

DETECÇÃO DE PROCARIOTOS REDUTORES DE SULFATO (PRS) EM AMOSTRAS AMBIENTAIS DO MANGUEZAL DE DIOGO LOPES, BACIA PETROLÍFERA POTIGUAR

Ciáxares M. Carvalho^{1*}, Sílvia R. B. de Medeiros, Lucymara F. A. Lima, Carlos A. G. Blaha²
Laboratório de Biologia Molecular e Genômica, Departamento de Biologia Celular e Genética,
Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte
*Mestrando do PPg-CB/UFRN

Av. Salgado Filho S/N, Campus Universitário, Lagoa Nova CEP 59072-917, Natal, RN, Brasil.
ciaxarescarvalho@gmail.com blaha@biocomp.ufrn.br

Os procariotos redutores de sulfato (PRS) são microrganismos relacionados a prejuízos na indústria petrolífera nas fases *upstream*, como a biodegradação do petróleo durante os processos de extração, e nas fases *downstream*, como a biocorrosão de dutos e tanques de estocagem. A BPP é a maior produtora *off-shore* no Brasil. A ocorrência e a atividade de PRS na BPP são ainda desconhecidas, mas o conhecimento dos consórcios de microrganismos associados ao petróleo é importante para a mitigação dos problemas supra-citados e pode auxiliar em estratégias de biorremediação. Este trabalho objetiva a detecção de PRS utilizando o gene *dsrB* como biomarcador molecular em amostras de sedimento coletadas no manguezal de Diogo Lopes, RN. Os experimentos de microcosmos foram não-contaminados ou contaminados com 3 % de petróleo. O DNA metagenômico (mDNA) foi extraído dos microcosmos em intervalos de 60 dias durante um ano. A análise da triagem molecular foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % e PAGE a 12 %. Os produtos de amplificação por PCR de tamanho esperado (~512 pb) foram verificados nos mDNA das amostras dos microcosmos não-contaminados nos tempos 00d, 60d e 180d e nos microcosmos contaminados nos tempos 60d, 120d e 180d, respectivamente. Este resultado sugere que os PRS estão presentes como microrganismos ubíquos no manguezal. Comunidades de PRS persistem após a contaminação por petróleo por tolerância ou propriedades petrodegradadoras desconhecidas. Este estudo é importante por que é o primeiro relato de PRS em manguezal da BPP, sendo este um passo inicial para acessar a diversidade de microrganismos relacionados à indústria de petróleo na BPP. O conhecimento sobre a microbiologia de petróleo na BPP pode auxiliar a indústria de petróleo em uma melhor administração de investimentos e também em políticas de responsabilidade sócio-ambiental.

Palavras-chave: Procariotos redutores de sulfato, Microcosmos, Manguezal, BPP, Metagenoma

1. INTRODUÇÃO

Os processos de biodegradação de hidrocarbonetos e de biocorrosão são de fundamental importância para a indústria petrolífera, uma vez que os custos relacionados a essas ocorrências resultam em grandes gastos na exploração, transporte e refino do petróleo. A Bacia Petrolífera Potiguar (BPP) compreende mais de 5000 km de dutos de óleo e gás, compondo uma enorme superfície sujeita à biocorrosão por ação microbiana, especificamente pelos consórcios formados por procariotos redutores de sulfato (PRS), denominação atual do grupo das bactérias redutoras de sulfato (BRS), incluindo arqueas e bactérias. Este mesmo grupo microbiano também está relacionado a eventos de biodegradação de petróleo e ao *souring*. Os PRS participam, portanto, de processos danosos à qualidade do petróleo, diminuindo a quantidade de hidrocarbonetos nobres que, conseqüentemente, leva ao aumento da sua densidade, acidez e viscosidade.

O estudo da biodiversidade microbiana nativa de ambientes relacionados à indústria petrolífera é de grande relevância para o melhor conhecimento dos ciclos biogeoquímicos de ambientes marinhos costeiros, como o manguezal. Esses organismos, capazes de metabolizar compostos presentes no petróleo, participam naturalmente da decomposição de metade do material orgânico do leito marinho (Tanaka *et al.*, 2002). Foti *et al.* (2007) afirmam que o conhecimento das comunidades de PRS é importante para o entendimento do ciclo do enxofre em diferentes ecossistemas. Em sedimentos marinhos costeiros, como o manguezal, a degradação de hidrocarbonetos associada à redução de sulfato parece ser o mais relevante dos diferentes processos anaeróbicos, devido ao sulfato ser abundante na água marinha estuarina e costeira (Miralles *et al.*, 2007).

Os PRS também são responsáveis pelo processo de corrosão induzida por microrganismos (MIC), onde a alteração na superfície do metal é devida à constituição de um biofilme caracterizado por ser um sistema dinâmico complexo com duas interfaces, a biológica e a metálica, em que diferentes processos de transporte e reações bioquímicas e químicas produzem metabólitos corrosivos, promovendo a decomposição química do metal (revisado por Videla e Herrera, 2005). Essa atividade relaciona-se à presença no genoma dos PRS do

operon *dsrAB*, que codifica as enzimas envolvidas no processo de respiração anaeróbica, denominado *redução desassimilatória de sulfato*, onde o íon sulfato participa comoceptor final de elétrons, cujos produtos finais do metabolismo são o gás carbônico e altas concentrações de sulfetos, entre eles o sulfeto ferroso, que promove a corrosão de superfícies metálicas de oleodutos e gasodutos (Neria-González *et al.*, 2006).

Segundo Geets *et al.* (2006), para o sucesso no desenvolvimento de estratégias de biorremediação baseadas na atividade dos PRS, é necessário o monitoramento da composição e dinâmica das comunidades microbianas. Ressalta-se, portanto, a relevância deste trabalho pioneiro na caracterização das comunidades microbianas PRS na BPP, pois o mesmo visa a geração de conhecimento da microbiota nativa, norteando o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis, além de auxiliar na perspectiva de avanços biotecnológicos mitigadores das atividades microbianas nas diversas fases *upstream* e *downstream* na indústria petrolífera.

O propósito do presente trabalho é examinar a dinâmica das comunidades nativas de PRS residentes no sedimento do manguezal de Diogo Lopes sob condições naturais, com especial atenção à resposta dessas comunidades à contaminação por petróleo em ensaios de microcosmos. A detecção desses microrganismos será realizada através de análise molecular em amostras metagenômicas utilizando o gene metabólico específico (*dsrB*). Este estudo permitirá avaliar e estabelecer métodos para a definição de padrões *background* da biodiversidade microbiana nativa na Bacia Petrolífera Potiguar.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O grande impacto ambiental em todo o mundo pelo petróleo e o grande custo nas práticas de recuperação do meio ambiente têm levado a investimentos na geração de conhecimento sobre os processos de biodegradação do petróleo e dos microrganismos detentores desses mecanismos. Por causa da sua importância para os processos de biorremediação anaeróbica, o interesse na ecologia e na diversidade dos PRS tem crescido significativamente ao longo do tempo (Miralles *et al.*, 2007). No entanto, pouco se sabe sobre a diversidade, a distribuição e as atividades *in situ* dos microrganismos associados a processos de biodegradação e biocorrosão. Pérez-Jimenez e Kerkhof (2005) descrevem a filogeografia de PRS que foram detectados em países de diversos continentes: Venezuela, Porto Rico, Estados Unidos, Látvia, Itália e Coreia do Sul. No Brasil, entre poucos trabalhos publicados sobre ocorrência e papel dos PRS nos ecossistemas, inclusive em ambientes de reservatórios petrolíferos, destaca-se o trabalho de Cravo Júnior e França (2003), que avaliaram a influência da desaeração parcial da água do mar na formação de biofilmes em superfície metálica, relacionando a atividade de procariotos aeróbicos e anaeróbicos constituintes desses biofilmes às taxas de corrosão verificadas nas estruturas.

Como revisado por Videla e Herrera (2005), ressalta-se a importância do desenvolvimento de pesquisas utilizando tecnologias, como PCR-DGGE, PCR quantitativa (QPCR) e de sondas de DNA para o avanço nos estudos de detecção e monitoramento de PRS com o intuito de diminuir os problemas de biocorrosão na indústria petrolífera ou que visem a utilização da microbiota nativa buscando mitigar as atividades microbianas prejudiciais em instalações industriais e reservatórios petrolíferos.

Os genes *dsrA* (α subunidade) e *dsrB* (β subunidade) foram estudados, por exemplo, em *Desulfovibrio vulgaris* e *Archaeoglobus fulgidus* (Dahl *et al.*, 1993 e Karkhoff-Schweizer *et al.*, 1995); em *Archaeoglobus profundus* e *Desulfotomaculum thermocisternum* (Larsen *et al.*, 1999); em *Allochromatium vinosum* (Hipp *et al.*, 1997); em *Thermodesulfohalobus norvegica* (Friedrich, 2001); em *Desulfovibrionales* e *Desulfobacteriaceae* (Foti *et al.*, 2006) e em *Desulfobacca*, *Desulfobulbus*, *Desulfoarculus*, *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfococcus* (Dar *et al.*, 2007). É importante enfatizar que todos esses trabalhos foram realizados em ambientes antropizados e/ou contaminados por resíduos petrolíferos, diferenciando-se deste que contempla uma Área de Preservação Ambiental sem histórico de contaminação por petróleo no Rio Grande do Norte.

Na BPP os únicos trabalhos de prospecção de microrganismos nativos de sedimentos e solos com capacidade para degradar petróleo são os de Santos (2006) e Pereira (2007). Destes, o primeiro realizou o estudo inicial da biodiversidade bacteriana associada ao petróleo da BPP através da técnica de PCR-DGGE, revelando uma dinâmica das comunidades microbianas indígenas em resposta ao impacto de contaminação por petróleo, sendo esta diferente daquela sem contaminação. Pereira (2007), através de técnicas moleculares (PCR-DGGE), prospectou bactérias alcanotróficas na BPP, observando também uma dinâmica na resposta das comunidades microbianas nativas à contaminação por petróleo.

3. METODOLOGIA

Uma amostra de 20 kg de sedimento foi obtida em uma área de 1 m² à profundidade de 10 cm da superfície do manguezal pertencente à Área de Proteção Ambiental na localidade de Diogo Lopes, município de Macau, Rio Grande do Norte (05°05'39" latitude sul e 36°21'33" longitude oeste), região da Bacia Petrolífera Potiguar.

Os ensaios de microcosmos foram realizados por Santos (2006), sendo utilizados 15 kg da amostra divididos em 42 microcosmos, 21 contendo solo nas condições ambientais da coleta (puro) e 21 contendo solo contaminado com 3 % de petróleo, todos em triplicata, com 250 g de solo e homogeneizados. As amostragens

dos solos dos microcosmos foram realizadas em intervalos de dois meses (tempos em dias: 00, 60, 120, 180, 240, 300 e 360).

O DNA metagenômico (mDNA) das amostras de solos puros e contaminados dos microcosmos foi extraído segundo o método descrito por Ausubel *et al.*, (1995) e/ou utilizando o *kit Fast DNA SPIN* (BIO101, Carlsbad, CA, USA).

Realizou-se busca por seqüências protéicas similares às subunidades α e β da enzima Dsr no GenBank (NCBI/USA) através do pacote BLAST (*Basic Alignment Search Tool* – NCBI/USA utilizando-se como referência as proteínas DsrAB de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. Estes dados foram selecionados através das informações taxonômicas fornecidas pelo GenBank, incluindo as ocorrências de seqüências de microrganismos cultivados e originários de amostras ambientais (metagenomas).

Na construção dos *primers* (seqüências nucleotídicas iniciadoras), para o gene *dsrB* do grupo *Desulfovibrio-Desulfomicrobium*, utilizou-se o programa *Fast PCR* (Ruslan Kalendar versão 3.8.82 para Windows) e sintetizados por *Integrated DNA Technologies*, Inc. USA. Cada amostra de mDNA obtida dos microcosmos puros e contaminados foi amplificada por PCR realizada em termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient*, utilizando-se 120 ng de mDNA, 1 μ L de $MgCl_2$ (2,5 mM), 2 μ L de tampão de PCR 10X (Biosystem), 2 μ L de *primer forward* (20 pmol), 2 μ L *primer reverse* (20 pmol), 1 μ L DNTPs e 2,5 U de Taq Polimerase (Biosystem) em volume final de 20 μ L. Os produtos de amplificação foram analisados eletroforéticamente em gel de agarose a 1,5 % e (PAGE) a 12 % e visualizados por coloração com brometo de etídeo através de transiluminador de luz UV (*Cole Parmer 97500 Series Tables*) e fotodocumentados no sistema Kodak (Kodak Edas 290 1D v3.5.4. *Scientific Imaging Systems*, New Haven, USA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O banco de dados construído, intitulado Bd-PRS, inclui dados bibliográficos e de seqüências de DNA e proteínas. Os dados obtidos de famílias e gêneros de procariotos com descrição dos genes *dsrAB* depositados no GenBank (NCBI-USA) incluem 5 famílias e 17 gêneros (Tabela 1), além de seqüências advindas de metagenomas, cuja prevalência deve-se ao fato da maioria dos procariotos não ser cultivável.

Tabela 1. Números variáveis de genes codificadores para as seqüências de proteínas DsrAB encontrados em grupos de procariotos depositadas no NCBI

GRUPOS	DsrA Nº de genes	DsrB Nº de genes
FAMÍLIAS		
<i>Desulfovibrionaceae</i>	1 – 4	1 – 3
<i>Desulfobacteraceae</i>	1 – 5	1 – 5
<i>Desulfohalobiaceae</i>	1	1
<i>Syntrophobacteraceae</i>	1 – 2	1 – 2
<i>Desulfobulbaceae</i>	1 – 2	1 – 2
<i>Peptococcaceae</i>	1 – 2	1 – 2
GÊNEROS		
<i>Desulfovibrionales</i>	1	1
<i>Desulfatibacillum</i>	1	1
<i>Desulfonatronum</i>	1	1
<i>Olavius</i>	1	1
<i>Desulfomonile</i> – <i>Desulfobacca</i>	1	1
<i>Magnetococcus</i>	1	1
<i>Halorhodospira</i> – <i>Alkalilimnicola</i>	1	1
<i>Thiobacillus</i>	3	1
<i>Magnetospirillum</i>	1	1
<i>Allochromatium</i>	1	1
<i>Moorella</i>	1	1
<i>Thermodesulfobacterium</i>	1 – 2	1 – 2
<i>Thermosinus</i>	1	1
<i>Desulfitibacter</i>	1	1
<i>Thermodesulfobium</i>	1	1
<i>Thermodesulfovibrio</i>	1	1
<i>Chlorobium</i> - <i>Pelodctyon</i> – <i>Prosthecochloris</i>	1	1
<i>Archaeoglobus</i>	1	1
METAGENOMAS (procariotos não-cultiváveis)	704	632

A triagem (*screening*) molecular de PRS utilizando o gene *dsrB* nas amostras de DNA metagenômico obtidas dos experimentos de microcosmos puros e contaminados com petróleo revelou a ocorrência de PRS nas amostras de mangue. Produtos de amplificação (PCR) do gene *dsrB* do tamanho esperado (512 pb) foram obtidos com mDNA originário dos microcosmos não contaminados somente nas amostras 00d, 60d e 180d. Os resultados obtidos com a avaliação do mDNA originário dos microcosmos contaminados revelaram produto de amplificação do gene *dsrB* apenas na amostra 00d, ambos vistos na Figura 1. As mesmas amostras, quando avaliadas através da técnica PAGE (Figura 2), permitiram a confirmação desses resultados e também a detecção de outros produtos nas amostras referentes aos dias 60, 120 e 180 de solo contaminado.

A ausência de fragmentos detectáveis nos demais tempos na análise em agarose e em PAGE dos microcosmos não contaminados pode ser causada pelo desaparecimento das comunidades de PRS devido à sucessão natural dos organismos que vivem em consórcios. Segundo Pérez-Jimenez e Kerkhof (2005), outra causa plausível para a não detecção é a ocorrência do gene *dsrB* nas amostras de mDNA em concentrações que, possivelmente, estejam abaixo do limite de detecção da técnica de PCR. Para a ausência de produtos de amplificação nos microcosmos contaminados, utilizando as mesmas técnicas, pode-se inferir que, além das causas supracitadas para os microcosmos não contaminados, a ação biocida e/ou tóxica dos constituintes do petróleo, hidrocarbonetos e/ou metais pesados, interfiram na dinâmica das comunidades de PRS.

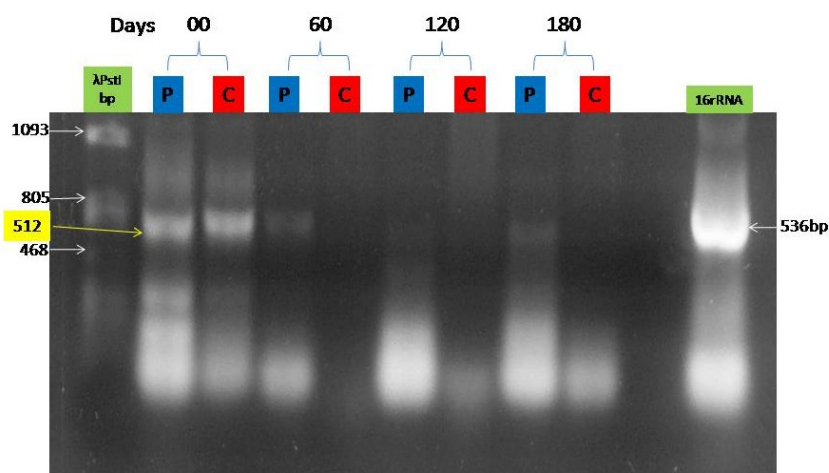


Figura1. Produtos de mDNA de microcosmos de solo de Diogo Lopes, BPP em eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, revelados com brometo de etídeo e visualizados sob transiluminador UV. Setas amarelas= amplicons para o gene *dsrB*. 00, 60, 120 e 180 são os intervalos (em dias). λPstI= marcador de peso molecular deDNA Lambda. P= **puro** e C= **contaminado**.

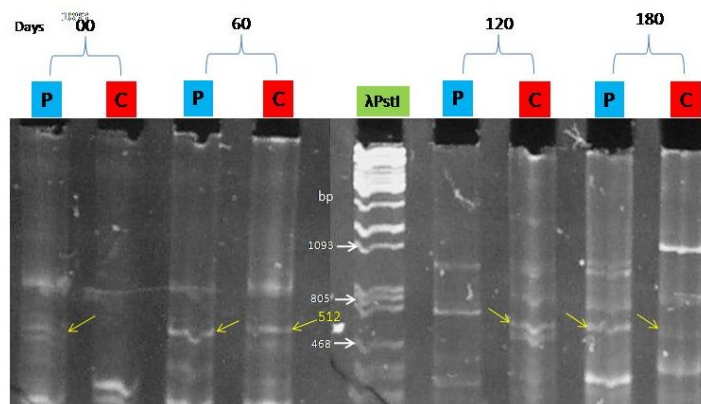


Figura 2. Amplificação por PCR com primers para o gene *dsrB* de mDNA de Diogo Lopes.em PAGE a 12 %, corada por brometo de etídeo. As setas amarelas indicam os grupos de PRS. λPstI= marcador de peso molecular. P= **puro** e C= **contaminado**. 00, 60, 120 e 180= intervalos em dias para as coletas das amostras dos microcosmos.

Pérez-Jimenez e Kerkhof (2005) utilizaram o operon *dsrAB* para detecção de grupos filogenéticos de PRS em diferentes continentes, revelando que existe maior diversidade em regiões temperadas que em regiões tropicais. Contudo, a distribuição filogeográfica varia de acordo com a região continental em que se encontram esses microrganismos. Santos (2006) utilizando o biomarcador molecular rDNA 16S observou que as comunidades microbianas nativas apresentam dinâmica diferente em resposta à contaminação por petróleo em função do tempo em diferentes ecossistemas do Rio Grande do Norte e também em fragmento de Mata Atlântica em Pernambuco. Por outro lado, Pereira (2007) detectou a ocorrência de comunidades de bactérias alcanotróficas associadas às mesmas amostras de mDNA avaliadas por Santos (2006), utilizando, no entanto, um outro gene metabólico como marcador (*alkB*), envolvido em biodegradação de n-alcanos. Este trabalho representa a continuidade da prospecção das comunidades indígenas de microrganismos potencialmente petrodegradadores localizados dentro e fora da BPP. É destacável o fato deste estudo ter sido realizado em local sem contaminação por petróleo, uma vez que as comunidades nativas de PRS presentes em um local de forte ação antropogênica contém apenas a metade das populações residentes em local preservado (Pérez-Jimenez e Kerkhof, 2005). Possivelmente, os estudos filogenéticos complementares ao presente estudo venham a revelar a composição da diversidade de PRS na BPP, gerando um conhecimento maior sobre as relações ecológicas das comunidades indígenas sujeitas a impactos ambientais por ação das atividades petrolíferas locais. Segundo Geets *et al* (2006), os estudos recentes das populações de PRS não-cultiváveis utilizando clonagem e sequenciamento de genes *dsr* amplificados por PCR mostram que este método é efetivo para estimar a diversidade e a distribuição de PRS em comunidades microbianas residentes em ecossistemas como sedimentos.

Segundo Duarte *et al* (2001), para um melhor entendimento da ecologia das comunidades microbianas residentes no solo, é necessário o conhecimento de como essas comunidades estão estruturadas sob a prevalência e as mudanças de condições ambientais. Em nosso estudo introdutório, foram obtidos dados a respeito da dinâmica das comunidades de PRS na BPP durante um ano de acompanhamento dos microcosmos, sem reposição de nutrientes, exceto água autoclavada coletada no local de amostragem. Contudo, os dados sobre a determinação da composição de hidrocarbonetos totais (THC) e Saturados, Aromáticos, Resinas, e Asfaltenos (SARA) dos microcosmos contaminados com petróleo poderão contribuir para estabelecer as relações entre as frações de hidrocarbonetos utilizadas e as flutuações na dinâmica das comunidades microbianas vistas através do perfil de PCR-DGGE.

Um exemplo dos avanços biotecnológicos voltados para a indústria petrolífera é a estratégia desenvolvida para inibir a ação dos PRS no *souring* e na MIC, a exclusão por biocompetição (BE), que consiste na adição de nutrientes que favoreçam o crescimento de populações de procariotos competidores, como as bactérias redutoras de nitrato (BRN), levando à diminuição da produção de H₂S (Videla e Herrera, 2005). As aplicações dessa técnica e de outras abordagens biotecnológicas dependem do conhecimento prévio da biodiversidade microbiana nativa de PRS na Bacia Petrolífera Potiguar.

5. CONCLUSÕES

Utilizando-se o gene *dsrB* como marcador molecular para amplificação por PCR foi realizada a bioprospecção das comunidades de PRS presentes em amostras de sedimento de manguezal da Área de Proteção Ambiental da localidade de Diogo Lopes, BPP em escala de laboratório. Os dados obtidos em experimentos de microcosmos que simulam ambientes contaminados e não contaminados por petróleo, revelam a ocorrência desses microrganismos, verificando-se que as comunidades microbianas nativas são dinâmicas na resposta à contaminação por petróleo em função do tempo.

Este trabalho, pioneiro e piloto, demonstra que através da análise molecular de um gene metabólico específico (*dsrB*), é possível detectar e examinar a dinâmica das comunidades nativas de PRS residentes em amostras ambientais sob condições de microcosmos submetidos à contaminação por petróleo. Esta abordagem experimental pode contribuir para o estabelecimento de métodos e padrões *background* da biodiversidade microbiana nativa na Bacia Petrolífera Potiguar e assim auxiliar na tomada de decisões dos gestores dos setores público e privado relacionados à indústria de petróleo e gás em prol do desenvolvimento energético sustentável.

6. AGRADECIMENTOS

Ao CT-PETRO e ao CNPq pelo auxílio financeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPg-CB/CB-UFRN).

7. REFERÊNCIAS

AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., STRHL, K. Current protocols in molecular biology. **John Wiley & Sons Inc.** 1995.

- DAHL, C., N. M. KREDICH, R. DEUTZMANN, AND H. G. TRÜPER. Dissimilatory sulfite reductase from *Archaeoglobus fulgidus*: physico-chemical properties of the enzyme and cloning, sequencing and analysis of the reductase gene. **Journal of General Microbiology**. v.139, p.1817-1828, 1993.
- DAR, S. A., YAO, L., VAN DONGEN, U., KUENEN, J. G., MUYZER, G. Analysis of Diversity and Activity of Sulfate-Reducing Bacterial Communities in Sulfidogenic Bioreactors Using 16S rRNA and *dsrB* Genes as Molecular Markers. **Applied and Environmental Microbiology**. v.73(2), p.594-604, jan 2007.
- DUARTE, G. F., ROSADO, A. S., SELDIN, L., ARAUJO, W., VAN ELSAS, J. D., Analysis of Bacterial Community Structure in Sulfurous-Oil-Containing Soils and Detection of Species Carrying Dibenzothiophene Desulfurization (*dsz*) Genes. **Applied And Environmental Microbiology**. v.67(3), p.1052-1062, mar 2001.
- FOTI, M., SOROKIN, D. Y., LOMANS, B., MUSMANN, M., ZACHAROVA, E., PIMENOV, N. V., KUENEN, G., MUYZER, G. Diversity, Activity, and Abundance of Sulfate-Reducing Bacteria in Saline and Hypersaline Soda Lakes. **Applied And Environmental Microbiology**. v.73(7), p.2093-2100, apr 2007.
- FRANÇA, F. P., CRAVO JÚNIOR, W. Efeito da desaeração parcial do fluxo aquoso em sistema dinâmico na formação de biofilmes. In 2°CONGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PETRÓLEO E GÁS, 2003, Rio de Janeiro. Anais do II-PDPETRO: ABPG, 2003.
- FRIEDRICH, M. W. Phylogenetic Analysis Reveals Multiple Lateral Transfers of Adenosine-5'-Phosphosulfate Reductase Genes among Sulfate-Reducing Microorganisms. **Journal of Bacteriology**. v.184.1, p.278-289.2001.
- GEETS, J., BORREMANS, L. D., SPRINGAEL, D., VANGROSVELD, J., VAN DER LELIE, D., VANBROEKHOVEN, K. DsrB gene-based for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. **Journal of Microbiological Methods**. v.66(2), p.194-205, 2006.
- HIPP, W. M., POTT, A. S., THUM-SCHMITZ, N., FAATH, I., DAHL, C., TRÜPER, H. G. Towards the phylogeny of APS reductases and sirohaem sulfite reductases in sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes. **Microbiology**. v.143, p.2891-2902, 1997.
- LARSEN, O., LIEN, T., BIRKELAND, N. K. Dissimilatory sulfite reductase from *Archaeoglobus profundus* and *Desulfotomaculum thermocisternum*: phylogenetic and structural implication from gene sequences. **Extremophiles**. v.3, p.63-70, 1999.
- MIRALLES, G., GROSSI, V., ACQUAVIVA, M., DURAN, R., BERTRAND, J. C., CUNY, P. Alkane biodegradation and dynamics of phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria in an anoxic coastal marine sediment artificially contaminated with oil. **Chemosphere**. Article in press, 2007.
- NAKATSU, Y., ASAHINA, H., CITTERIO, E., RADEMAKERS, S., VERMEULEN, W., KAMIUCHI, S., YEO, J., KHAW, M., SAIJO, M., KODO, N., MATSUDA, T., HOEIJMAKERS, J. H. J., TANAKA, K. XAB2, a Novel Tetratricopeptide Repeat Protein Involved in Transcription-coupled DNA Repair and Transcription. **Journal of Biological Chemistry**. v.275, p.34931-34937, 2000.
- NERIA-GONZÁLEZ, I., WANGA, E. T., RAMÍREZ, F., ROMERO, J. M., HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico. **Anaerobe**. V.12, p.122-133, 2006.
- PEREIRA, M. S. Estudos *in silico* da proteína AlkB e prospecção de bactérias alcanotróficas em solos da bacia petrolífera potiguar. Natal: UFRN/Biblioteca Central Zila Mamede, 2007. 70p.
- PÉREZ-JIMENEZ, J. R., KERKHOF, L. J. Phylogeography of sulfate-reducing bacteria among disturbed sediments, disclosed by analysis of the dissimilatory sulfite reductase genes (*dsrAB*). **Applied and Environmental Microbiology**. v.71(2), p1004-11, 2005.
- SANTOS, I. L. V. L. Estudos de populações microbianas em solos contaminados por petróleo. Natal: UFRN/Biblioteca Central Zila Mamede, 2006. 60p.
- TANAKA, Y., SOGABE, M., OKUMURA, K., KURANE, R. A highly selective direct method of detecting sulphate-reducing bacteria in crude oil. **Letters in Applied Microbiology**. v.35, p.242-246, 2002.
- VIDELA, H. A., HERRERA, L. K. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. **International Microbiology**. v.8, p.169-180, 2005.

DETECTION OF SULFATE-REDUCING PROKARYOTES (SRPs) IN ENVIRONMENTAL SAMPLES FROM THE MANGROVE OF DIOGO LOPES-RN, PETROLIFEROUS BASIN POTIGUAR (BPP)

The sulfate-reducing prokaryotes (SRPs) are microorganisms related with petroliferous industrial damages in upstream phases, like the biodegradation of oil during the extraction processes, and in downstream phases, like the biocorrosion of pipelines and storage tanks. The BPP is the greater oil *off-shore* producer in Brazil. The occurrence and the activity of SRPs in the BPP are still unknown, but the knowledge of the consortia of microorganisms associated with petroleum should be important to minimize the aforesaid problems and may help in bioremediation strategies. This work aims to detect the SRPs using the gene *dsrB* as molecular biomarker

from sediment collected in the mangrove of Diogo Lopes, RN. The microcosm's experiments were uncontaminated or contaminated with 3% of oil. The metagenomic DNA (mDNA) was extracted from the microcosms in intervals of 60 days during one year. The analyses of the molecular screening were made by electrophoresis in agarose gel (1.5%) and PAGE (12%). PCR amplicons of expected size (~512bp) were verified in the mDNA from uncontaminated microcosms samples after 00d, 60d and 180d treatments and in contaminated microcosms at times 60d, 120d and 180d, respectively. This result suggests that SRPs is present as ubiquitous bacteria on mangrove. Communities of SRPs persist after oil contamination by tolerance or petrodegrading unknown properties. This study is important because is the first report of SRPs in the mangrove of BPP and is the first step to access to the microbial diversity related with the petroleum industry on BPP. The knowledge about the petroleum microbiology in the BPP may help to petroleum industry for better administration of investments and politic on environmental and social responsibilities.

Key words: *Sulfate-reducing prokaryotes, Microcosms, Mangrove, BPP, Metagenomic*

“Os autores são os únicos responsáveis pelo conteúdo deste artigo”