discovery: past, present and future. **Trends Biotechnol**, v.23, p.321-9, 2005.
- CULLIGAN, E. P., MARCHESI, J. R., HILL, C., SLEATOR, R. D. Combined metagenomic and phenomic approaches identify a novel salt tolerance gene from the human gut microbiome. **Frontiers in microbiology**, v.5, 2014.
- CURTIS, T. P. E SLOAN, W. T. Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. **Curr Opin Microbiol**, v.7, p.221-6, 2004.
- DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, p.470-478, 2005.
- DAS, K., MUKHERJEE, A. K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. **Bioresource Technology**, v.98, p.1339- 1345, 2007.
- DAS P., MUKHERJEE S., SIVAPATHASEKARAN C., SEN R. Microbial surfactants of marine origin: potentials and prospects. **Adv Exp Med Biol**, v.672, p.88–101, 2010.
- DALVI S., AZETSU S., PATRAUCHAN M. A., AKTA D. F., FATHEPURE B. Z. Proteogenomic elucidation of the initial steps in the benzene degradation pathway of a novel halophile, *Arhodomonas* sp. strain Rozel, isolated from a hypersaline environment. **Appl Environ Microbiol**, v.78, p.7309-7316, 2012.

DIAZ-TORRES, M. L.; MCNAB, R.; SPRATT, D. A.; VILLEDIEU, A.; HUNT, N.; WILSON, M.; MULLANY, P. Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.47, p.1430-1432, 2003.

DINARDI, A. L. Fitorremediação. III fórum de estudos contábeis 2003. Rio Claro (SP), 2003.

DINSDALE, E. A. *et al.* Functional metagenomic profiling of nine biomes. **Nature**, v.452, p.629–632, 2008.

ELAINE, E. R. The impact of next generation sequencing technology on genetics. **Trends Genet**, v.24, p.133-141, 2008.

ELEND, C., SCHMEISSER, C., LEGGEWIE, C., BABIAK, P., CARBALLEIRA, J. D., STEELE, H. L., REYMOND, J-L., JAEGER, K-E., STREIT, W. R. Isolation and biochemical characterization of two novel Metagenome-derived esterases. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.72, p.3637-3645, 2006.

EMERSON D., CHAUHAN S., ORIEL P., JOHN A. *Breznak Haloferax* sp. D1227, a halophilic Archaeon capable of growth on aromatic compounds. **Arch Microbiol**, v.161, p.445-452, 1994.

ERDOGMUS, S. F., MUTLU B., KORCAN S. E., GUVEN K., KONUK M. Aromatic hydrocarbon degradation by halophilic archaea isolated from Çamalti Saltern, Turkey. **Water Air Soil Pollut**, p.224-1449, 2013.

FANG, W., FANG Z., ZHOU, P., CHANG, F., HONG, Y., ZHANG, X., PENG, H., XIAO, Y. Evidence for lignin oxidation by the giant panda fecal microbiome. **Plos One**, v.7, p. e50312, 2012.

FERRER M., BELOQUI A., TIMMIS K. N., GOLYSHIN P. N. Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. **J Mol Microbiol Biotechnol**, v.16, p.109-23, 2009.

FERRER, M., GOLYSHINA, O. V., CHERNIKOVA, T. N., KHACHANE, A. N., REYES-DUARTE, D., MARTIN DOS SANTOS, V. A. P., STROMPL, C., ELBOROUGH, K., JARVIS, G., NEEF, A., YAKIMOV, M. M., TIMMIS, K. N., GOLYSHIN, P. N. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. **Environ. Microbiol.**, v.7, p.1996-2010, 2005.

GABOR, E., *et al.* Construction, characterization, and use of small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases. **Environ. Microbiol**, v.6, p.948–958, 2004.

GABOR, E., *et al.* Updating the metagenomics toolbox. **Biotechnol J**, v.2, p.201–206, 2007.

GALLEGO, J. R., FERNANDEZ, J. R., DIEZ-SANZ, F., ORDONEZ, S., SASTRE, H., GONZALEZ-ROJAS, E., PELAEZ, A. I., SANCHEZ, J. Bioremediation for shoreline cleanup: in situ vs. on-site treatments. **Environ Eng Sci.**, v.24, p.493–504, 2007.

GARCIA, E. S. **O Valor dos Microrganismos**. Caderno de Saúde Pública, v.11, 1995.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, p.15-32, 2002.

HABA, E., ESPUNY, M. J., BUSQUETS, M., MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.379–387, 2000.

HAMAMURA, N., OLSON, S. H., WARD, D. M., INSKEEP, W. P. Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils. **Appl Environ Microbiol**, v.72, p.6316-24, 2006.

HANDELSMAN, J. O., *et al.* Understanding our microbial planet the new science of metagenomics. **National Academy of Sciences**, 2007.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.68, p.669-85, 2004.

HANDELSMAN, J., RONDON, M. R., BRADY, S. F., CLARDY, J., AND GOODMAN, R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chem Biol**, v.5, p.245-9, 1998.

HARTMAN, A. L., NORRIS, C., *et al.* The complete genome sequence of *Haloferax volcanii* DS2, a model archaeon. **Plos One**, v.5, p.9605, 2010.

HASSANSHAHIAN, M., EMTIAZI, G., CAPPELLO, S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. **Mar. Pollut. Bull.**, v.64, p.7-12, 2012.

HEAD, I. M., JONES, D. M., ROLING, F. M. Marine microorganisms make a meal of oil. **Nature Reviews Microbiology**, v.4, p.173-181, 2006.

HENNE, A., SCHIMITZ, R. A., BOMEKE, M., GOTTSCHALK, G., CANIEL, R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3113-3116, 2000.

HSIEH, F. C., LI, M. C., LIN, T. C., KAO, S. S. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. **Current Microbiology**, v.49, p.186–191, 2004.

HUSE S. M., DETHLEFSEN L., HUBER J. A., WELCH D. M., RELMAN D. A., SOGIN M. L. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. **PLoS Genet**, 2008.

IBRAHIM, M. L., IJAH, U. J. J., MANGA, S. B., BILBIS, L. S., UMAR, S. Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.81, p.28–34, 2013.

IQBAL, S., KHALID, Z. M., MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Lett Appl Microbiol.**, v.21, p.176-9, 1995.

JENNEMAN, G .E., MCINERNEY, M. J., KNAPP, R. M., CLARK, J. B., FERRO, J. M., REVUS, D. E., MENZIE, D. E. A halotolerant biosurfactant-producing *bacillus species* potentially useful for enhanced oil recovery. **Dev. Ind. Microbial**, v.24, p.485-492, 1983.

JENNINGS, E. M., TANNER, R. S. **Proceedings of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research**, Manhattan, USA, 2000.

JOSHI, M. N., DHEBAR, S. V., DHEBAR, S. V., BHARGAVA, P., PANDIT A. S., PATEL, R. P., SAXENA, A. K., BAGATHARIA, S. B. Metagenomic approach for understanding microbial population from petroleum muck. **Genome Announc**, v.2, p.e00533, 2014.

JUWARKAR, A. A., DUBEY, K. V., NAIR, A., SINGH, S. K. Bioremediation of multi-metal contaminated soils using Biosurfactants - A novel approach. **Indian Journal of Microbiology**, v.48, p.242-246, 2008.

KASTNER, M., BREUER-JAMMALI, M., MAHRO, B. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). **Appl Microbiol Biotechnol**, v.41, p.267-273, 1994.

KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de “landfarming”**. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2001.

KATOH K., ASIMENOS G., TOH H. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. **Methods Mol Biol.**, v.537, p.39-64, 2009.

KEBBOUCHE-GANA S., GANA M. L., KHEMILI S., FAZOUANE-NAIMI F., BOUANANE N. A., PENNINGCKX M., HACENE, H. Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v.36, p.727–738, 2009.

KELLEY, L. A. AND STERNBERG, M. J. E. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. **Nature Protocols**, v.4, p.363-371, 2009.

KOK, M., OLDENHUIS, R., VAN DER LINDEN, M. P. G., MEULENBERG, C. H. C., KINGMA, J. and WITHOLT, B. The *Pseudomonas oleovorans* alkBAC operon encodes two structurally related rubredoxins and an aldehyde dehydrogenase. **J. Biol. Chem.**, v.264, p.5442-5451, 1989.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their applications for soil biorremediation. **Food Technology and Biotechnology**, v.39, p.295-304, 2001.

KOWALCHUK G. A., SPEKSNIJDER A. G., ZHANG K., GOODMAN R. M. & VAN VEEN J. A. Finding the needles in the metagenome haystack. **Microb Ecol**, v.53, p.475–485, 2007.

KULICHEVSKAYA, I. S., MILEKHINA, E. I., BORZENKOV, I. A., ZVYAGINTSEVA, I. S., BELYAEV, S. S. Oxidation of petroleum-hydrocarbons by extremely halophilic archaeobacteria. **Microbiology**, v.60, p.596-601, 1991.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.7, p.12–20, 2002.

LE BORGNE, S., PANIAGUA, D., VAZQUEZ-DUHALT, R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. **J Mol Microbiol Biotechnol**, v.15, p.74-9, 2008.

LEE, D. G., JEON, J. H., JANG, M. K., KIM, N. Y., LEE, J. H., LEE, J. H., KIM, S. J., KIM, G. D., AND LEE, S. H. Screening and characterization of a novel fibrinolytic metalloprotease from a metagenomic library. **Biotechnol Lett.**, v.29, p.465-72, 2007.

LEE, H. J., BASRAN, J., SCRUTTON, N. S. Electron transfer from flavin to iron in the *Pseudomonas oleovorans* rubredoxin reductase-rubredoxin electron transfer complex. **Biochemistry**, v.37, p.15513-15522, 1998.

LIMA, T. M. S., PROCÓPIO, L. C., BRANDÃO, F. D., CARVALHO, A. M. X., TÓTOLA, M.R., BORGES, A. C. Biodegradability of bacterial surfactants. **Biodegradation**, v.22, p.585-592, 2011.

LORENZ, P., ECK, J. Metagenomics and industrial applications. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.510-516, 2005.

LORENZ, P., AND SCHLEPER, C. Metagenome—a challenging source of enzyme discovery. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.19, p.13–19, 2002.

LOURITH N., KANLAYAVATTANAKUL M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. **Int J Cosmet Sci**, v.31, p. 255–26, 2009.

LOVENBERG W., SOBEL, B. E. Rubredoxin: a new electron transfer protein from *Clostridium pasteurianum*. **Proc Natl Acad Sci**, v.54, p.193-199, 1965.

MEHDI, H., GITI, E. Investigation of alkane biodegradation using microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.62, p.170-178, 2008.

MEILLEUR, C., *et al.* Isolation and characterization of a new alkali-thermostable lipase cloned from a metagenomic library. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v.36, p.853–861, 2009.

MELO, A. J. **Metagenômica: busca de novos genes envolvidos com a biodegradação de hidrocarbonetos**. Natal: UFRN, 2012. 66 f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

- MESQUITA, A. C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns componentes recalcitrantes**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2004. 158 f. Tese (doutorado)- Programa de Pós-Graduação de Engenharia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.
- MORIKAWA, M., DAIDO, H., TAKAO, T., MURATA, S., SHIMONISHI, Y. and IMANAKA, T. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter sp. strain MIS38*. **J. Bacteriol.**, v.175, p.6459-6466, 1993.
- MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environ Pollut**, v.133, p.183-98, 2005.
- MULLIGAN, C. N., GIBBS, B. F. Types, production and applications of biosurfactants. **Proc. Indian Nat. Sci. Acad.**, v.1, p.31-55, 2004.
- MUYZER, G., DEWAAL, E. C., UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S ribosomal RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.695-700, 1993.
- NEILSON J. W., ARTIOLA J. F., MAIER R. M. Characterization of lead removal from contaminated soils by non-toxic soil-washing agents. **J Environ Qual.**, v. 32, p.899–908, 2003.
- NICHOLSON, C. A., FATHEPURE, B. Z. Aerobic biodegradation of benzene and toluene under hypersaline conditions at the Great Salt Plains, Oklahoma. **FEMS Microbiol Lett**, v.245, p.257-262, 2005.
- NITSCHKE M., COSTA S. Biosurfactants in food industry. **Trends Food Sci Technol**, v.18, p.252–259, 2007.
- NITSCHKE, M., COSTA, S. G. V. A. O., CONTIERO, J. Rhamnolipid surfactants: An update on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnological Progress**, v.21, p.1593-1600, 2005.
- NITSCHKE, M., PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v.97, p.336-341, 2006.
- OKOH, A. I. AND TREJO-HERNANDEZ, M. R. Remediation of petroleum hydrocarbon polluted system: Exploiting the bioremediation strategies. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p.2520-2525, 2006.
- OLIVEIRA, A. N., OLIVEIRA, L. A., ANDRADE, J. S., AND CHAGAS, A. F. Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central crescendo em diferentes níveis de acidez, **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, p.204-210, 2006.
- OCHSNER, U. A., KOCH, A. K., FIETCHER, A., REISER, J. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology.**, p.2044-2054, 1994.

PACWA-PLOCINICZAK P. G. A., PIOTROWSKA-SEGET Z., CAMEOTRA S. S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **Int. J. Mol. Sci.**, v.12, p.633–654, 2011.

PATZELT, H. Hydrocarbon degradation under hypersaline conditions - some facts, some experiments and many open questions. In: Gunde-Cimerman N, Oren A, Plemenitas A (eds) *Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria and Eukarya*. **Springer**, p.105-122, 2005.

PETERSON, J. A., BASU, D. and COON, M. J. Enzymatic o-oxidation. I. Electron carriers in fatty acid and hydrocarbon hydroxylation. **J. Biol. Chem.**, v.241, p.5162-5164, 1966.

PIETRO, L. M.; MICHELON, M.; BURKERT, J. F. M.; KALIL S. J.; BURKERT, C. A. V. The production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil. **Chemosp.**, v.71, p.1781-5, 2008.

PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. Rio Claro: UNESP, 2006. 55 f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação do Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

PRUTHI, V., CAMEOTRA, S. S. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. **Biotechnology Techniques**, v.11, 1997.

RAHMAN, K. S. M. *et al.* Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low cost raw materials. **Biotechnology Progress**, v.18, p.1277-1281, 2002.

RAHMAN, K. S. M., RAHMAN, T. J., KOURKOUTAS Y., PETSAS, I., MARCHANT, R., BANAT, I. M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technology**, v. 90, p.159-168, 2003.

RODRIGUES L., BANAT I. M., TEIXEIRA J., OLIVEIRA R. Biosurfactants: potential applications in medicine. **J Antimicrob Chemother**, v.57, p.609–618, 2006.

ROLING W. F. M., FERRER M., GOLYSHIN P. N. Systems approaches to microbial communities and their functioning. **Curr Opin Biotechnol**, v.21, p.8-532, 2010.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.249-252. 2002.

RON, E. Z., ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environ Microbiol**, v.3, p.229-236. 2001.

RONDON, M., AUGUST, P., BETTERMANN, A. D., BRADY, S. F., *et al.* Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, p.2541-2547, 2000.

- ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactant. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.52, p.154-162, 1999.
- SALANITRO, J. P. Bioremediation of petroleum in soil. **Adv. Agron.**, v.72, p.53-105, 2001.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SATPUTE, S. K., BANPURKAR, A. G., DHAKEPHALKAR, K., BANAT, I. M., CHOPADE, B. A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. **Crit Rev Biotechnol**, v.30. p.127–144, 2010.
- SCHMITT, T. M. Analysis of surfactants. **Surfactant Science Series**, v.96, p.61-63, 2001.
- SCHNOOR, J. L. The gulf oil spill. **Environ. Sci. Technol.**, v.44, p.4833, 2010.
- SEI, A., FATHEPURE, B. Z. Biodegradation of BTEX at high salinity by an enrichment culture from hypersaline sediments of Rozel Point at Great Salt Lake. **J Appl Microbiol**, v.107, p.2001-2008, 2009.
- SCHMEISSER, C., STEELE, H., STREIT, W. R. Metagenomics, biotechnology with non- culturable microbes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, p.955-962, 2007.
- SCHMEISSER, C.; STÖCKIGT, C.; RAASCH, C.; WINGERDER, J.; TIMMIS, K. N.; WENDEROTH, D. F.; FLEMMING, H. C.; LIESEGANG, H.; SCHMITZ, R. A.; JAEGER, K-E.; STREIT, W. D. Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks. **Appl. Environm. Microbiol.**, v.69, p.7298-7309, 2003.
- SHARMA S., SINGH P., RAJ M., CHADHA B. S., SAINI H. S. Aqueous phase partitioning of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers by biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* WH-2. **J Hazard Mater**, v.171, p.1178–1182, 2009.
- SHETE A. M., WADHAWA G., BANAT I. M., CHOPADE B. A. Mapping of patents on bioemulsifier and biosurfactant: a review. **J Sci Indust Res**, v.65, p.91–115, 2006.
- SINGH B. K. Exploring microbial diversity for biotechnology: the way forward. **Trends Biotechnol**, v.28, p.6-111, 2010.
- SINGH P. B., SHARMA S., SAINI H. S., CHADHA B. S. Biosurfactant production by *Pseudomonas sp.* and its role in aqueous phase partitioning and biodegradation of chlorpyrifos. **Lett Appl Microbiol**, v.49, p.378–383, 2009.
- SILVA, R. C. B. **Prospecção de genes de interesse biotecnológicos: uma abordagem metagenômica**. Natal: UFRN, 2009. 70 f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.
- SILVA, R. C. B. **Caracterização de uma nova exonuclease identificada em uma biblioteca metagenômica**. Natal: UFRN, 2014. 129 f. Tese (doutorado) –

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

SILVA, U. B. **Prospecção de novos genes que conferem resistência ao estresse salino**. Natal: UFRN, 2013. Tese (doutorado) – Programa Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

SILVEIRA, T. R. **Produção de biossurfactante e degradação de óleo cru por clones metagenômicos**. Natal: UFRN, 2010. 46 f. Monografia – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

SIMON, C., HERATH, J., ROCKSTROH, S., DANIEL, R. Rapid identification of genes encoding DNA polymerases by function-based screening of metagenomic libraries derived from glacial ice. **Appl Environ Microbiol**, v.75, p.2964–2968, 2009.

SNAPE, I., FERGUSON, S. H., HARVEY, P. M., RIDDLE, M. J. Investigation of evaporation and biodegradation of fuel spills in Antarctica: II – extent of natural attenuation at Casey Station. **Chemosphere**, v.63, p.89–98, 2006.

SODING, J. Protein homology detection by HMM-HMM comparison. **Bioinformatics**, v.21, p.951-960, 2005.

STEELE, H. L., STREIT, W. R. Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology. **FEMS Microbiology Letters**, v.247, p.105-111, 2005.

SULLIVAN, E. Molecular Genetics of Biosurfactant Production. **Current Opinion in Biotechnology**, v.9, p.263-269, 1998.

SUN, Y., CHEN, Z., XU, S., CAI, P. Stable carbon and hydrogen isotopic fraction of individual n-alkanes accompanying biodegradation: evidence from group of progressively biodegraded oils. **Org. Geochem**, v.36, p.225-238, 2005.

SUN, X., WU, L., LUO, Y. Application of organic agents in remediation of heavy metals- contaminated soil. **Ying Yong Sheng Tai Xue Bao**, v.17, p.1123-1128, 2006.

SWISHER, R.D. Surfactant Biodegradation. **Surfactant Science Series**, v.18, 1987.

TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Mol. Biol. Evol.**, v.28, p.2731-2739, 2011.

TAPILATU Y. H., GROSSI, V., ACQUAVIVA, M., MILITON, C., BERTRAND, J. C., CUNY, P. Isolation of hydrocarbon-degrading extremely halophilic archaea from an uncontaminated hypersaline pond (Camargue, France). **Extremophiles**, v.14, p.225-231, 2010.

- TORSVIK, V., GOKSOYR, J., DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria, **Appl Environ Microbiol**, v.56, p.782-7, 1990.
- TORSVIK, V., OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Curr Opin Microbiol**, v.5, p.240-5, 2002.
- TORSVIK, V., OVREAS, L., *et al.* Prokaryotic diversity - magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, v.296, p.1064-1066, 2002.
- TURNBAUGH, P. J., GORDON, J. L. An invitation to the marriage of metagenomics and metabolomics. **Cell**, v.134, p.708-713, 2008.
- UCHIYAMA, T., MIYAZAKI, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. **Current Opinion in Biotechnology**, v.20, p.616-622, 2009.
- van BEILEN, J. B., M. G. WUBBOLTS, B. WITHOLT. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. **Biodegradation**, v.5, p.161-174, 1994.
- van BEILEN J. B., NEUENSCHWANDER M., SMITS T. H., ROTH C., BALADA S. B., WITHOLT B. Rubredoxins involved in alkane oxidation. **J Bacteriol.**, v.184, p.1722-1732, 2002.
- VOMBERG, A., and KLINNER, U. Distribution of alkB genes within n-alkane-degrading bacteria. **J Appl Microbiol**, v.89, p.339-48, 2000.
- ZHANG C., WANG S., YAN Y. Isomerization and biodegradation of beta-cypermethrin by *Pseudomonas aeruginosa* CH7 with biosurfactant production. **Bioresour Technol**, v.102, p.7139–7146, 2011.
- ZHANG, X. AND XIANG, T. Review on microbial enhanced oil recovery technology and development in China. **Int. J. Pet. Sci. Technol.**, v.4, p.61-80, 2010.
- ZEINALI, M., VOSSOUGH, M., and ARDESTANI, S. K. Characterization of a moderate thermophilic *Nocardia* species able to grow on polycyclic aromatic hydrocarbons. **Lett Appl Microbiol**, v.45, p.622-8, 2007.
- ZVYAGINTSEVA, I., BELYAEV, S., BORZENKOV, I., KOSTRIKINA, N., MILEKHINA, E., IVANOV, M. Halophilic archaeobacteria from the Kalamkass oil field. **Microbiology**, v.64, p.67-71, 1995.
- WANG, L., QIAO, N., SUN, F., and SHAO, Z. Isolation, gene detection and solvent tolerance of benzene, toluene and xylene degrading bacteria from nearshore surface water and Pacific Ocean sediment. **Extremophiles**, v.12, p.335-42, 2008.
- WATTANAPHON, H. T., KERDSIN, A., THAMMACHAROEN, C., SANGVANICH, P., VANGNAI, A. S. A biosurfactant from *Burkholderia cenocepacia* BSP3 and its enhancement of pesticide solubilization. **J Appl Microbiol**, v.105, p.416–423, 2008.

WARNECKE, F., LUGINBU, P., IVANOVA, N., GHASSEMIAN, M., RICHARDSON, T. H., *et al.* Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. **Nature**, v.450, p.560-569, 2007.

WEXLER, M., BOND, P.L., *et al.* A wide host-range metagenomic library from a waste water treatment plant yields a novel alcohol/aldehyde dehydrogenase. *Environ Microbiol*, v.7, p.1917-26, 2005.

WHITE, J. C., PARRISH, Z. D., GENT, M. P., IANNUCCI-BERGER, W., EITZER, B. D., ISLEYEN, M., MATTINA, M. I. Soil amendments, plant age, and intercropping impact p, p'-DDE bioavailability to Cucurbita pepo. **J Environ Qual.**, v.35, p.992–1000, 2006.

WHITMAN, W. B., COLEMAN, D. C., WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.95, p.6578-83, 1998.

WILLUMSEN, P. A., KARLSON, U. Screening of bacteria isolated from PHA-contaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v.7, p.415-425, 1997.

YOUSSEF, N. H., DUNCAN, K. E., NAGLE, D. P., SAVAGE, K. N., KNAPP, R. M. AND MCINERNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **J. Microbiol. Methods**, v.56, p.339-347, 2004.