



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**MILA DE OLIVEIRA HUGHES VEIGA DO ROSÁRIO**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE  
BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO DE AMOSTRAS  
DE ÁGUA PRODUZIDA EM CAMPO DE PETRÓLEO**

SALVADOR

2014

**MILA DE OLIVEIRA HUGHES VEIGA DO ROSÁRIO**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE  
BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO DE AMOSTRAS  
DE ÁGUA PRODUZIDA EM CAMPO DE PETRÓLEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida

SALVADOR

2014

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,  
SIBI - UFBA.

R789 Rosário, Mila de Oliveira Hughes Veiga do  
Isolamento e identificação molecular de bactérias  
redutoras de sulfato de amostras de água produzida em  
campo de petróleo / Mila de Oliveira Hughes Veiga do  
Rosário. – Salvador, 2014.

82 f.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da  
Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2014.

1. Bactérias. 2. Petróleo. 3. DSR. 4. rRNA 16S. 4.  
Água. I. Almeida, Paulo Fernando de. II. Universidade  
Federal da Bahia. III. Título.

CDU 561.23


**MILA DE OLIVEIRA HUGHES VEIGA DO ROSÁRIO**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE  
BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO DE AMOSTRAS  
DE ÁGUA PRODUZIDA EM CAMPO DE PETRÓLEO**


Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 14 de março de 2014.

**BANCA EXAMINADORA:**

Paulo Fernando de Almeida – Orientador   
Doutor em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas,  
UNICAMP, Brasil.  
Universidade Federal da Bahia.

Lília Ferreira de Moura Costa   
Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia,  
UFBA, Brasil.  
Universidade Federal da Bahia.

Edgard Bacic de Carvalho   
Doutor em Engenharia Química pela The Pennsylvania State University,  
PSU, Estados Unidos.  
Universidade Salvador.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por todas as oportunidades de aprendizado, crescimento pessoal e profissional que me proporcionou, pelas pessoas maravilhosas que conheci durante esta jornada e por me dar forças para a concretização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Almeida por ter possibilitado esta oportunidade profissional e pela confiança creditada a mim.

Ao Dr. Andreas Stöcker pelo auxílio e orientação nas técnicas de biologia molecular desempenhadas neste estudo.

Aos amigos do LAPI, pessoas fantásticas com as quais convivi e compartilhei todas as felicidades e os momentos angustiantes da pesquisa em processo

Ao meu namorado maravilhoso, Breno Dominguez (que tive a felicidade de conhecer também no LAPI), pelo seu apoio dentro e fora do laboratório, pelo carinho e palavras de incentivo e pelos abraços que se fizeram tão necessários diversas vezes.

Aos colegas do LABEM, em especial à Roberta Santoro, por ter me dado o respaldo mais do que necessário no processo de isolamento das BRS e “padecido” comigo na câmara de anaerobiose.

A minha mãe guerreira, Jandira Hughes, que sempre ouviu todos os meus desabafos e me deu colo cada vez que eu voltava para casa desanimada e com

medo de não conseguir superar mais um obstáculo que aparecia, me incentivando a prosseguir.

A todos os profissionais do ICS pela paciência, ajuda e apoio.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) pela bolsa concedida

A PETROBRAS/UN-BA por ter cedido as amostras de água produzida de petróleo

Rosário, Mila de Oliveira Hughes Veiga do. Isolamento e identificação molecular de bactérias redutoras de sulfato de amostras de água produzida em campo de petróleo. 82 f. 2014. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

## RESUMO

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são microrganismos responsáveis por diversos problemas em sistemas de água em campos petrolíferos, acarretando em elevados prejuízos econômicos. A identificação das BRS relacionadas com processos de biocorrosão na indústria petrolífera é de extrema importância para a implementação de estratégias de detecção, controle e monitoramento destes microrganismos, permitindo tratamentos mais eficazes. O objetivo deste trabalho foi realizar a identificação molecular de bactérias redutoras de sulfato isoladas de amostras de água produzida de um campo de petróleo situado no Recôncavo Baiano (Brasil). Foram utilizadas 20 amostras, dentre elas um microrganismo de referência da espécie *Desulfovibrio vulgaris* (ATCC 29579). A análise das sequências amplificadas por PCR da região codificante para o rRNA 16S e para a enzima sulfito redutase (DSR) demonstrou ser imprescindível e promoveu uma avaliação mais detalhada das culturas principalmente nos casos de contaminação, permitindo a identificação de três espécies de BRS pertencentes ao gênero *Desulfovibrio* (*Desulfovibrio dechloracetivorans*, *Desulfovibrio alaskensis* e *Desulfovibrio vulgaris*) e de uma bactéria redutora de enxofre *Thermovirga lienii*. O estudo contribuiu para o aumento de informações no banco de dados acerca das BRS, principalmente das sequências de DSR, fornecendo sequências da enzima sulfito redutase pertencentes às bactérias *Desulfovibrio dechloracetivorans*, e *Desulfovibrio alaskensis*, não encontradas durante a análise no *GenBank* do BLAST (NCBI).

**Palavras-chave:** Bactérias redutoras de sulfato, petróleo, DSR, rRNA 16S, reação em cadeia da polimerase

Rosário, Mila de Oliveira Hughes Veiga do. Isolation and molecular identification of sulfate-reducing bacteria from samples of produced water in the oil field. 82 f. 2014. Master Dissertation – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

## ABSTRACT

The sulfate reducing bacteria (SRB) are microorganisms responsible for several problems in oilfield water systems, resulting in high economic losses. The identification of SRB related with processes of biocorrosion in the oil industry is very important for the implementation of strategies for the detection, control and monitoring of these microorganisms, allowing for more effective treatments. The aim of this work was the molecular identification of sulfate-reducing bacteria isolated from samples of water produced from an oil field located in the Reconcavo Baiano (Brazil). Twenty samples were used, among them a reference microorganism of the species *Desulfovibrio vulgaris* (ATCC 29579). Sequence analysis of the PCR-amplified coding region for the 16S rRNA and dissimilatory sulfite reductase (DSR) genes proved to be essential and promoted a more detailed assessment of cultures especially in cases of contamination, allowing the identification of three species of SRB belonging to the genus *Desulfovibrio* (*Desulfovibrio dechloracetivorans*, *Desulfovibrio alaskensis* and *Desulfovibrio vulgaris*) and a sulfur-reducing bacteria *Thermovirga lienii*. The study contributed to the increase of information in the database about the SRB mainly for the sequences of DSR, providing sequences of the enzyme dissimilatory sulfite reductase belonging to the bacteria *Desulfovibrio dechloracetivorans* and *Desulfovibrio alaskensis*, not found during BLAST analysis in *GenBank* (NCBI).

**Keywords:** Sulfate-reducing bacteria, oil, DSR, 16S rRNA, polymerase chain reaction



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Bioquímica da redução do sulfato. (a) Duas formas de sulfato ativo podem ser produzidas: adenosina 5'-fosfosulfato (AFS) e fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (FAFS). (b) Esquema das reduções assimilativa e desassimilativa ou dissimilativa de sulfato.....18
- Figura 2** Esquema do processo de recuperação secundária do petróleo em campos *offshore*.....22
- Figura 3** Esquema de re-injeção da água produzida comumente utilizado em campos petrolíferos continentais na recuperação secundária para estender a vida útil do campo.....22
- Figura 4** Exemplos de biocorrosão grave de (a) tubos de ferro num sistema de distribuição de água potável dentro de um prédio abandonado e (b) de aço carbono empilhando em um ambiente marinho na presença de biofilmes abrigando BRS.....23
- Figura 5** Árvore filogenética baseada em sequências de RNA ribossomal 16S descritas de bactérias redutoras de sulfato.....26
- Figura 6** Representação gráfica dos genes da *dsr* e locais para amplificação por primers para *dsrAB*. Números baseados na *dsr* da *D. vulgaris*.....28
- Figura 7** Figura 7: Esquema do cultivo e isolamento das BRS.....33
- Figura 8** Figura 8: Placas contendo meio Postgate modificado e crescimento de BRS, (a) primeira placa realizada com culturas mistas de BRS das amostras de água produzida e (b) última placa referente a uma cultura pura de BRS após sucessivos procedimentos desempenhados para isolamento das colônias.....39

- Figura 9** Culturas puras de BRS em tubo de ensaio com tampa de rosca em meio Postgate modificado semi-sólido. Pode-se observar o crescimento bacteriano através da produção de sulfeto de ferro (FeS).....40
- Figura 10** Gel de agarose (concentração de 1,0%) dos amplicons da PCR para BRS com as bactérias da espécie *Desulfovibrio vulgaris* em duplicata (DV-01 e DV-02) e de uma BRS desconhecida também em duplicata (BRS-01 e BRS-02). Pré-corado com *SYBR safe*. *Primers* EUBA-01-F/UNI-1492-R. Bandas positivas evidenciando um fragmento de aproximadamente 1.500 pb. As bandas da escada padrão de tamanho de DNA são visualizadas de 100 em 100pb, sendo que banda mais forte na parte superior da escada corresponde a um fragmento de 2.000pb.....41
- Figura 11** Gel de agarose (concentração de 1,0%) dos amplicons da PCR para BRS com as amostras BA-001 a C-002. Pré-corado com *SYBR safe*. *Primers* EUBA-01-F/UNI-1492-R. Bandas positivas evidenciando um fragmento de aproximadamente 1.500 pb. As bandas da escada padrão de tamanho de DNA são visualizadas de 100 em 100pb, sendo que banda mais forte na parte superior da escada corresponde a um fragmento de 2.000pb.....42
- Figura 12** Gel de agarose (concentração de 1,0%) dos amplicons da PCR para BRS com as amostras C-003 a C-006. Pré-corado com *SYBR safe*. *Primers* EUBA-01-F/UNI-1492-R. Bandas positivas evidenciando um fragmento de aproximadamente 1.500 pb. As bandas da escada padrão de tamanho de DNA são visualizadas de 100 em 100pb, sendo que banda mais forte na parte superior da escada corresponde a um fragmento de 2.000pb.....43
- Figura 13** Cromatograma das sequências amplificadas do rRNA 16S bacteriano pelos *primers forward* e *reverse* analisadas através do programa Staden package. As barras azuis indicam a confiabilidade das bases na sequência.....44
- Figura 14** Cromatograma da sequência amplificada pelo primer EUBA-01-F (*primer forward*) do rRNA 16S bacteriano analisada manualmente através do programa Bio Edit.....45

**Figura 15** Gel de agarose (concentração de 1,0%) dos amplicons da PCR para BRS com as cepas da *Desulfovibrio vulgaris* em duplicata (DV-01 e DV-02) e de BRS desconhecida também em duplicata (BRS-01 e BRS-02). Pré-corado com SYBR safe. Primers DSR-1Fmix/DSR-4Rmix e DSR-1Fnn/DSR-4Rnn. As bandas da escada padrão de tamanho de DNA são visualizadas de 100 em 100pb, sendo que banda mais forte na parte superior da escada corresponde a um fragmento de 2.000pb.....50

**Figura 16** Gel de agarose (concentração de 1,0%) dos amplicons da PCR para BRS com as amostras BRS-01, DV-02 (cepa de referência), AV-01, AV-02, AV-03, AV-04, AV-05, AV-07, BA-01. Pré-corado com SYBR safe. Primers DSR-1Fmix/DSR-4Rmix. Bandas positivas evidenciando um fragmento de aproximadamente 1.900 pb. As bandas da escada padrão de tamanho de DNA são visualizadas de 100 em 100pb, sendo que banda mais forte na parte superior da escada corresponde a um fragmento de 2.000pb.....51

**Figura 17** Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene de rRNA 16S. A árvore foi construída pelo método de Neighbor-Joining e modelo de substituição de nucleotídeos F84, enraizada utilizando *Escherichia coli* como um grupo externo. Valores de *bootstrap* (expressas em percentagens) para 1000 repetições são mostradas.....55

**Figura 18** Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene da DSR. A árvore foi construída pelo método de Neighbor-Joining e modelo de substituição de nucleotídeos F84, enraizada utilizando *Bilophila wadsworthia* como um grupo externo. Valores de *bootstrap* (expressas em percentagens) para 1000 repetições são mostradas.....56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Substâncias do meio Postgate modificado e respectivas quantidades e concentrações.....	32
<b>Tabela 2</b>	Oligonucleotídeos iniciadores escolhidos para a amplificação do fragmento de DNA responsável pela codificação da enzima sulfito redutase.....	36
<b>Tabela 3</b>	Informações acerca das culturas puras de BRS e respectivos códigos.....	40
<b>Tabela 4</b>	Identificação das BRS e respectivas amostras através do fragmento codificante para o rRNA 16S e análise no <i>GenBank</i> do BLAST.....	46
<b>Tabela 5</b>	Espécies de BRS identificadas através da utilização dos <i>primers</i> específicos para o rRNA 16S e similaridade entre as sequências dos isolados e dos microrganismos catalogados no <i>GenBank</i> .....	46
<b>Tabela 6</b>	Amostras identificadas pelo sequenciamento do fragmento codificante para rRNA 16S escolhidas randomicamente para identificação com primers para a DSR.....	50
<b>Tabela 7</b>	Identificação das BRS e respectivas amostras através do fragmento codificante para a DSR e análise no <i>GenBank</i> do BLAST.....	52
<b>Tabela 8</b>	Espécies de BRS identificadas através da utilização dos <i>primers</i> específicos para a DSR e similaridade entre as sequências dos isolados e dos microrganismos catalogados no <i>GenBank</i> .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{L}$  – Microlitro

$\mu\text{M}$  – Micromolar

mL - Mililitro

mM – Milimolar

AFS – Adenosina fosfosulfato

AMP – Adenosina monofosfato

ATCC - American Type Culture Collection

ATP – Adenosina trifosfato

BIO EDIT – Biological Sequence Alignment Editor

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

BRS – Bactérias Redutoras de Sulfato

BSA - Bovine Serum Albumin

CIM – Corrosão Influenciada por Microrganismos

DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DNTP - Deoxynucleotide Triphosphates

DSR- Dissimilatory Sulfite Reductase

FASF – Fosfoadenosina Fosfosulfato

LABEM – Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos

LAPI – Laboratório de Pesquisa em Infectologia

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NMP– Número Mais Provável

PB – Pares de bases

PCR– Polymerase Chain Reaction

PPI– Pirofosfato

RNA– Ácido Ribonucleico

RSGP - Reverse Sample Genome Probing

SRB - Sulfate-Reducing Bacteria

THPS– Sulfato de Tetrakis(hidroximetil)fosfônio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
2.1	BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO: CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	17
2.2	IMPORTÂNCIA DA BIOSSULFETOGÊNESE E BIOCORROSÃO PROVOCADA POR BRS NA INDÚSTRIA PETROLÍFERA .....	20
2.3	UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR ( <i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i> ) NA IDENTIFICAÇÃO DE BRS .....	24
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
4.1	AMOSTRAS DE ÁGUA PRODUZIDA .....	31
4.2	CULTIVO E ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO .....	31
4.3	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO BACTERIANO .....	34
4.4	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR – <i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i> ) .....	34
4.5	SEQUENCIAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ATRAVÉS DA ANÁLISE NO <i>GENBANK</i> DO <i>BLAST</i> ( <i>NCBI</i> ) .....	37
4.6	CONSTRUÇÃO DAS ÁRVORES FILOGENÉTICAS .....	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
5.1	CULTIVO E ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO .....	39
5.2	PCR E SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO CODIFICANTE PARA RNA RIBOSSOMAL 16S .....	41
5.3	PCR E SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO CODIFICANTE PARA A ENZIMA SULFITO REDUTASE .....	49
5.4	ÁRVORES FILOGENÉTICAS .....	54
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>63</b>
	<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>72</b>
	<b>APÊNDICE B</b> .....	<b>78</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) constituem um grupo diversificado de microrganismos anaeróbicos, morfológica e filogeneticamente heterogêneos e com grande ubiquidade, que obtêm energia para seu crescimento através da oxidação de nutrientes orgânicos, com o íon sulfato sendo reduzido a sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ), através do processo denominado redução desassimilativa de sulfato.

Nas indústrias de petróleo e gás, a produção de sulfeto pelas BRS pode causar sérios problemas, como a corrosão, obstrução dos poços injetores e produtores pela deposição de  $FeS$  (sulfeto de ferro), redução da produtividade dos poços e da qualidade do petróleo produzido. Além disso, a elevada toxicidade do gás sulfídrico também representa um perigo eminente para o ambiente circundante, bem como para os trabalhadores da plataforma. As BRS possuem também a capacidade de formar biofilmes em superfícies metálicas, característica relacionada com a corrosão e o entupimento de linhas de tubulação citados e que dificulta a difusão e consequente ação de agentes antimicrobianos.

Apesar da enorme preocupação para as indústrias de petróleo em todo o mundo, os métodos atualmente aplicados para controlar a geração de gás sulfídrico não alcançaram os resultados esperados, provavelmente devido à complexidade envolvida. A aplicação de biocidas para controle da biossulfetogênese tem sido amplamente adotada, no entanto, envolve custos elevados e a eficiência alcançada é baixa podendo gerar inclusive BRS resistentes após seu uso prolongado. É de extrema importância a identificação dos microrganismos sulfetogênicos relacionados com processos de biocorrosão na indústria petrolífera com o intuito de providenciar estratégias para detecção, controle e monitoramento, o que acarretará em tratamentos mais eficazes.

O emprego de métodos moleculares na indústria petrolífera foi incorporada nas análises e identificação de microrganismos associados ao óleo e a utilização da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para amplificação e análise das sequências das regiões codificantes de rRNA 16S permitiu o agrupamento das BRS em sete linhagens filogenéticas, cinco inclusas no domínio



Bacteria e duas dentro do Archaea. Entretanto, uma abordagem mais eficaz para a detecção de BRS é o uso dos chamados genes funcionais que codificam enzimas que desempenham um papel importante na via de redução de sulfato, tal como a enzima sulfito redutase (DSR). Essa enzima participa da última etapa da redução do sulfato, catalisando sua conversão a sulfeto sendo uma enzima chave na redução desassimilativa de sulfato, cujo fragmento responsável pela sua codificação pode ser amplificado por PCR em todas as linhagens conhecidas de BRS.

Sendo assim, este trabalho visa a identificação molecular de bactérias redutoras de sulfato isoladas de amostras de água produzida de um campo de petróleo situado no Recôncavo Baiano, através da utilização de *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) desenhados e descritos na literatura para amplificar regiões codificantes para o rRNA 16S bacteriano e para a enzima sulfito redutase (DSR) usando a técnica molecular de PCR tradicional desenvolvida para obter um padrão para todos os microrganismos sulfetogênicos. Desta forma, o estudo proporcionará informações que visam dar suporte a tratamentos mais específicos e eficazes e auxiliar em pesquisas futuras, contribuindo para o aumento do banco de dados referente às bactérias sulfetogênicas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO: CONSIDERAÇÕES GERAIS

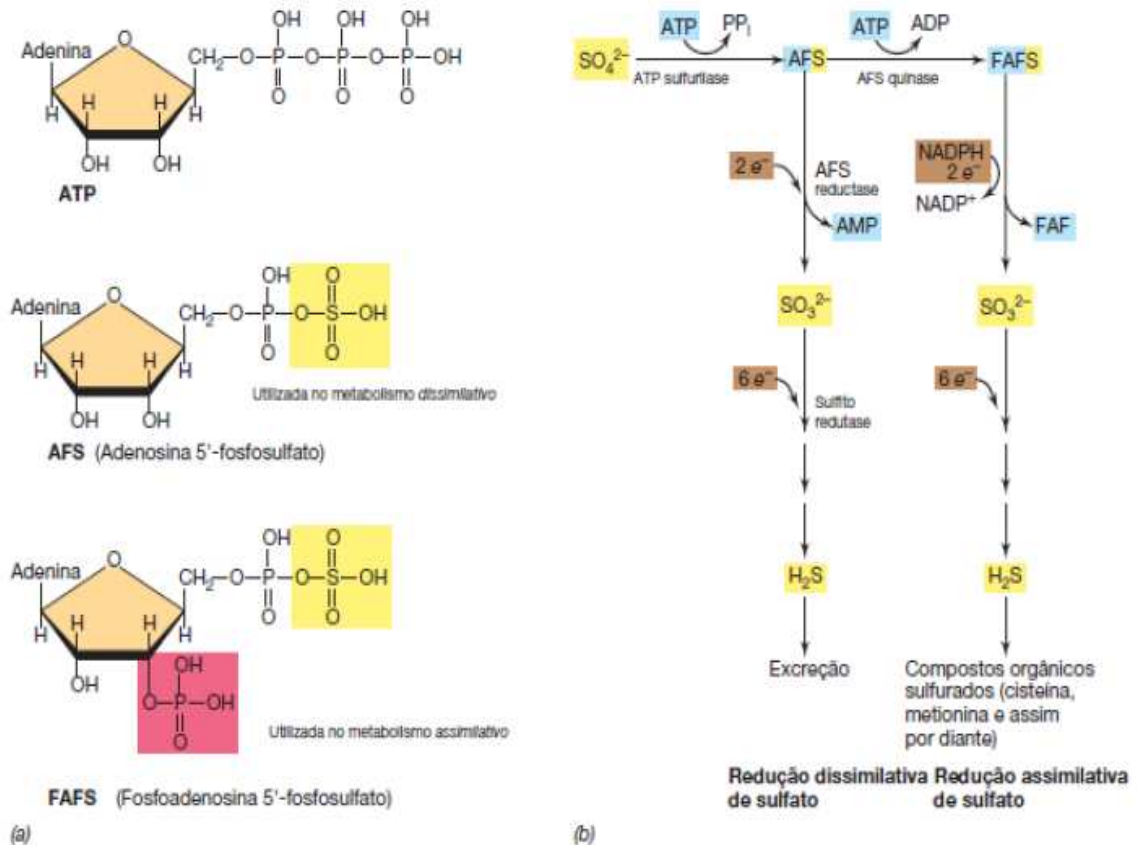
As bactérias redutoras de sulfato (BRS) constituem um grupo morfológica e filogeneticamente heterogêneo que inclui bactérias e arqueobactérias (CASTRO; WILLIAMS; OGRAM, 2000). Estes microrganismos anaeróbicos apresentam grande ubiquidade e desempenham um importante papel no ciclo do enxofre e do carbono, sendo possível encontrá-los em diversos ambientes naturais e industriais aonde o sulfato encontra-se disponível (MUYZER; STAMS, 2008), como por exemplo, em sedimentos marinhos (JORSENSEN, 1977; JORSENSEN, 1982); na rizosfera de algumas plantas (CIFUENTES et al., 2003); sedimentos de lagos de água doce, apesar da quantidade reduzida de sulfato (COOK; KELLY, 1992; SASS; CYPIONKA; BABENZIEN, 1997), em solos diversos (BISSESSAR, 2005; MILETTO; BODELIER; LAANBROEK, 2007); tratamento de águas (BEN-DOV; BRENNER; KUSHMARO, 2007); lagos permanentemente congelados na Antártida (KARR et al., 2005); na indústria petrolífera (GITTEL et al., 2009; KJELLERUP et al., 2005; MAGOT; OLLIVIER; PATEL, 2000), entre outros.

Com o intuito de obter energia para seu crescimento, as BRS realizam a redução desassimilativa de sulfato (KLEIKEMPER, 2003; POSTGATE, 1979; WIDDEL, 1988). Este grupo de procariotos fisiologicamente diferentes compartilha a habilidade de utilizar o sulfato como acceptor terminal de elétron durante o consumo da matéria orgânica com a concomitante produção de sulfeto (GILOTEAUX; GOÑI-URRIZA; DURAN, 2010). Em outras palavras, o íon atua como agente oxidante para metabolização da matéria orgânica. Nesse processo apenas uma pequena parcela do enxofre reduzido é assimilada pelos microrganismos, a maior parte é excretada na forma de íon sulfeto normalmente hidrolisado a sulfeto de hidrogênio livre (POSTGATE, 1979).

A redução do sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) a sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) é um processo complexo, uma vez que o íon sulfato é estável e não pode ser reduzido antes de estar ativado. Basicamente, numa primeira etapa, tanto para o processo assimilativo quanto para o desassimilativo, ocorre ativação dos íons sulfato por ATP (adenosina trifosfato). A enzima ATP sulfurilase catalisa a ligação do íon sulfato ao fosfato da molécula de ATP, formando adenosina fosfosulfato (AFS), com a liberação de

pirofosfato (PPi). Na redução desassimilativa, a AFS é reduzida diretamente a sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) pela ação da enzima AFS redutase, com a liberação de AMP (adenosina monofosfato). Na redução assimilativa, outro fosfato é incorporado à AFS, formando fosfoadenosina fosfosulfato (FAFS) e, só então o sulfato pode ser reduzido. Em ambos os processos, o sulfito é o primeiro produto da redução, e, uma vez formado, é transformado em sulfeto por intermédio da **enzima sulfito redutase** (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004) (Fig. 1).

Figura 1: Bioquímica da redução do sulfato. (a) Duas formas de sulfato ativo podem ser produzidas: adenosina 5'-fosfosulfato (AFS) e fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (FAFS). (b) Esquema das reduções assimilativa e desassimilativa ou dissimilativa de sulfato.



Fonte: Madigan; Martinko; Parker (2004)

O metabolismo de redução de sulfato apresenta uma enorme variedade de possíveis compostos que podem ser utilizados pelas BRS como aceptores finais de elétrons. Segundo Muyzer e Stams (2008), as bactérias redutoras de sulfato podem reduzir outros compostos de enxofre a sulfeto, como o tiosulfato, o sulfito e

o enxofre orgânico e podem reduzir o nitrato e nitrito a amônio, sendo que até mesmo a respiração de oxigênio pode ser realizada por estes procariotos. Além disso, os autores ainda citam como aceptores finais de elétrons o ferro, urânio, pertecnetato, selenato, cromato, e arsenato, no entanto nem todos esses processos de redução são acoplados ao crescimento. Os compostos orgânicos, o fumarato, o dimetilsulfóxido e sulfonatos também podem atuar como aceptores finais de elétrons.

As BRS também possuem a capacidade de utilizar vários compostos como doadores de elétrons (BARTON; TOMEI, 1995), como o gás hidrogênio, lactato, piruvato, malato, sulfonatos, alcoóis primários, succinato, benzonato, entre outros (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). Vale ressaltar que estes microrganismos possuem a capacidade de degradar dentre uma vasta gama de substratos orgânicos, substâncias do petróleo como alcanos, tolueno, benzeno e hidrocarbonetos poliaromáticos (DHILLON et al., 2003).

Os microrganismos sulfetogênicos realizam a redução de enxofre molecular, sulfito, tiosulfato e sulfato em uma ampla faixa de pH, pressão, temperatura e salinidade (ALMEIDA et al., 2006). Apesar da redução de sulfato ser inibida na presença de oxigênio, nitrato ou íons férricos e a taxa de redução de sulfatos ser limitada pela fonte de carbono, descobertas recentes (LEMOS et al., 2001) mostram que bactérias sulfetogênicas anaeróbias com sistema citocrômico são também capazes de crescer na presença de oxigênio, complicando ainda mais o controle desses microrganismos.

A maioria das BRS apresenta um crescimento ótimo entre 25 e 40°C, sendo classificadas desta forma como mesófilas. Entretanto algumas espécies toleram temperaturas de até -5°C (psicrofílicas) ou possuem crescimento em temperaturas superiores a 75°C (hipertermofílicas) (SOUSA, 2009). Todas as características evidenciadas comprovam a habilidade desse grupo de procariotos de adaptação aos ambientes mais variados, inclusive com capacidade de proliferação em condições extremas como as citadas anteriormente.

Considerando as condições de crescimento das BRS, não é surpreendente que estas bactérias possam encontrar um ambiente adequado em sistemas de água de campos petrolíferos, se os compostos orgânicos degradáveis e sulfato estão presentes (CORD-RUWISCH; KLEINITZ; WIDDEL, 1987). Cabe ressaltar que a origem microbiológica de sulfeto em campos de petróleo tem sido

reconhecida por mais de 75 anos (KJELLERUP et al., 2005) e as bactérias redutoras de sulfato já são apontadas como sendo responsáveis pela produção de  $H_2S$ , dentro de reservatórios ou instalações, o que acarreta na redução da qualidade do óleo, corrosão de material de aço e ameaça a saúde dos trabalhadores, devido à sua elevada toxicidade (CORD-RUWISCH; KLEINITZ; WIDDEL, 1987). Tendo em vista seus efeitos deletérios, as BRS são o grupo bacteriano mais comumente estudado em águas de campo de petróleo (MAGOT; OLLIVIER; PATEL, 2000).

## **2.2 IMPORTÂNCIA DA BIOSULFETOGENESE E BIOCORROSÃO PROVOCADA POR BRS NA INDÚSTRIA PETROLÍFERA**

Existem três processos relacionados com a extração do petróleo: recuperação primária, correspondente à recuperação amparada pela pressão natural no interior da jazida que possibilita a saída do óleo e gás do reservatório para a superfície; recuperação secundária, que consiste na injeção de água ou gás com o intuito de manter a pressão interna do reservatório e melhorar a recuperação no momento em que a produção primária torna-se ineficiente pelo declínio de pressão; e métodos especiais de recuperação, que são diversas tecnologias para aumento do fator de recuperação do petróleo (OLLIVIER; MAGOT, 2005).

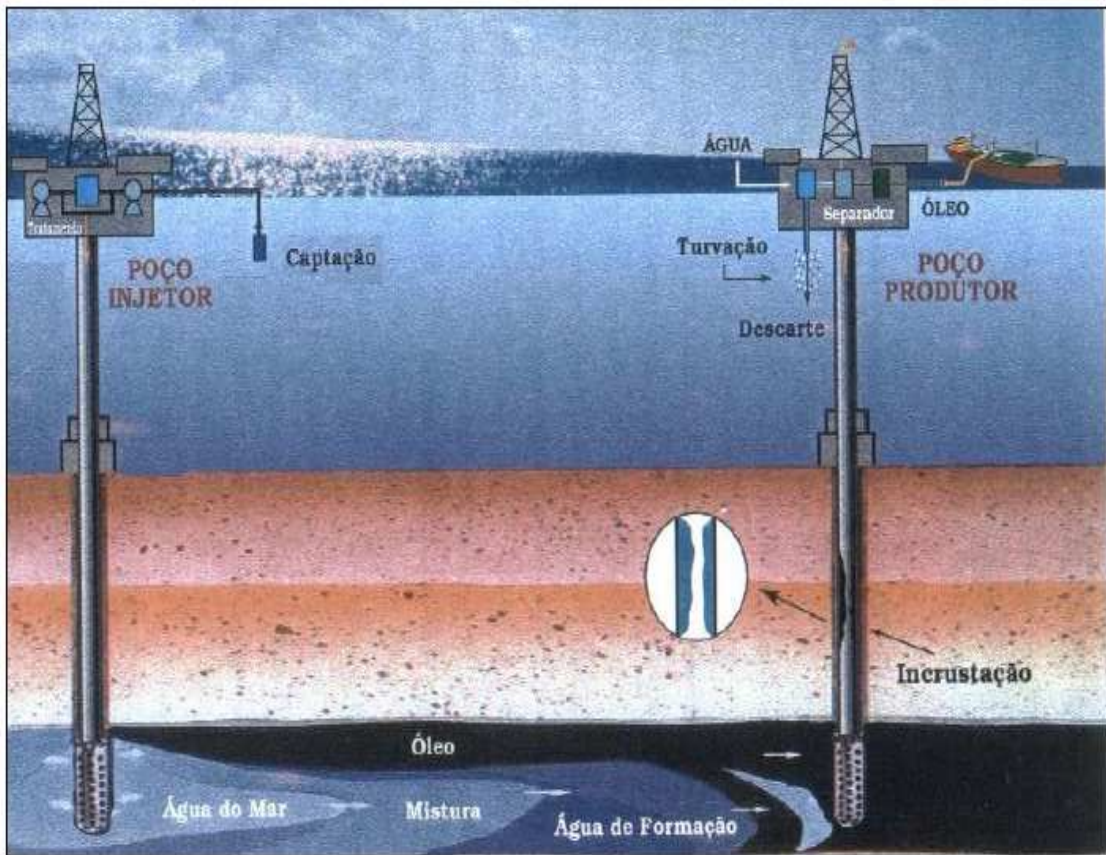
Nas indústrias de gás e petróleo, as BRS vêm de microbiota autóctone ou pela introdução através de diversas operações de produção de petróleo. Fontes de contaminação do reservatório por microrganismos sulfetogênicos existem graças à lama natural do reservatório que vem da rocha sedimentar adjacente devido a falhas ou como um resultado da sua introdução durante as operações de perfuração e pelas técnicas de recuperação secundária do petróleo (ALMEIDA et al., 2006).

As consequências econômicas das bactérias redutoras de sulfato são diversas e geralmente desvantajosas. Sua presença tem implicado na deterioração do petróleo armazenado além da corrosão anaeróbica de ferro e de aço. As atividades desses microrganismos em equipamentos de campos petrolíferos e reservatórios de petróleo durante muitos anos têm sido consideradas como uma fonte de perda econômica considerável (EDEN; LAYCOCK; FIELDER, 1993). A produção de  $H_2S$  biogênico frequentemente indica a atividade e a presença das

BRS, sendo esse composto considerado o principal fator na atividade corrosiva desses microrganismos (LEÃO, 2009).

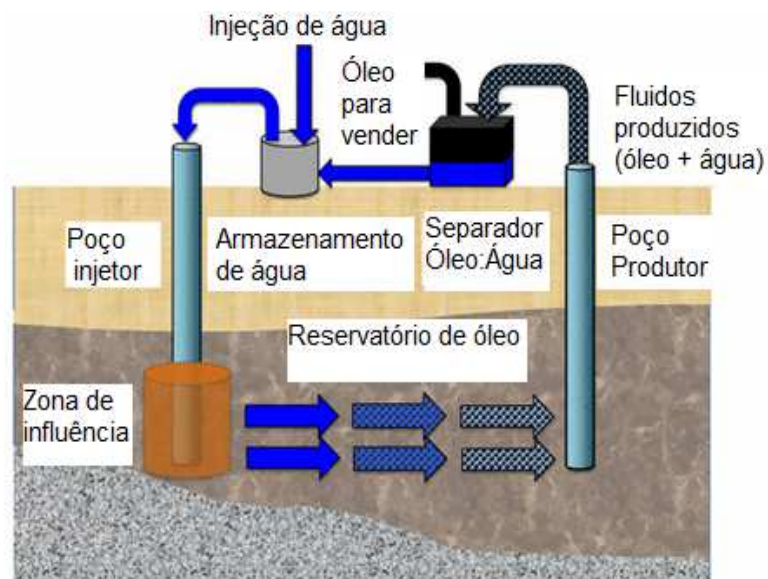
O sulfeto originado graças à atividade microbiana durante a produção do petróleo torna-se um problema devido ao *souring* ou acidificação biogênica (SOUSA, 2009), que consiste no aumento da massa de sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) por unidade de massa total de fluidos produzidos (EDEN; LAYCOCK; FIELDER, 1993). Atualmente já se é aceito que a redução de sulfato por BRS é um dos mecanismos mais importantes de produção de  $H_2S$  no *souring* de reservatórios. Ocasionalmente, este fenômeno pode ocorrer durante a recuperação primária, em que o óleo é produzido sob a pressão do reservatório (AGRAWAL; LAL, 2009). Entretanto a acidificação biogênica é mais comumente associada aos processos de recuperação secundária do petróleo, que frequentemente envolve a injeção de água, seja ela água do mar (operações *offshore*) (Fig. 2) ou outro tipo de água (operações *onshore*) (Fig. 3) com o intuito de re-pressurizar o reservatório após a pressão natural diminuir durante o processo de recuperação primária e provocar a varredura do óleo para os poços de produção, prolongando a vida útil do campo petrolífero. As BRS que habitam ecossistemas petrolíferos sejam elas indígenas ou introduzidas, podem facilmente utilizar o sulfato disponível acarretando no aumento das concentrações de sulfeto (GIEG; JACK; FOGHT, 2011). Além disso, a intensificação do *souring* também está intimamente relacionada à reinjeção da água produzida durante o processo de produção de petróleo, já que esta contém nutrientes necessários para a proliferação de bactérias redutoras de sulfato, além de reintroduzir micro-organismos previamente adaptados às condições do reservatório (SOUSA; CAMMAROTA; SÉRVULO, 2010).

Figura 2: Esquema do processo de recuperação secundária do petróleo em campos *offshore*.



Fonte: Sousa (2009)

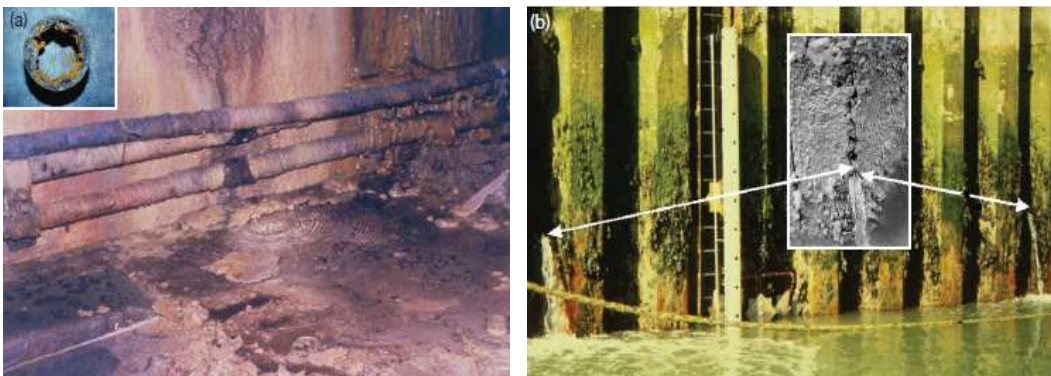
Figura 3: Esquema de re-injeção da água produzida comumente utilizado em campos petrolíferos continentais na recuperação secundária para estender a vida útil do campo.



Fonte: Adaptado de Gieg; Jack; Foght (2011)

As BRS também possuem a capacidade de formar biofilmes nas superfícies metálicas da indústria de petróleo (LÓPEZ-JIMENEZ et al., 2011). O crescimento microbiano associado a superfícies, por exemplo, a formação de um biofilme, pode estimular o desenvolvimento da bioincrustação (*biofouling*), já que promove reações físico-químicas não favorecidas em condições abióticas, conduzindo à deterioração do material (BEECH, 2003). No caso de materiais metálicos, estas alterações nas características do material, devidas a um biofilme ou a uma capa de bioincrustação, denominam-se biocorrosão ou Corrosão Influenciada por Microrganismos (CIM) (BEECH; SUNNER; HIRAOKA, 2005). De fato, as Bactérias Redutoras de Sulfato são os principais microrganismos envolvidos na CIM na indústria de óleo e gás (ALMEIDA et al., 2006) e entre os microrganismos relacionados com a biocorrosão são apontadas como o grupo responsável pelos casos mais graves, sendo os principais culpados pela biocorrosão de materiais de ferro e aço usados na indústria (Fig. 4) (CORTEZ, 2009). A corrosão mediada por bactérias redutoras de sulfato pode ser atribuída especialmente aos três fatores seguintes: formação de biofilmes e produção de substâncias poliméricas extracelulares; produção de metabolitos corrosivos como o sulfeto de hidrogênio; e despolarização catódica (JAN-ROBLERO et al., 2004). Cabe ressaltar que biofilmes são verdadeiros conglomerados que dificultam a difusão e ação de agentes antimicrobianos (ALMEIDA et al., 2006).

Figura 4: Exemplos de biocorrosão grave de (a) tubos de ferro num sistema de distribuição de água potável dentro de um prédio abandonado e (b) de aço carbono empilhando em um ambiente marinho na presença de biofilmes abrigando BRS.



Fonte: Beech (2003)



As BRS, portanto, estão relacionadas com prejuízos na indústria do petróleo e os processos relacionados com a biodegradação de hidrocarbonetos e de biocorrosão são de extrema importância para esta indústria, uma vez que os custos provenientes destes eventos ocasionam gastos exacerbados na exploração, transporte e refino do petróleo (CARVALHO et al., 2007). Muitos esforços e despesas têm sido gerados com o intuito de controlar a biosulfetogênese, e apesar da preocupação das indústrias do óleo mundiais, os métodos aplicados não resultaram no efeito desejado provavelmente devido à complexidade envolvida (ALMEIDA et al., 2006). A utilização de biocidas não oxidantes tais como glutaraldeído, diaminas, sulfato de tetrakis(hidroximetil)fosfônio (THPS), têm sido utilizados para reduzir a atividade microbiana em instalações de produção de petróleo. A eficácia destes tratamentos, entretanto, depende das condições do reservatório, como a temperatura, a permeabilidade, e da química da água. Além disso, casos de resistência a biocidas não oxidantes após o uso prolongado têm sido relatados. Cabe ressaltar que os biocidas também podem representar riscos para os trabalhadores e para o ambiente (KJELLERUP et al., 2005) e sua aplicação envolve custos elevados além da eficiência alcançada ser baixa (SOUSA; CAMMAROTA; SÉRVULO, 2010).

A produção intensiva de gás sulfídrico em reservatórios de petróleo tem incentivado a investigação científica (SOUSA, 2009). É importante para o controle científico da biosulfetogênese o conhecimento prévio de todos os microrganismos sulfetogênicos encontrados nas águas dos campos petrolíferos (ALMEIDA et al., 2006). Devido ao grande impacto econômico na indústria petrolífera ocasionado pelas BRS, esforços consideráveis têm sido realizados nos últimos anos com o intuito de desenvolver métodos rápidos para a detecção e identificação destes microrganismos em ambientes industriais (CORTEZ, 2009).

### **2.3 UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*) NA IDENTIFICAÇÃO DE BRS**

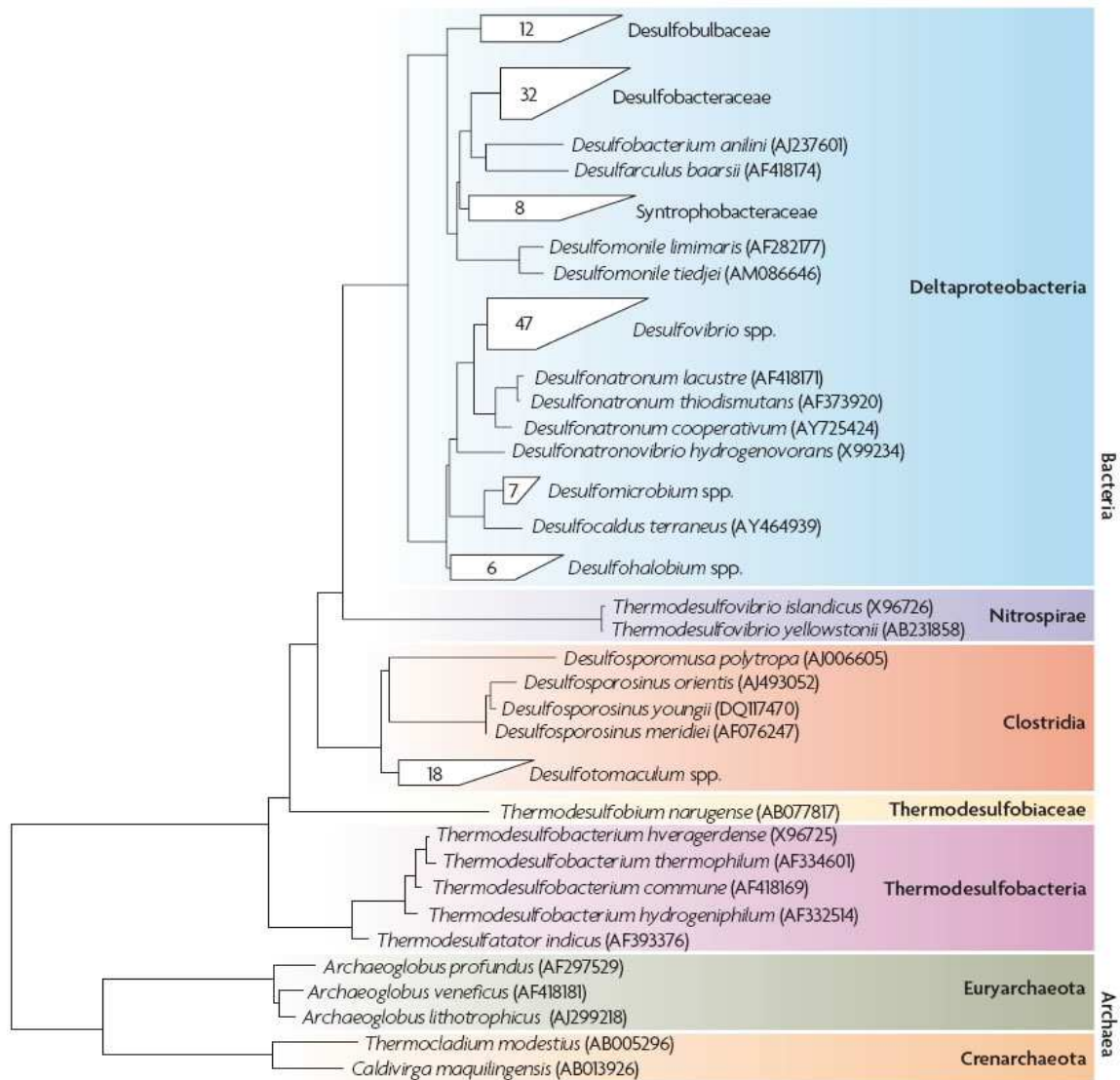
O desenvolvimento atual da análise molecular acarretou na superação de muitas limitações e o desenho e emprego de sondas e *primers* (oligonucleotídeos

iniciadores) cuidadosamente avaliados trouxeram um valor na identificação bacteriana de comunidades microbianas complexas (CORTEZ, 2009).

A utilização de métodos moleculares na microbiologia do petróleo foi incorporada em análises de microrganismos associados ao óleo (ORPHAN et al., 2000). Técnicas que se baseiam na análise de DNA e RNA bacterianos auxiliam a abordagem microbiológica convencional e são rotineiramente utilizadas com o intuito de determinar a presença e distribuição de espécies bacterianas individuais, compreendendo as BRS, em comunidades complexas como aquelas em biofilmes bacterianos (SANTEGOEDS et al., 1998)

Pesquisas que utilizam tecnologias como PCR, DGGE, PCR quantitativa e de sondas de DNA tem se mostrado promissoras nos estudos de detecção e monitoramento de bactérias como as BRS na Corrosão Influenciada por Microrganismos (CIM) (VIDELA; HERRERA, 2005). Atualmente está disponível um grande banco de dados da sequência do gene rRNA 16S de microrganismos graças ao progresso da ecologia microbiana e avanços em técnicas moleculares (VIDELA; HERRERA, 2005). O desenvolvimento e uso de técnicas na amplificação de sequências do gene rRNA 16S proporciona métodos para caracterizar comunidades de BRS (PHELPS; KERKHOF; YOUNG, 1998; MIRALLES et al., 2007). A amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e análise das sequências das regiões codificantes de rRNA 16S fornece o quadro mais geral para estudos de diversidade microbiana natural e abundância (DHILLON et al., 2003). A análise destas sequências permitiu o agrupamento das BRS em sete linhagens filogenéticas, cinco subdivisões pertencentes ao domínio *Bacteria* (Deltaproteobacteria, Nitrospirae, Clostridia, Thermodesulfobiaceae e Thermodesulfobacteria), além de 2 subdivisões pertencentes ao domínio *Archaea* (Euryarchaeota e Crenarchaeota) (Fig.5) (MUYZER; STAMS, 2008).

Figura 5: Árvore filogenética baseada em sequências de RNA ribossomal 16S descritas de bactérias redutoras de sulfato.



Fonte: Modificado de Muyzer e Stams (2008)

No entanto, a análise baseada apenas no gene rRNA 16S não oferece uma conexão para a fisiologia ou capacidades metabólicas da bactéria, particularmente em linhagens filogenéticas recém descobertas sem isolados em cultura e fenótipos conhecidos (DHILLON et al., 2003). Com isso uma alternativa é o uso de genes que codificam enzimas importantes na respiração desassimilativa do sulfato e que estão presentes em todas as BRS, como por exemplo, a enzima sulfito redutase. Esta abordagem permite o conhecimento da diversidade das BRS e também as descobertas de novas linhagens filogenéticas. (RAMPINELLI, 2007). A

redução de sulfato a H<sub>2</sub>S ocorre por meio de algumas etapas envolvendo a transferência de oito elétrons (OLLIVIER; MAGOT, 2005; LEÃO, 2009) e a enzima sulfito redutase desassimilativa é uma enzima chave na redução desassimilativa de sulfato, uma etapa essencial no processo respiratório anaeróbico com sulfato (DHILLON et al., 2003). Essa enzima participa da última etapa da redução do sulfato, que após sofrer redução a sulfito por outras enzimas, sua conversão em sulfeto é catalisada pela enzima sulfito redutase (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). A enzima sulfito redutase possui subunidades que contém em sua estrutura um grupo siroheme e centros prostéticos [Fe<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>] e consiste de pelo ao menos dois diferentes polipeptídeos em uma estrutura  $\alpha_2\beta_2$  (GILOTEAUX; GOÑI-URRIZA; DURAN, 2010).

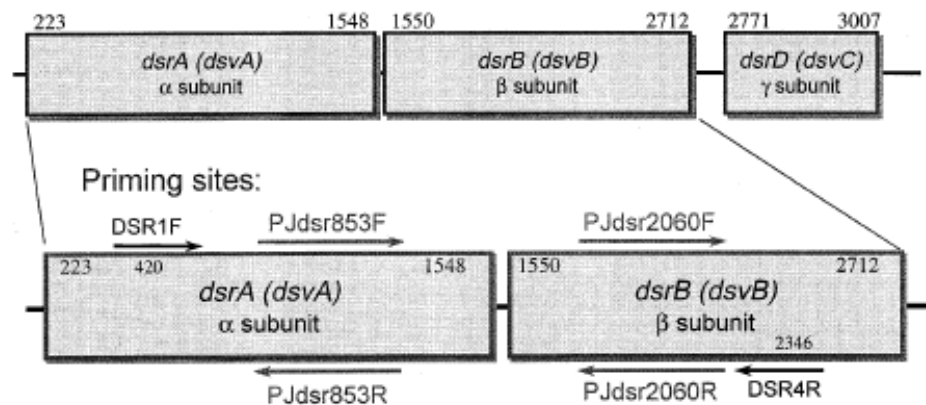
A região de 1,9 Kb dos genes do DNA que codifica as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da sulfito redutase (*drsAB*), segundo os estudos até o momento, é encontrada somente em microrganismos capazes de fazer redução desassimilativa do sulfato. A comparação das sequências de aminoácidos do gene *drsAB* mostra um alto grau de conservação, permitindo a construção de oligonucleotídeos específicos para síntese *in vitro* de DNA utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) (WAGNER et al., 1998). A ubiquidade e a elevada conservação da DSR tornaram esta enzima ideal para acessar a biodiversidade de BRS em ambientes anóxicos (GILOTEAUX; GOÑI-URRIZA; DURAN, 2010).

O emprego de técnicas moleculares em amostras ambientais baseadas no gene da enzima sulfito redutase pode auxiliar na detecção de procariotos redutores de sulfato em comunidades microbianas complexas e na avaliação do potencial para a produção biológica de sulfeto *in situ* através da respiração anaeróbica de sulfato por BRS. De fato, a análise de sequência de genes desta enzima foi usada com sucesso para detectar BRS em habitats complexos (NAKAGAWA; FUKUI, 2003).

A utilização de oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificação do fragmento responsável pela codificação da enzima sulfito redutase (*dsrAB*) (Fig. 6) permitiu a caracterização molecular de cepas de BRS de culturas puras e consórcios bacterianos obtidos de sedimentos contaminados por petróleo. O estudo além de fornecer novas sequências para a DSR possibilitou a avaliação da estrutura, atividade e dinâmica de bactérias redutoras

de sulfato em processos anaeróbicos biodegradativos (PÉREZ-JIMÉNEZ; YOUNG; KERKHOF; 2001). Estudos utilizando a análise simultânea das regiões amplificadas por PCR referentes aos genes da enzima sulfito redutase (*dsrAB*) e rRNA 16S do sedimento contaminado por hidrocarbonetos do petróleo da bacia de Guaymas (Golfo da Califórnia) revelou um novo grupo de bactérias redutoras de sulfato que não foram identificadas pelo sequenciamento do rRNA 16S (DHILLON et al.; 2003), demonstrando a importância da utilização de genes funcionais no acesso e conseqüentemente na identificação desses microrganismos sulfetogênicos.

Figura 6: Representação gráfica dos genes da DSR e locais para amplificação por primers para *dsrAB*. Números baseados na DSR da *D. vulgaris*.



Fonte: Pérez-Jiménez; Young; Kerkhof (2001)

As técnicas moleculares têm colaborado expressivamente para pesquisas envolvendo comunidades bacterianas, proporcionando métodos rápidos e com elevada sensibilidade e precisão para analisar tais microrganismos e seus respectivos genes, permitindo, desta forma, uma caracterização das comunidades de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos e suas referentes adaptações celulares e fisiológicas à presença dos poluentes, além dos mecanismos de acesso e captação das substâncias pelas células microbianas. Além disso, contribui para o crescimento dos bancos de dados, oferecendo confiabilidade aos pesquisadores em afirmar que uma determinada espécie encontra-se na comunidade pesquisada (WETLER-TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2011). No Brasil, até o momento, são poucos os estudos que determinam as fontes atuais de sulfeto de hidrogênio, os tipos microbianos responsáveis por sua produção e os processos metabólicos

envolvidos na sulfetogênese (ALMEIDA et al., 2006). Desta forma, a utilização de técnicas moleculares como a PCR e sua padronização e aperfeiçoamento tem se mostrado imprescindível na identificação e consequente realização de estudos acerca das bactérias redutoras de sulfato (BRS) em amostras de águas da indústria petrolífera, contribuindo expressivamente para um maior conhecimento acerca desses microrganismos e no aumento do banco de dados referente aos mesmos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e identificar através de ferramentas da biologia molecular bactérias redutoras de sulfato provenientes de amostras de água produzida em campo petrolífero.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolar as BRS das amostras de água produzida coletadas através da técnica de cultivo utilizando o meio de cultura Postgate modificado (obtenção de culturas puras);
2. Utilizar *primers* desenhados e descritos na literatura para amplificar regiões codificantes para o rRNA 16S bacteriano e para o gene da enzima sulfito redutase (DSR) usando a técnica de PCR para as BRS isoladas;
3. Sequenciar geneticamente as amostras positivas e identificar as BRS através de análise no *GenBank* do BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do *NCBI* (National Center for Biotechnology Information).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 AMOSTRAS DE ÁGUA PRODUZIDA**

Foram coletadas amostras de água produzida do poço BA-A e das estações Alvorada e Camboatá, localizados em um campo petrolífero situado no Recôncavo Baiano. As amostras foram transportadas em temperatura ambiente para o LABEM (Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos), localizado no Instituto de Ciências da Saúde, UFBA, em recipientes adequados.

### **4.2 CULTIVO E ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO**

Um volume de 100µL das amostras de água produzida transportadas, contendo cerca de  $10^6$  NMP/mL foi inoculado e enriquecido em meio Postgate modificado dentro da câmara de anaerobiose (Bactron VI, Shellab, Sheldon Manufacturing Inc.) em tubos de ensaio com tampa de rosca, sendo posteriormente incubados a 38°C na estufa da própria câmara de anaerobiose. Vale ressaltar que a estufa mencionada foi a única utilizada durante todo o procedimento de cultivo e isolamento das BRS. O meio Postgate modificado no qual lactato de sódio é utilizado como fonte potencial de carbono e doador de elétron, contém (por litro) os reagentes demonstrados na tabela 1. Para meio sólido foi adicionado 1,5% de agar (15g para 1 litro), para meio semi-sólido foi adicionado 0,15% de agar (1,5g para 1 litro). Todos os componentes foram dissolvidos em água destilada e o pH foi ajustado para 7,5-8,0 utilizando as soluções de hidróxido de sódio (NaOH) e/ou ácido clorídrico (HCl). A solução foi homogeneizada por agitação e posteriormente esterilizada a 121°C por 30 minutos.



Tabela 1 - Substâncias do meio Postgate modificado e respectivas quantidades e concentrações

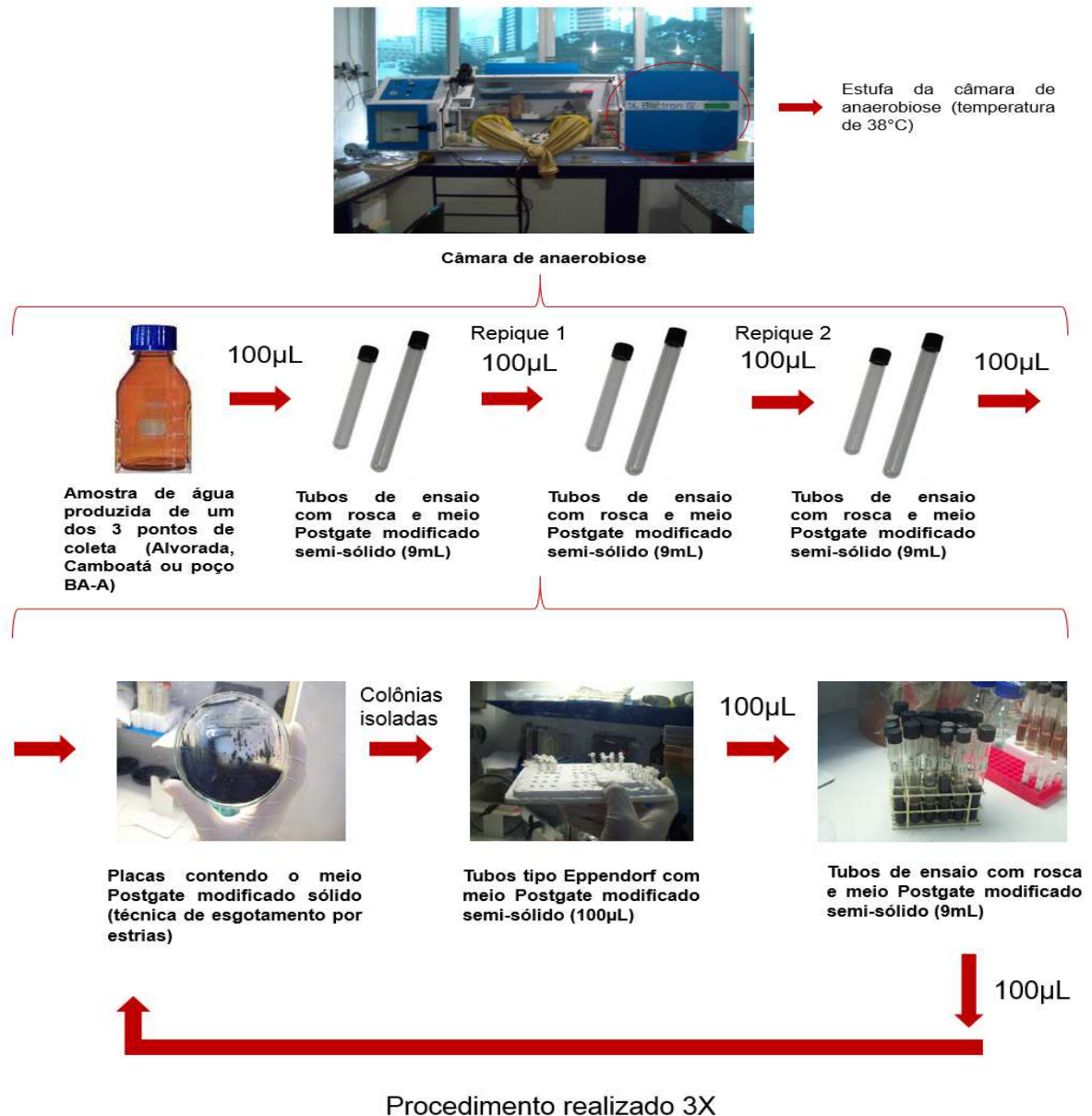
<b>Substâncias</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Concentração</b>
Cloreto de Sódio (NaCl)	15g	1,5%
Fosfato de pótássio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,5g	0,05%
Cloreto de amônio (NH <sub>4</sub> Cl)	1,0g	0,1%
Sulfato de sódio (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1.0g	0,1%
Cloreto de cálcio (CaCl <sub>2</sub> )	1,0g	0,1%
Cloreto de Magnésio hexahidratado (MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	1,83g	0,183%
Extrato de levedura	1,0g	0,1%
Ácido ascórbico	0,1g	0,01%
Tioglicolato de sódio	0,0129g	0,0013%
Citrato de sódio	6,38g	0,638%
Lactato de sódio	1,75mL	0,175%
Resazurina 0,025% (p/v)	4mL	0,4%
Sulfato ferroso heptahidratado (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0,5g	0,05%

Fonte: Elaborado pela autora (2013)

Foram realizados dois repiques transferindo para tubos de ensaio com tampa de rosca contendo meio Postgate semi-sólido um volume de 100µL das culturas em cada repique. Os tubos foram incubados na estufa a 38°C para crescimento bacteriano. O crescimento era evidenciado através da produção de sulfeto de ferro (FeS), que deixava o meio de cor naturalmente rosa totalmente enegrecido. Posteriormente ao segundo repique e ao crescimento em meio semi-sólido, 100µL de cada cultura foi retirado e distribuído através da técnica de esgotamento por estrias em placas contendo o meio Postgate modificado sólido. As placas foram alocadas na estufa a 38°C para crescimento bacteriano. As colônias visivelmente isoladas de cada placa foram transferidas para tubos tipo Eppendorf contendo 100µL de meio Postgate semi-sólido previamente identificados com o local a qual a placa se referia (BA-A, Camboatá ou Alvorada) e um número de série para controle da identificação e incubados na estufa a 38°C. Após o crescimento das colônias nos tubos tipo Eppendorf, o volume foi transferido para tubos de ensaio com tampa de rosca com meio Postgate semi-sólido com a mesma identificação e incubados na estufa a 38°C para crescimento. As culturas foram plaqueadas

novamente utilizando a técnica de esgotamento por estrias e incubadas na estufa para crescimento. Este procedimento foi realizado três vezes ao todo com o intuito de obter culturas puras. Todas as amostras e os procedimentos de cultivo em tubos de ensaio/placa (Fig. 7) foram realizados em duplicata.

Figura 7: Esquema do cultivo e isolamento das BRS



A estufa da câmara de anaerobiose (38°C) foi utilizada para incubar os tubos de ensaio/placas durante o processo de cultivo e isolamento para crescimento das BRS

Ao final do isolamento foram obtidas 18 amostras ao todo em duplicata. Além das amostras isoladas, foram reativadas em meios propícios na câmara de anaerobiose dois microrganismos pertencentes à coleção de culturas bacterianas do LABEM: uma bactéria de referência da espécie *Desulfovibrio vulgaris* (ATCC 29579) foi utilizada como controle positivo para os testes moleculares, reativada em meio *Desulfovibrio* (DSMZ-Medium 63) e uma bactéria desconhecida pertencente ao grupo das BRS isolada de água produzida do mesmo campo petrolífero em meio Postgate modificado.

#### **4.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO BACTERIANO**

A partir desta etapa da metodologia o estudo foi conduzido no LAPI (Laboratório de Pesquisa em Infectologia), situado no Hospital Universitário Professor Edgard Santos. Os tubos de ensaio com tampa de rosca com as culturas puras de BRS e com as duas culturas das bactérias cedidas pelo LABEM foram submetidos a lavagens com *Tween* 80 e soro fisiológico com o intuito de retirar qualquer substância possivelmente inibidora de PCR. Os pellets (pequenas partículas tipicamente criadas por compressão de um material original) bacterianos foram então armazenados em tubos tipo Eppendorf no freezer -80°C até o momento da extração. As extrações foram realizadas com o kit da Mo Bio (Kit UltraClean Microbial DNA Isolation – Mo Bio) de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR – POLYMERASE CHAIN REACTION)**

Para a amplificação dos fragmentos alvos, os protocolos de PCR contendo os reagentes e ciclo térmico sofreram modificações e os *primers* foram

avaliados até o desenvolvimento de uma reação eficaz. Foram realizados testes moleculares para padronizar as reações com o material genômico extraído da bactéria de referência (*Desulfovibrio vulgaris*) e da bactéria desconhecida pertencente ao grupo das BRS pertencentes à coleção de culturas bacteriana do LABEM.

Após a padronização dos protocolos de PCR, os produtos obtidos pela extração de DNA das amostras foram amplificados por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) que ocorreram na presença dos *primers* Euba-01-F: 5'-GAGTTTGMTCTGGCTCA -3' e Uni-1492-R: 5'-GGYTACCTTGTTACGACTT -3', desenhados para amplificação do rRNA 16S bacteriano (REYSENBACH; LONGNECKER; KIRSHTHEIN, 2000). Os primers liofilizados foram solubilizados e diluídos utilizando a solução de TE 1x para uma concentração final de 10 µM (concentração de uso na PCR). As condições e reagentes para a amplificação por reação foram: H<sub>2</sub>O livre de RNase, PCR Buffer, sem Mg (10x) (*Invitrogen*), BSA (1mg/ml), dNTPs (4 x 2,5 mM), MgCl<sub>2</sub> (50 mM), *Primers* (10 µM), *Platinum Taq Polymerase* (5U/µl) e o *DNA-Template*. As reações foram incubadas em um termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf), e o programa de amplificação consistiu das seguintes etapas: 2 minutos a 94°C (desnaturação inicial e ativação da enzima); 40 ciclos de 20 segundos a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 61°C (anelamento dos primers) e 1 minuto a 72°C (extensão); 4 minutos a 72° C (extensão final). Os resultados das amplificações foram analisados em gel de agarose (concentração 1%) em TAE 1x (Tris, Ácido acético glacial, EDTA) corados com *SybrSafe DNA gel stain* (*Invitrogen*) e visualizados em um transiluminador de luz azul. No gel foi utilizada uma escada padrão de tamanho de DNA (marcador molecular) como referência e as bandas dos produtos de PCR das amostras puderam ser visualizadas, sendo os mesmos posteriormente purificados com o PureLink® PCR Purification Kit (*Invitrogen*). O processo de purificação tem como objetivo a remoção rápida e eficiente de *primers* soltos, dNTPs (desoxinucleotídeos trifosfato), enzimas, produtos de PCR falhos e curtos, e sais de produtos de PCR. Os produtos de PCR foram então enviados para procedimento de sequenciamento.

Para a amplificação do fragmento de DNA responsável pela codificação da enzima sulfito redutase, foram selecionados os *primers forward*: DSR-1F, DSR-1Fa, DSR-1Fb e os *primers reverse*: DSR-4R, DSR-4Ra, DSR-4Rb, DSR-4Rc

apontados na tabela 2 (BISSEAR, 2005). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores foram submetidas a uma busca no *GenBank* do BLAST (*NCBI*), com o objetivo de avaliar sequências previamente depositadas pertencentes ao fragmento alvo e garantir, dessa forma, a identificação de microrganismos sulfetogênicos com os *primers* escolhidos. As sequências obtidas através da busca individual dos *primers* no BLAST foram avaliadas e alinhadas através do programa Bio Edit (Biological Sequence Alignment Editor) e suas respectivas frequências foram obtidas através do programa NoteTab para que não houvessem fragmentos de bases repetidos na análise e na comparação com os *primers*. Através desta avaliação foi possível encontrar quatro novos *primers*: DSR-1F n1, DSR-1F n2, DSR-4R n1, DSR-4R n2 (tabela 2). Um par de primers degenerados (normalmente chamados assim se em alguma das suas posições existem outras bases possíveis) também foi desenhado tendo como base os *primers* retirados da literatura (BISSEAR, 2005): DSR-1F-all e DSR-4R-all, também incluídos na tabela a seguir:

Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores escolhidos para a amplificação do fragmento de DNA responsável pela codificação da enzima sulfito redutase

<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>
DSR-1F	5´-ACS CAC TGG AAG CAC G-3´
DSR-1Fa	5´-ACC CAY TGG AAA CAC G-3´
DSR-1Fb	5´-GGC CAC TGG AAG CAC G-3´
DSR-4R	5´-GTG TAG CAG TTA CCG CA-3´
DSR-4Ra	5´-GTG TAA CAG TTT CCA CA-3´
DSR-4Rb	5´-GTG TAA CAG TTA CCG CA-3´
DSR-4Rc	5´-GTG TAG CAG TTT CCG CA-3´
DSR-1F n1	5´-ACG CAC TGG AAG CTC G-3´
DSR-1F n2	5´-ACA CAC TGG AAG CAC G-3´
DSR-4R n1	5´-GTG TAG CAG TCA CCG CA-3´
DSR-4R n2	5´-GTG TAG CAG TGA CCG CA-3´
DSR-1F-all	5´-RSS CAY TGG AAR CAC G-3´
DSR-4R-all	5´-GTG TAR CAG TTY CCR CA-3´

Fonte: Elaborado pela autora (2013)

Os *primers* obtidos através da literatura foram utilizados segundo a metodologia do autor de referência: um mix com os *primers forward* (DSR-1F, DSR-1Fa, DSR-1Fb) com concentração final de 10  $\mu$ M e um mix com os *primers reverse* (DSR-4R, DSR-4Ra, DSR-4Rb, DSR-4Rc) com concentração final de 10  $\mu$ M. Os *primers* foram solubilizados utilizando a solução de TE 1X.

A PCR final possuía as seguintes condições e reagentes para a amplificação por reação: H<sub>2</sub>O livre de RNase, PCR Buffer, sem Mg (10x) (*Invitrogen*), BSA (1mg/ml), dNTPs (4 x 2,5 mM), MgCl<sub>2</sub> (50 mM), *Primers mix* (10  $\mu$ M), *Platinum Taq Polymerase* (5U/ $\mu$ l) e o *DNA-Template*. As reações foram incubadas em um termociclador *Mastercycler gradient* (eppendorf), e o programa de amplificação consistiu das seguintes etapas: 2 minutos a 94°C (desnaturação inicial e ativação da enzima); 35 ciclos de 20 segundos a 94°C (desnaturação), 40 segundos a 59°C (anelamento dos *primers*) e 2 minutos a 72°C (extensão); 5 minutos a 72°C (extensão final). Os resultados das amplificações foram analisados em gel de agarose (concentração 1%) em TAE 1x (Tris, Ácido acético glacial, EDTA) corados com *SybrSafe DNA gel stain* (*Invitrogen*) e visualizados em um transiluminador de luz UV. No gel foi utilizada uma escada padrão de tamanho de DNA (marcador molecular) como referência e as bandas dos produtos de PCR das amostras puderam ser visualizadas, sendo os mesmos posteriormente purificados com o PureLink® PCR Purification Kit (*Invitrogen*) e enviados para procedimento de sequenciamento.

#### **4.5 SEQUENCIAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ATRAVÉS DA ANÁLISE NO GENBANK DO BLAST (NCBI)**

O sequenciamento foi realizado em um ABI Prism 3730 DNA analyzer, utilizando o kit Big Dye Terminate na empresa StarSEQ (Mainz, Alemanha). Para isso, os amplicons (produtos de PCR) purificados foram pipetados em uma placa com os *primers forward* e *reverse* (1 $\mu$ L de *primer* para 6 $\mu$ L de amplicon) utilizados na PCR. Os resultados do sequenciamento foram recebidos em arquivos ABI e

correspondiam às fitas singulares 3'-5' e 5'- 3' de cada bactéria. Os fragmentos obtidos foram então manipulados e analisados tanto automaticamente utilizando o programa Staden package quanto manualmente através do programa Bio Edit (Biological Sequence Alignment Editor). Cabe ressaltar que todos os programas citados na metodologia são gratuitos e disponibilizados na internet. As sequências consenso resultantes de cada bactéria após a manipulação realizada foram comparadas às depositadas no *GenBank* do BLAST (*NCBI*), determinando o seu nível de similaridade com fragmentos de bases de vários isolados bacterianos, o que possibilitou a identificação das espécies de BRS.

#### **4.6 CONSTRUÇÃO DAS ÁRVORES FILOGENÉTICAS**

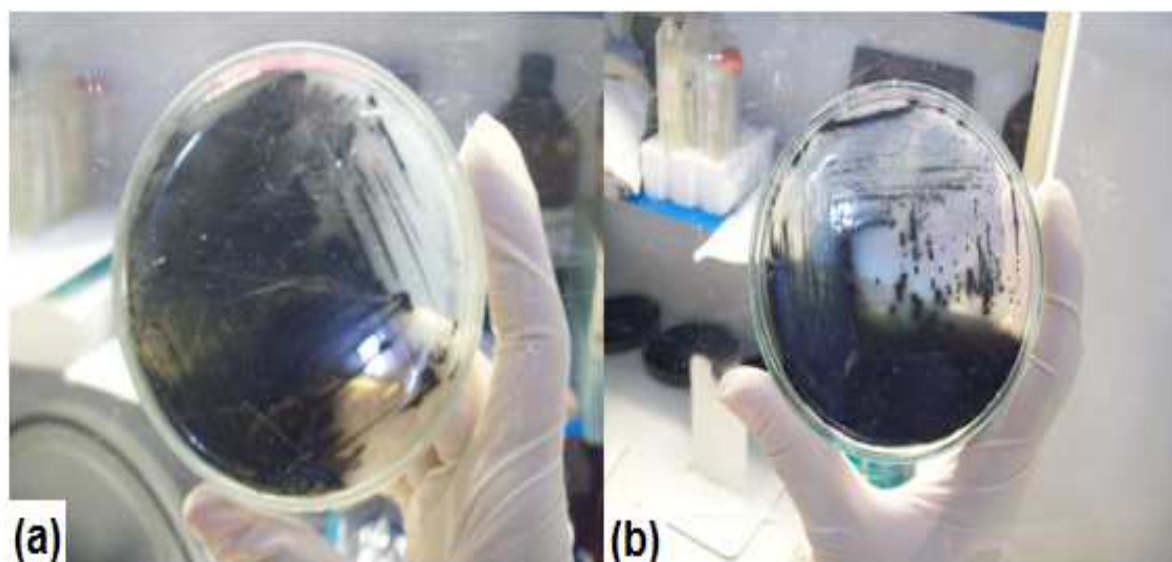
As sequências obtidas foram alinhadas através do programa ClustalX2 (LARKIN et al., 2007) juntamente com sequências previamente publicadas no *GenBank* (*NCBI*). O alinhamento gerado pelo ClustalX2 foi avaliado pelo programa BioEdit e editado através do programa GeneDoc (NICHOLAS, K. B; NICHOLAS, H. B; DEERFIELD, 1997). Foram então originadas árvores utilizando o método Neighbor-Joining e modelo de substituição de nucleotídeos F84 (KISHINO; HASEGAWA, 1989; FELSENSTEIN; CHURCHILL, 1996) através do programa Phylip (Phylogeny Inference Package) versão 3.695 (FELSENSTEIN, 2013), análise de *bootstrap* com 1000 réplicas. Todos os programas citados são gratuitos e estão disponíveis na internet.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CULTIVO E ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO

Ao realizar o cultivo das BRS, o resultado foi positivo para a proliferação bacteriana, sendo evidenciada através da produção de sulfeto de ferro, que acarretava no enegrecimento do meio de cultura de cor naturalmente rosa. Após um período entre 48 e 72 horas de incubação na estufa a 38°C, o crescimento bacteriano podia ser observado em meio de cultura semi-sólido e na placa, entretanto algumas placas necessitaram um tempo maior de incubação na estufa e apresentaram crescimento após 96 horas. Posteriormente a repetição do método para isolamento das BRS, placas com colônias mais isoladas foram obtidas (Fig. 8).

Figura 8: Placas contendo meio Postgate modificado e crescimento de BRS, **(a)** primeira placa realizada com culturas mistas de BRS das amostras de água produzida e **(b)** última placa referente a uma cultura pura de BRS após sucessivos procedimentos desempenhados para isolamento das colônias.

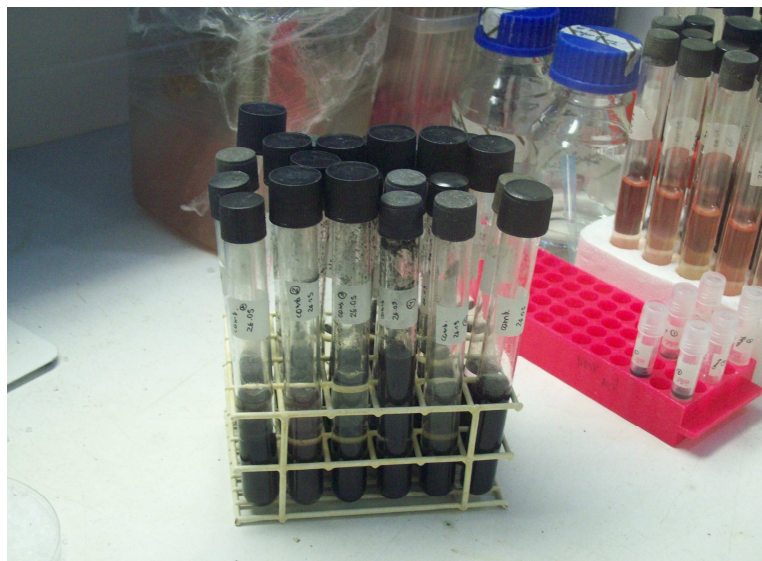


Fonte: Acervo pessoal da autora (2013)



Ao final do isolamento as culturas foram inoculadas em meio Postgate modificado semi-sólido em tubos de ensaio com tampa de rosca (Fig. 9). Ao todo foram obtidas 18 amostras de culturas puras em duplicata conforme a tabela 3.

Figura 9: Culturas puras de BRS em tubo de ensaio com tampa de rosca em meio Postgate modificado semi-sólido. Pode-se observar o crescimento bacteriano através da produção de sulfeto de ferro (FeS).



Fonte: Acervo pessoal da autora (2013)

Tabela 3 – Informações acerca das culturas puras de BRS e respectivos códigos

<b>Local da coleta:</b>	<b>Código:</b>
<b>Estação Camboatá</b>	<b>C-001, C-002, C-003, C-004, C-005, C-006</b>
<b>Poço BA-A</b>	<b>BA-001, BA-002, BA-003, BA-004</b>
<b>Estação Alvorada</b>	<b>AV-001, AV-002, AV-003, AV-004, AV-005, AV-006, AV -007, AV -008</b>

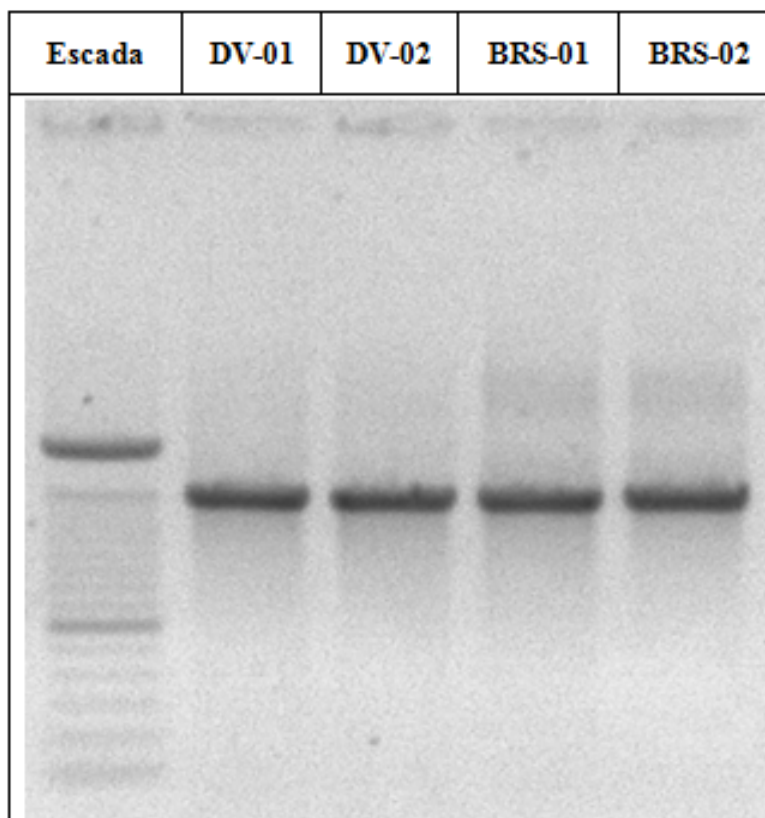
Fonte: Elaborado pela autora (2013)

Juntamente com as culturas puras de BRS obtidas, foram reativadas com sucesso as duas bactérias (em duplicata) previamente cultivadas e armazenadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ , pertencentes à coleção de cultura bacteriana do LABEM: uma bactéria de referência de *Desulfovibrio vulgaris* (ATCC 29579), e uma bactéria desconhecida pertencente ao grupo das BRS isolada do mesmo campo.

## 5.2 PCR E SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO CODIFICANTE PARA RNA RIBOSSOMAL 16S

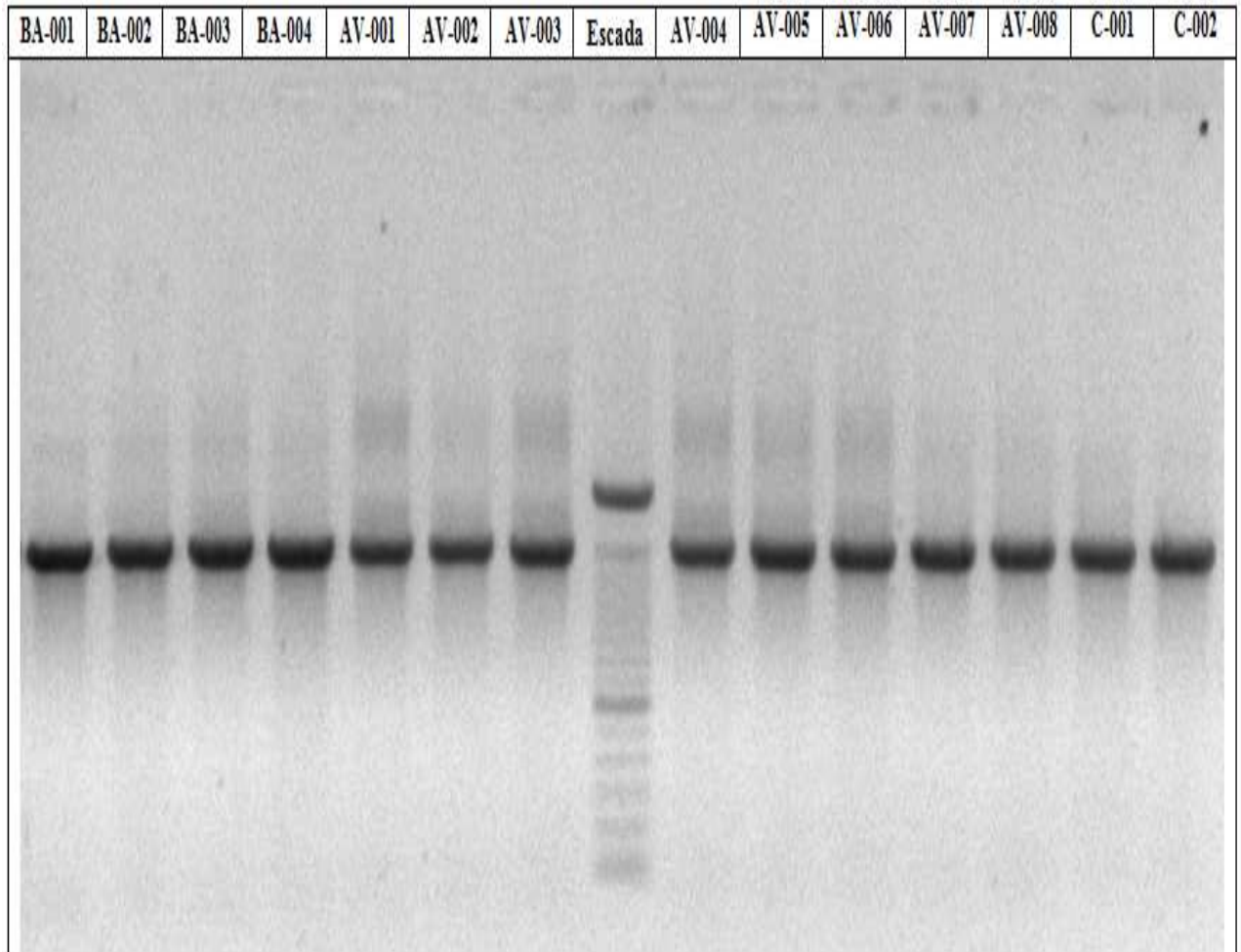
A amplificação do fragmento codificante para rRNA 16S forneceu resultados positivos como pode ser observado nas figuras a seguir dos géis de agarose, onde notam-se bandas correspondentes a um fragmento de aproximadamente 1500 pb comparados com a escada padrão de tamanho de DNA (marcador molecular) (Fig. 10, Fig. 11 e Fig. 12).

Figura 10: Gel de agarose (concentração de 1,0%) dos amplicons da PCR para BRS com as bactérias da espécie *Desulfovibrio vulgaris* em duplicata (DV-01 e DV-02) e de uma BRS desconhecida também em duplicata (BRS-01 e BRS-02). Pré-corado com SYBR safe. Primers EUBA-01-F/UNI-1492-R. Bandas positivas evidenciando um fragmento de aproximadamente 1.500 pb. As bandas da escada padrão de tamanho de DNA são visualizadas de 100 em 100pb, sendo que banda mais forte na parte superior da escada corresponde a um fragmento de 2.000pb.



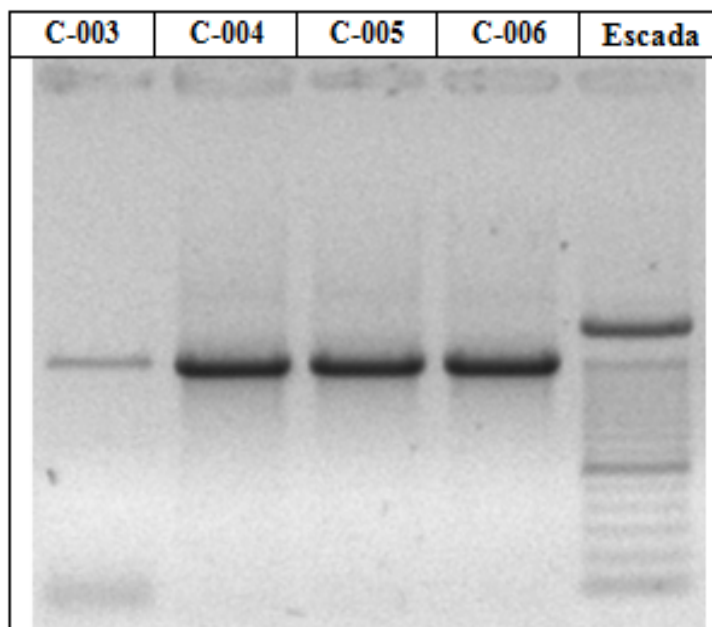
Fonte: Acervo pessoal da autora (2013)

Figura 11: Gel de agarose (concentração de 1,0%) dos amplicons da PCR para BRS com as amostras BA-001 a C-002. Pré-corado com *SYBR safe*. *Primers* EUBA-01-F/UNI-1492-R. Bandas positivas evidenciando um fragmento de aproximadamente 1.500 pb. As bandas da escada padrão de tamanho de DNA são visualizadas de 100 em 100pb, sendo que banda mais forte na parte superior da escada corresponde a um fragmento de 2.000pb



Fonte: Acervo pessoal da autora (2013)

Figura 12: Gel de agarose (concentração de 1,0%) dos amplicons da PCR para BRS com as amostras C-003 a C-006. Pré-corado com SYBR safe. Primers EUBA-01-F/UNI-1492-R. Bandas positivas evidenciando um fragmento de aproximadamente 1.500 pb. As bandas da escada padrão de tamanho de DNA são visualizadas de 100 em 100pb, sendo que banda mais forte na parte superior da escada corresponde a um fragmento de 2.000pb.



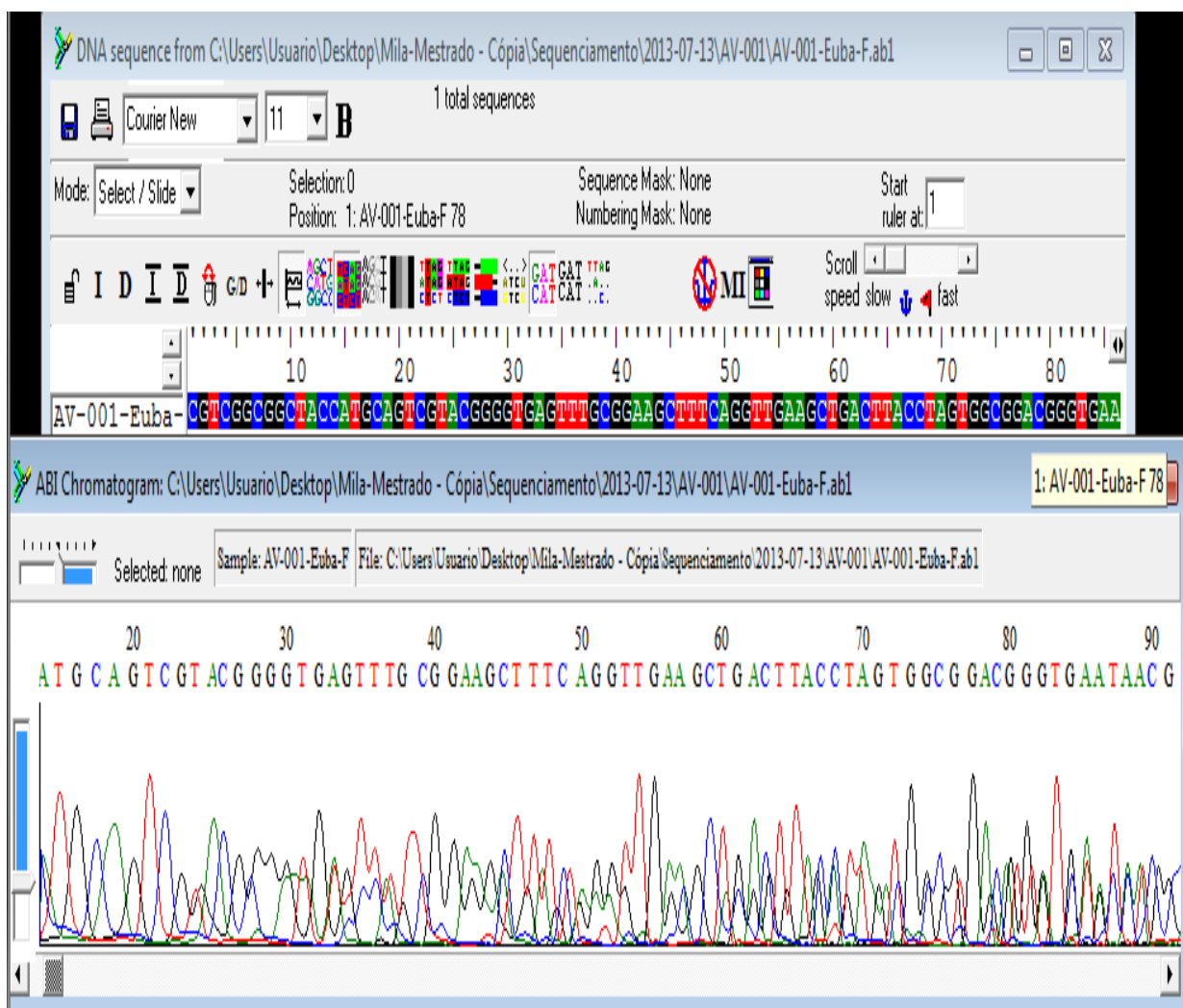
Fonte: Acervo pessoal da autora (2013)

De posse destes dados, os *amplicons* foram purificados e encaminhados para sequenciamento em uma placa contendo em cada poço um dos *primers* (*forward* ou *reverse*) e os *amplicons* das amostras.

Os resultados do sequenciamento foram recebidos em arquivos ABI e correspondiam a fitas singulares (fitas 3'-5' e 5'-3') de cada bactéria iniciadas pelo *primer forward* ou *primer reverse*, alinhadas automaticamente com o programa Staden package, sendo gerada também uma sequência consenso. A avaliação do cromatograma das sequências foi realizada, demonstrando a confiabilidade das bases após o sequenciamento, sendo descartadas as regiões com fragmentos contendo bases de identificação incertas que são muito comuns nas extremidades das cadeias de DNA sequenciadas devido à perda de sinal (Fig. 13). Após a análise e manipulação das sequências pelo Staden package, a fita consenso foi importada para o Bio Edit, e as bases foram avaliadas novamente de forma manual para ter uma segurança de que o programa automático não realizou nenhum incidente (Fig.14). As sequências consenso resultantes serviram como base de consulta para o *GenBank*, aonde foram observados os seguintes aspectos: a cobertura de



Figura 14: Cromatograma da sequência amplificada pelo primer EUBA-01-F (*primer forward*) do rRNA 16S bacteriano analisada manualmente através do programa Bio Edit.



Fonte: Acervo pessoal da autora (2013)

Os resultados do sequenciamento foram: 10 amostras identificadas como *Desulfovibrio dechloracetivorans*; 2 amostras identificadas como *Desulfovibrio alaskensis*; 2 amostras identificadas como *Thermovirga lienii*; 5 amostras não foram identificadas; além da bactéria de referência da espécie *Desulfovibrio vulgaris*, apontados na tabela a seguir (tabela 4). As sequências obtidas encontram-se no Apêndice A. Os isolados, segundo o *GenBank*, apresentaram grande similaridade com alguns grupos já depositados, como pode ser observado na tabela 5. Cabe ressaltar que sequências de bactérias não cultivadas ou sem relevância para identificação das BRS não foram consideradas nas análises, entretanto encontram-se na tabela.

Tabela 4 – Identificação das BRS e respectivas amostras através do fragmento codificante para o rRNA 16S e análise no *GenBank* do BLAST

Identificação	Amostras
<i>Desulfovibrio dechloracetivorans</i>	BA-001, BA-002, BA-003, BA-004, C-001, C-002, C-003, C-004, C-005, C-006
<i>Desulfovibrio alaskensis</i>	AV -007 e AV -008
<i>Thermovirga lienii</i>	AV-005 e AV-006
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	DV-02
Não identificada	AV-001, AV-002, AV-003, AV-004 e BRS-01

Fonte: Elaborado pela autora (2013)

Tabela 5- Espécies de BRS identificadas através da utilização dos *primers* específicos para o rRNA 16S e similaridade entre as sequências dos isolados e dos microrganismos catalogados no *GenBank*

Amostra:	Catalogado no GenBank:	Código	Query cover	E value	Ident
<b>AV-005</b>	-Uncultured <i>Thermovirga</i> sp. clone NRB28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HM041945.1</a>	99%	0.0	99%
	- <i>Thermovirga lienii</i> DSM 17291 strain Cas60314 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb DQ0	<a href="#">NR_043522.1</a>	100%	0.0	99%
	- <i>Thermovirga lienii</i> DSM 17291 strain DSM 17291 16S ribosomal RNA, complete sequence	<a href="#">NR_074606.1</a>	99%	0.0	99%
<b>AV-006</b>	-Uncultured <i>Thermovirga</i> sp. clone NRB28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HM041945.1</a>	99%	0.0	99%
	- <i>Thermovirga lienii</i> DSM 17291 strain Cas60314 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb DQ0	<a href="#">NR_043522.1</a>	100%	0.0	99%
	- <i>Thermovirga lienii</i> DSM 17291 strain DSM 17291 16S ribosomal RNA, complete sequence	<a href="#">NR_074606.1</a>	99%	0.0	99%
<b>AV -007</b>	-Bacterium enrichment culture clone ecb5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HQ395199.1</a>	100%	0.0	99%
	- <i>Desulfovibrio alaskensis</i> strain HEB223 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">DQ867001.1</a>	100%	0.0	99%
	- <i>Desulfovibrio alaskensis</i> strain Jlac 16S ribosomal	<a href="#">DQ517281.1</a>	100%	0.0	99%

	RNA gene, partial sequence				
<b>AV-008</b>	-Bacterium enrichment culture clone ecb5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HQ395199.1</a>	99%	0.0	99%
			99%	0.0	99%
	-Desulfovibrio alaskensis strain HEB223 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">DQ867001.1</a>			
	-Desulfovibrio alaskensis strain Jlac 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">DQ517281.1</a>	99%	0.0	99%
<b>BA-001</b>	-Desulfovibrio dechloracetivorans gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Mic42c03	<a href="#">AB546253.1</a>	99%	0.0	99%
	-Desulfovibrio dechloracetivorans gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Mic13c06	<a href="#">AB546251.1</a>	99%	0.0	99%
	-Desulfovibrio sp. BerOC5 partial 16 rRNA gene, strain BerOC5	<a href="#">HE797785.1</a>	99%	0.0	99%
<b>BA-002</b>	-Desulfovibrio dechloracetivorans gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Mic42c03	<a href="#">AB546253.1</a>	100%	0.0	99%
	-Desulfovibrio dechloracetivorans gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Mic13c06	<a href="#">AB546251.1</a>	100%	0.0	99%
	-Desulfovibrio sp. BerOC5 partial 16 rRNA gene, strain BerOC5	<a href="#">HE797785.1</a>	99%	0.0	99%
<b>BA-003</b>	-Desulfovibrio dechloracetivorans gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Mic42c03	<a href="#">AB546253.1</a>	99%	0.0	99%
	-Desulfovibrio dechloracetivorans gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Mic13c06	<a href="#">AB546251.1</a>	99%	0.0	99%
	-Desulfovibrio sp. BerOC5 partial 16 rRNA gene, strain BerOC5	<a href="#">HE797785.1</a>	99%	0.0	99%
<b>BA-004</b>	-Desulfovibrio dechloracetivorans gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Mic42c03	<a href="#">AB546253.1</a>	99%	0.0	99%
	-Desulfovibrio dechloracetivorans gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Mic13c06	<a href="#">AB546251.1</a>	99%	0.0	99%
	-Desulfovibrio sp. BerOC5 partial 16 rRNA gene, strain BerOC5	<a href="#">HE797785.1</a>	99%	0.0	99%
<b>C-001</b>	-Desulfovibrio dechloracetivorans gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Mic42c03	<a href="#">AB546253.1</a>	99%	0.0	99%
	-Desulfovibrio dechloracetivorans gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Mic13c06	<a href="#">AB546251.1</a>	99%	0.0	99%
	-Desulfovibrio sp. BerOC5 partial 16 rRNA gene,	<a href="#">HE797785.1</a>	99%	0.0	99%



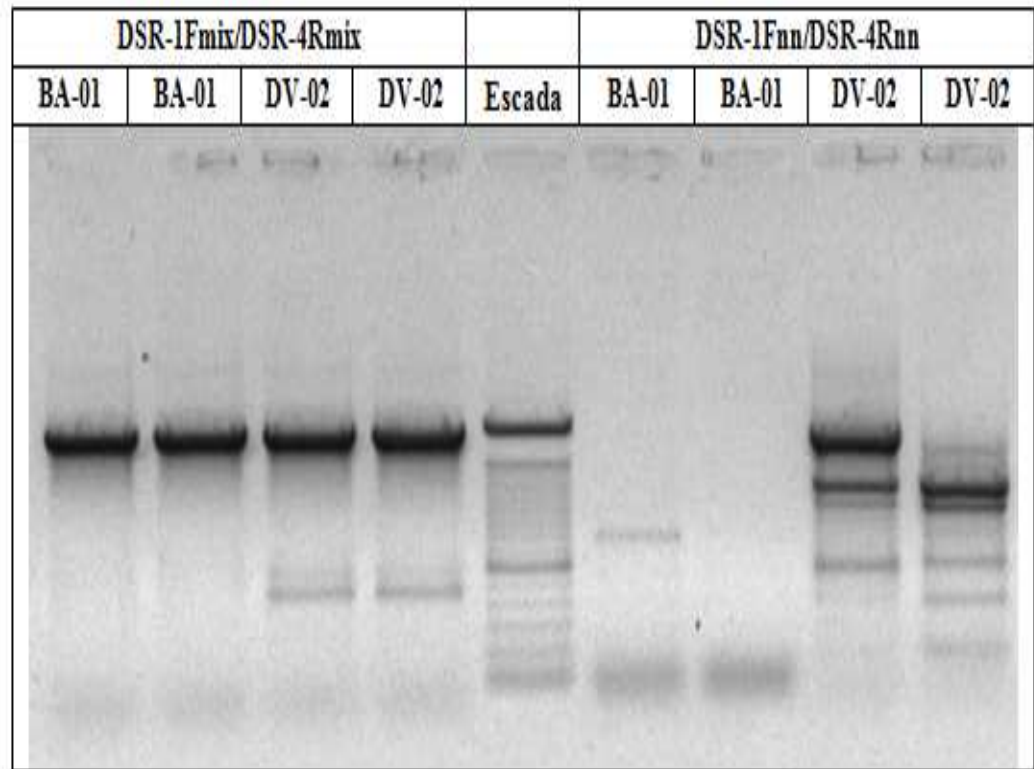
	strain BerOC5				
<b>C-002</b>	-Desulfovibrio dechloracetivorans gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Mic42c03	<a href="#">AB546253.1</a>	99%	0.0	99%
	-Desulfovibrio dechloracetivorans gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Mic13c06	<a href="#">AB546251.1</a>	99%	0.0	99%
	Desulfovibrio sp. BerOC5 partial 16 rRNA gene, strain BerOC5	<a href="#">HE797785.1</a>	99%	0.0	99%
<b>C-003</b>	-Desulfovibrio sp. BerOC1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">EU137840.1</a>	100%	0.0	99%
	-Desulfovibrio sp. BerOC5 partial 16 rRNA gene, strain BerOC5	<a href="#">HE797785.1</a>	100%	0.0	99%
	-Desulfovibrio dechloracetivorans gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Mic42c03	<a href="#">AB546253.1</a>	100%	0.0	99%
<b>C-004</b>	-Desulfovibrio dechloracetivorans gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Mic42c03	<a href="#">AB546253.1</a>	99%	0.0	99%
	-Desulfovibrio dechloracetivorans gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Mic13c06	<a href="#">AB546251.1</a>	99%	0.0	99%
	-Desulfovibrio sp. BerOC5 partial 16 rRNA gene, strain BerOC5	<a href="#">HE797785.1</a>	99%	0.0	99%
<b>C-005</b>	-Desulfovibrio dechloracetivorans gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Mic42c03	<a href="#">AB546253.1</a>	99%	0.0	99%
	-Desulfovibrio dechloracetivorans gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Mic13c06	<a href="#">AB546251.1</a>	99%	0.0	99%
	-Desulfovibrio sp. BerOC5 partial 16 rRNA gene, strain BerOC5	<a href="#">HE797785.1</a>	99%	0.0	99%
<b>C-006</b>	-Desulfovibrio dechloracetivorans gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Mic42c03	<a href="#">AB546253.1</a>	99%	0.0	99%
	-Desulfovibrio dechloracetivorans gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Mic13c06	<a href="#">AB546251.1</a>	99%	0.0	99%
	-Desulfovibrio sp. BerOC5 partial 16 rRNA gene, strain BerOC5	<a href="#">HE797785.1</a>	99%	0.0	99%
<b>DV-02</b>	-Desulfovibrio vulgaris RCH1, complete genome	<a href="#">CP002297.1</a>	99%	0.0	99%
	-Desulfovibrio vulgaris gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:A1	<a href="#">AB252583.1</a>	99%	0.0	99%
	-Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris str. Hildenborough, complete genome	<a href="#">AE017285.1</a>	99%	0.0	99%

### 5.3 PCR E SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO CODIFICANTE PARA A ENZIMA SULFITO REDUTASE

Após a identificação das amostras utilizando *primers* para o rRNA 16S bacteriano, foi realizado o mesmo procedimento para identificação com *primers* específicos para amplificação do fragmento codificante para a enzima sulfito redutase. Os diferentes testes com PCR utilizando os *primers* degenerados DSR-1F-all e DSR-4R-all não surtiram o efeito esperado, e não amplificaram fragmento algum na maioria dos testes ou amplificaram bandas com fragmentos diferentes do esperado, desta forma foram descartados das análises moleculares. Diferentes protocolos foram realizados com os *primers* retirados da literatura (BISSE SAR, 2005): DSR-1F, DSR-1Fa, DSR-1Fb, DSR-4R, DSR-4Ra, DSR-4Rb e DSR-4Rc e com os *primers* encontrados durante a análise: DSR-1F n1, DSR-1F n2, DSR-4R n1, DSR-4R n2. Os resultados demonstraram que os *primers* retirados da literatura e o protocolo de PCR elaborado e ajustado para a amplificação do fragmento alvo foram mais efetivos em comparação com os *primers* novos (Fig. 15), que foram descartados das análises moleculares.

Para amplificação do fragmento codificante para a DSR com os *primers* selecionados e o protocolo de PCR devidamente padronizado, foram escolhidas de forma randômica uma amostra identificada como *Thermovirga lienii*, uma amostra identificada como *Desulfovibrio alaskensis*, uma amostra identificada como *Desulfovibrio dechloracetivorans* e todas as outras amostras não identificadas pela PCR com os *primers* específicos para o fragmento do rRNA 16S, além do controle positivo da bactéria de referência da espécie *Desulfovibrio vulgaris*, colocados na tabela a seguir (tabela 5). Os resultados foram positivos como pode ser observado na figura a seguir do gel de agarose, onde notam-se bandas correspondentes a um fragmento de aproximadamente 1900 pb comparados com a escada padrão de tamanho de DNA (marcador molecular) (Fig. 16).

Figura 15: Gel de agarose (concentração de 1,0%) dos amplicons da PCR para BRS com as cepas da *Desulfovibrio vulgaris* em duplicata (DV-01 e DV-02) e de BRS desconhecida também em duplicata (BRS-01 e BRS-02). Pré-corado com SYBR safe. Primers DSR-1Fmix/DSR-4Rmix e DSR-1Fnn/DSR-4Rnn. As bandas da escada padrão de tamanho de DNA são visualizadas de 100 em 100pb, sendo que banda mais forte na parte superior da escada corresponde a um fragmento de 2.000pb.



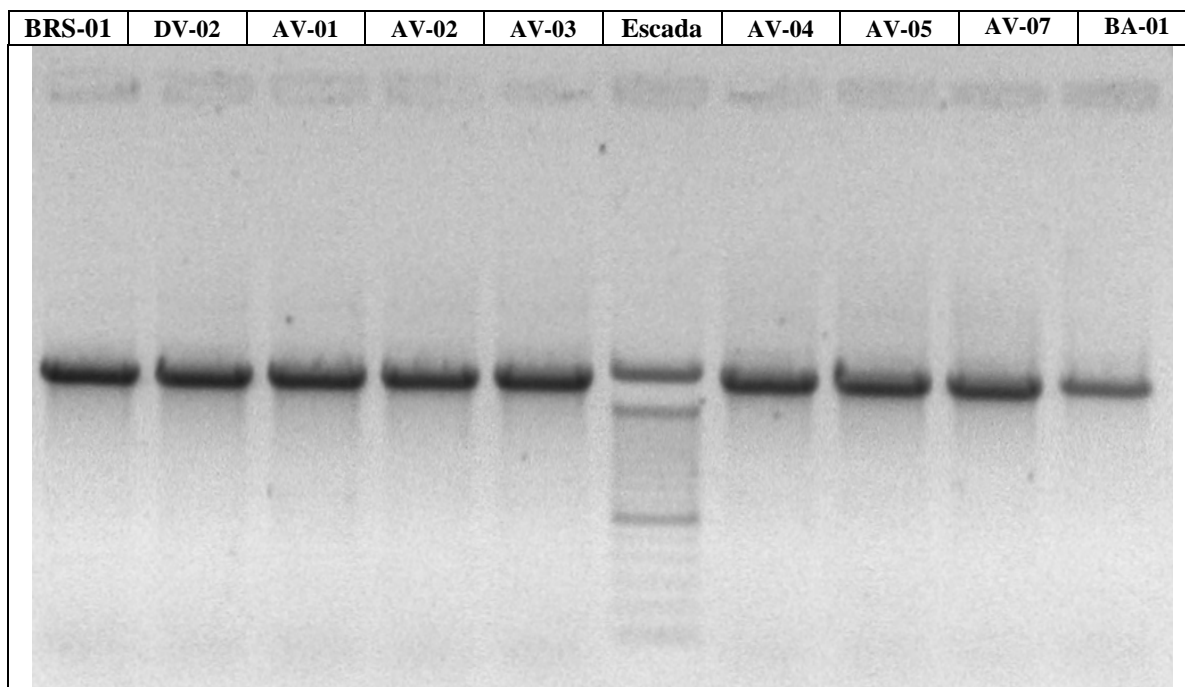
Fonte: Acervo pessoal da autora (2013)

Tabela 6- Amostras identificadas pelo sequenciamento do fragmento codificante para rRNA 16S escolhidas randomicamente para identificação com *primers* para a DSR

Identificação	Amostras
<i>Desulfovibrio dechloracetivorans</i>	BA-001, BA-002, BA-003, BA-004, C-001, C-002, C-003, C-004, C-005, C-006
<i>Desulfovibrio alaskensis</i>	AV -007 e AV -008
<i>Thermovirga lienii</i>	AV-005 e AV-006
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	DV-02
Não identificada	AV-001, AV-002, AV-003, AV-004 e BRS-01

Fonte: Elaborado pela autora (2013)

Figura 16: Gel de agarose (concentração de 1,0%) dos amplicons da PCR para BRS com as amostras BRS-01, DV-02 (cepa de referência), AV-01, AV-02, AV-03, AV-04, AV-05, AV-07, BA-01. Pré-corado com *SYBR safe*. *Primers* DSR-1Fmix/DSR-4Rmix. Bandas positivas evidenciando um fragmento de aproximadamente 1.900 pb. As bandas da escada padrão de tamanho de DNA são visualizadas de 100 em 100pb, sendo que banda mais forte na parte superior da escada corresponde a um fragmento de 2.000pb.



Fonte: Acervo pessoal da autora (2013)

Os amplicons foram purificados e encaminhados para sequenciamento, os resultados recebidos sofreram o mesmo processo de análise das sequências do rRNA 16S, utilizando os programas Staden Package e Bio Edit para a manipulação das mesmas. As sequências consenso foram comparadas às depositadas no *GenBank* do BLAST (*NCBI*), determinando o seu nível de similaridade com fragmentos de bases de vários isolados bacterianos, o que possibilitou a identificação das cepas de BRS. As cepas foram identificadas como *Desulfovibrio alaskensis* e *Desulfovibrio vulgaris*. A amostra **BA-001** não foi identificada, como demonstrado na tabela 6. As sequências obtidas encontram-se no Apêndice B. Os isolados, segundo o *GenBank*, apresentaram grande similaridade com alguns grupos já descritos, como pode ser observado na tabela 7. Cabe ressaltar que sequências de bactérias não cultivadas ou sem relevância para identificação das cepas não foram consideradas nas análises, entretanto encontram-se na tabela.

Tabela 7- Identificação das BRS e respectivas amostras através do fragmento codificante para a DSR e análise no *GenBank* do BLAST

Identificação	Amostras
<i>Desulfovibrio alaskensis</i>	AV-001, AV-002, AV-003, AV-004, AV-005, AV-007
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	BRS-01 e DV-02
Não identificada	BA-001

Fonte: Elaborado pela autora (2013)

Tabela 8- Espécies de BRS identificadas através da utilização dos *primers* específicos para a DSR e similaridade entre as sequências dos isolados e dos microrganismos catalogados no *GenBank*

Amostra:	Catalogado no GenBank:	Código	Query cover	E value	Identity
<b>AV-001</b>	- <i>Desulfovibrio alaskensis</i> G20, complete genome	<a href="#">CP000112.1</a>	100%	0.0	99%
	-Uncultured sulfate-reducing bacterium clone RH.dsrA-208-49-2 dissimilatory sulfite reductase subunit A-like (dsrA) gene, partial sequence	<a href="#">EF052888.1</a>	99%	0.0	99%
	-Uncultured sulfate-reducing bacterium clone LGWK12 dissimilatory sulfite reductase alpha subunit (dsrA) and dissimilatory sulfite reductase beta subunit (dsrB) genes, partial cds	<a href="#">EF065074.1</a>	98%	0.0	83%
<b>AV-002</b>	- <i>Desulfovibrio alaskensis</i> G20, complete genome	<a href="#">CP000112.1</a>	100%	0.0	99%
	-Uncultured sulfate-reducing bacterium clone RH.dsrA-208-49-2 dissimilatory sulfite reductase subunit A-like (dsrA) gene, partial sequence	<a href="#">EF052888.1</a>	99%	0.0	99%
	-Uncultured sulfate-reducing bacterium clone LGWK12 dissimilatory sulfite reductase alpha subunit (dsrA) and dissimilatory sulfite reductase beta subunit (dsrB) genes, partial cds	<a href="#">EF065074.1</a>	98%	0.0	83%
<b>AV-003</b>	- <i>Desulfovibrio alaskensis</i> G20, complete genome	<a href="#">CP000112.1</a>	99%	0.0	99%

	-Uncultured sulfate-reducing bacterium clone RH.dsrA-208-49-2 dissimilatory sulfite reductase subunit A-like (dsrA) gene, partial sequence	<a href="#">EF052888.1</a>	98%	0.0	99%
	-Uncultured sulfate-reducing bacterium clone LGWK12 dissimilatory sulfite reductase alpha subunit (dsrA) and dissimilatory sulfite reductase beta subunit (dsrB) genes, partial cds	<a href="#">EF065074.1</a>	98%	0.0	83%
<b>AV-004</b>	-Desulfovibrio alaskensis G20, complete genome	<a href="#">CP000112.1</a>	100%	0.0	99%
	-Uncultured sulfate-reducing bacterium clone RH.dsrA-208-49-2 dissimilatory sulfite reductase subunit A-like (dsrA) gene, partial sequence	<a href="#">EF052888.1</a>	99%	0.0	99%
	-Uncultured sulfate-reducing bacterium clone LGWK12 dissimilatory sulfite reductase alpha subunit (dsrA) and dissimilatory sulfite reductase beta subunit (dsrB) genes, partial cds	<a href="#">EF065074.1</a>	98%	0.0	83%
<b>AV-005</b>	-Desulfovibrio alaskensis G20, complete genome	<a href="#">CP000112.1</a>	99%	0.0	99%
	-Uncultured sulfate-reducing bacterium clone RH.dsrA-208-49-2 dissimilatory sulfite reductase subunit A-like (dsrA) gene, partial sequence	<a href="#">EF052888.1</a>	98%	0.0	99%
	-Uncultured sulfate-reducing bacterium clone LGWK12 dissimilatory sulfite reductase alpha subunit (dsrA) and dissimilatory sulfite reductase beta subunit (dsrB) genes, partial cds	<a href="#">EF065074.1</a>	98%	0.0	83%
<b>AV-007</b>	-Desulfovibrio alaskensis G20, complete genome	<a href="#">CP000112.1</a>	100%	0.0	99%
	-Uncultured sulfate-reducing bacterium clone RH.dsrA-208-49-2 dissimilatory sulfite reductase subunit A-like (dsrA) gene, partial sequence	<a href="#">EF052888.1</a>	99%	0.0	99%
	-Uncultured sulfate-reducing bacterium clone LGWK12 dissimilatory sulfite reductase alpha subunit (dsrA) and dissimilatory sulfite reductase beta subunit (dsrB) genes, partial cds	<a href="#">EF065074.1</a>	98%	0.0	83%
<b>BRS-01</b>	-Desulfovibrio vulgaris RCH1, complete genome	<a href="#">CP002297.1</a>	99%	0.0	100%
	-Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris str. Hildenborough, complete genome	<a href="#">AE017285.1</a>	99%	0.0	100%

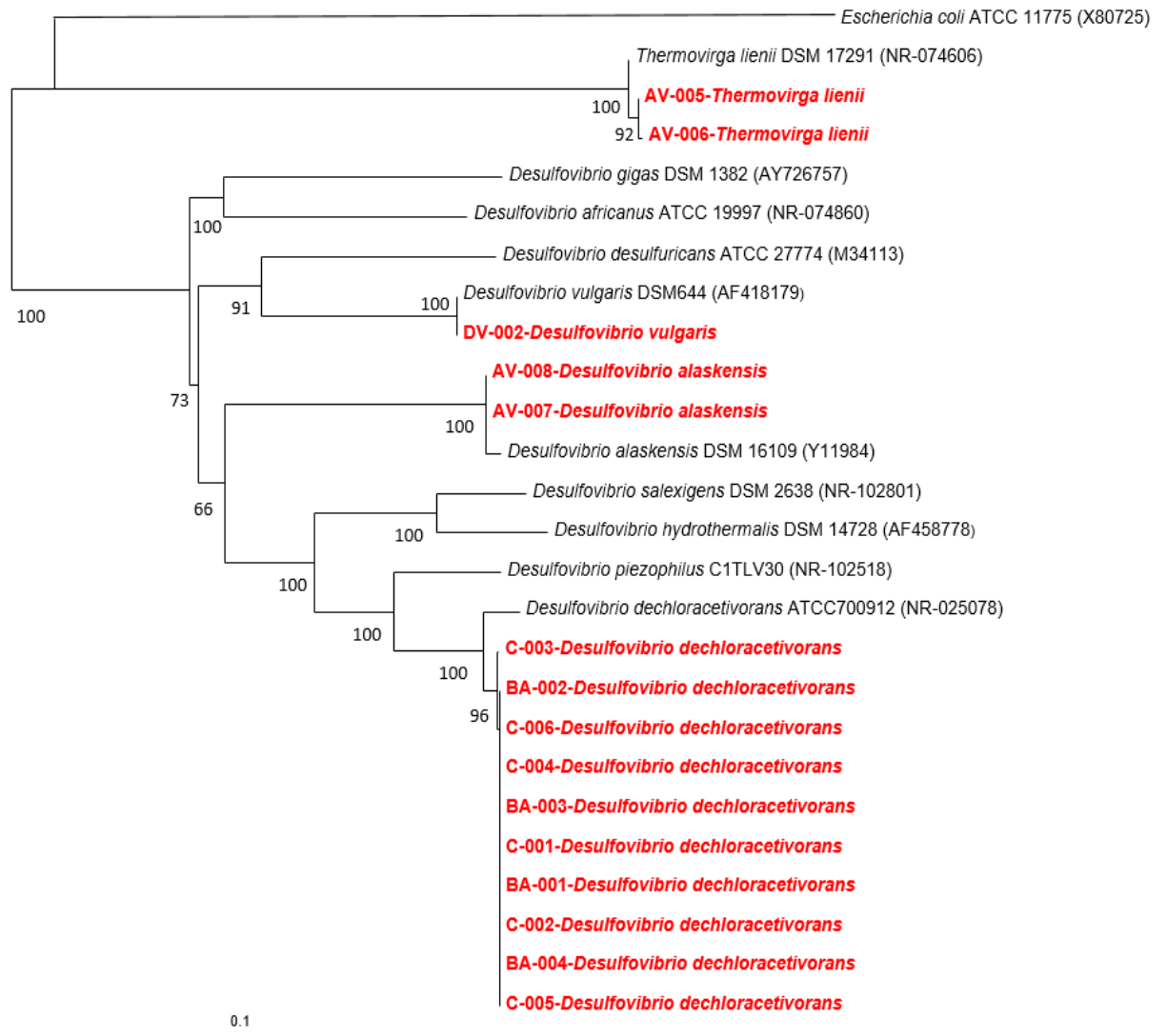
	-Desulfovibrio vulgaris dissimilatory sulfite reductase alpha (dsvA), dissimilatory sulfite reductase beta (dsvB) and dsvD genes, complete cds	<a href="#">U16723.1</a>	99%	0.0	100%
<b>DV-02</b>	-Desulfovibrio vulgaris RCH1, complete genome	<a href="#">CP002297.1</a>	100%	0.0	100%
	-Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris str. Hildenborough, complete genome	<a href="#">AE017285.1</a>	100%	0.0	100%
	-Desulfovibrio vulgaris dissimilatory sulfite reductase alpha (dsvA), dissimilatory sulfite reductase beta (dsvB) and dsvD genes, complete cds	<a href="#">U16723.1</a>	100%	0.0	100%

Fonte: Elaborado pela autora (2013)

#### 5.4 ÁRVORES FILOGENÉTICAS

De posse dos resultados em questão as árvores filogenéticas foram construídas utilizando as sequências obtidas e sequências previamente depositadas no *GenBank* da *NCBI*. Para bactérias cujo fragmento não possuía qualquer tipo de informação no *GenBank*, foram utilizadas sequências correspondentes ao genoma inteiro da bactéria em questão, alinhado juntamente com o fragmento obtido pelo sequenciamento para encontrar dentro do genoma inteiro a sequência alvo amplificada.

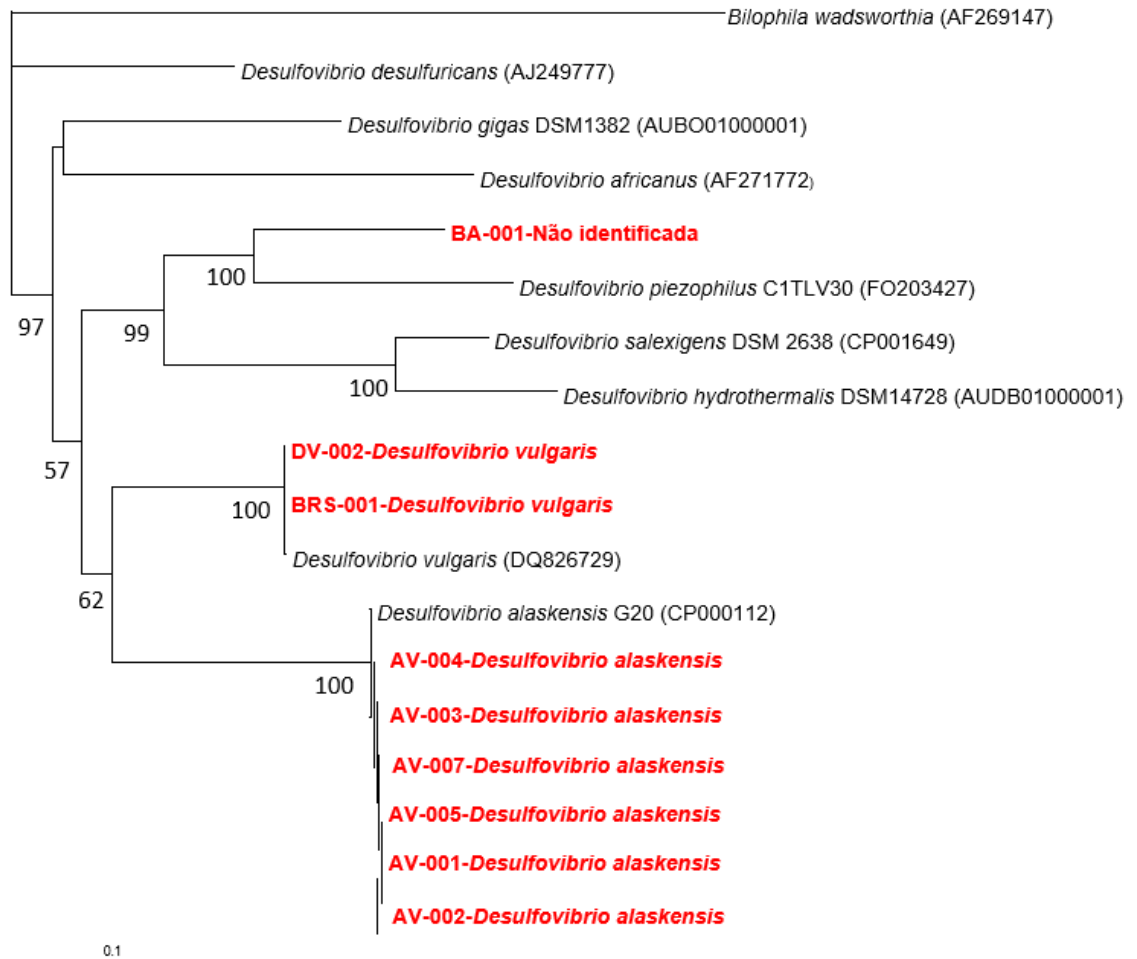
Figura 17: Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene de rRNA 16S. A árvore foi construída pelo método de Neighbor-Joining e modelo de substituição de nucleotídeos F84, enraizada utilizando *Escherichia coli* como um grupo externo. Valores de *bootstrap* (expressas em percentagens) para 1000 repetições são mostradas



Fonte: Elaborado pela autora (2013)



Figura 18: Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene da DSR. A árvore foi construída pelo método de Neighbor-Joining e modelo de substituição de nucleotídeos F84, enraizada utilizando *Bilophila wadsworthia* como um grupo externo. Valores de *bootstrap* (expressas em percentagens) para 1000 repetições são mostradas



Fonte: Elaborado pela autora (2013)

## 6 DISCUSSÃO

O *souring* (acidificação biogênica) e os problemas de biocorrosão associados ao crescimento de BRS constituem uma problemática para as indústrias petrolíferas. Desta forma, a produção descomedida de gás sulfídrico em reservatórios de petróleo tem impulsionado o desenvolvimento de investigações científicas (SOUSA, 2009). Considerando que a corrosão ocasionada pela presença de bactérias redutoras de sulfato explana um dos fatores de deterioração e redução do rendimento em instalações industriais, é necessária a caracterização das populações microbianas responsáveis pela biocorrosão e das interações entre diferentes microrganismos com a superfície metálica com o intuito de implementar estratégias eficientes de detecção, monitorização e controle (ZHU; LUBECK; KILBANE II; 2003). O desenvolvimento de métodos rápidos de detecção e quantificação de microrganismos sulfetogênicos em ambientes naturais e industriais pode auxiliar na otimização do emprego de biocidas para o controle das populações destas bactérias (VIDELA; HERRERA, 2005), que muitas vezes são utilizados de forma indiscriminada ocasionando o surgimento de cepas de BRS resistentes (ALMEIDA et al., 2006).

As BRS raramente são isoladas devido ao crescimento lento. As colônias aparecem após mais de três dias de incubação e seu isolamento requer meios de crescimento específicos ou seletivos (LOUBINOX et al., 2003).

O processo de cultivo e isolamento das BRS provenientes de amostras de água produzida conduzido neste estudo foi realizado sob condições ideais e utilização do meio de cultura Postgate modificado, que se mostrou muito eficiente em trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos (BERNARDEZ et al.; 2013).

Os métodos baseados em culturas, apesar de serem extremamente úteis para a compreensão do potencial fisiológico dos organismos isolados, não providenciam necessariamente informações completas acerca da composição das comunidades microbianas. Desta forma, a aplicação de métodos moleculares na microbiologia do petróleo tem sido incorporada às análises de microrganismos associados ao óleo (ORPHAN et al.; 2000).

Os métodos moleculares aplicados posteriormente ao isolamento das bactérias para identificação dos isolados empregaram como alvos de busca e identificação os genes referentes ao rRNA 16S e DSR. Diversos estudos utilizaram essa mesma abordagem com o intuito de acessar a diversidade e caracterizar molecularmente as bactérias redutoras de sulfato de ambientes diversificados. Estudos realizados previamente comparando a árvore filogenética realizada utilizando sequências parciais da *dsrAB* para avaliar a filogenia de diferentes linhagens de BRS revelou topologia congruente com a árvore filogenética baseada no gene rRNA 16S (ZVERLOV et al.; 2005). DAR e colaboradores (2007) realizaram a análise simultânea dos produtos de PCR obtidos da amplificação das sequências do rRNA 16S e *dsrAB* para avaliar a diversidade e atividade de comunidades sulfetogênicas em bioreatores. A análise comparativa das sequências das bandas obtidas pela técnica de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) empregada após a realização da PCR também demonstrou congruência, revelando as mesmas populações de BRS. Além disso, a utilização do gene funcional da *dsrAB* como marcador molecular forneceu acesso à atividade metabólica das BRS presentes nos bioreatores. Neste estudo, entretanto, a análise comparativa dos resultados obtidos através do sequenciamento para o gene do rRNA 16S e para o gene da DSR não foi congruente, mas possibilitou uma avaliação mais detalhada das culturas de BRS, demonstrando ser imprescindível principalmente em casos de contaminação.

A amplificação da região codificante para o rRNA 16S bacteriano forneceu a identificação das bactérias de 15 amostras como sendo *Desulfovibrio dechloracetivorans*, *Desulfovibrio alaskensis*, *Thermovirga lienii*, *Desulfovibrio vulgaris* (bactéria de referência), sendo que 5 amostras não foram identificadas devido a uma possível contaminação exacerbada na cultura que acarretou na amplificação de diferentes materiais genômicos bacterianos. Já a escolha randômica dentre as amostras identificadas e a inclusão das amostras não identificadas através da análise do rRNA 16S para o emprego da técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para enzima sulfito redutase demonstrou uma incoerência com os resultados obtidos anteriormente, a amostra **AV-005** previamente identificada como *Thermovirga lienii* pela análise no *GenBank* do fragmento amplificado do rRNA 16S foi identificada como *Desulfovibrio alaskensis* pela análise no *GenBank* da amplificação do fragmento responsável pela codificação da DSR.

Os resultados foram contraditórios inclusive com a determinação da similaridade das sequências através da utilização do *GenBank* do BLAST (*NCBI*), uma vez que as sequências obtidas demonstraram possuir elevada similaridade com isolados previamente depositados tanto com as sequências do rRNA 16S quanto da DSR, possuindo em sua maioria uma cobertura de sequência (query cover) superior ou igual a 98% e valores para a identidade (identity) sendo iguais ou superiores a 99%. O valor E (E value), que representa a possibilidade da busca por sequências semelhantes aos isolados realizada no *GenBank* apresentar resultados obtidos ao acaso, sendo que, quanto menor é este número, maior é esta probabilidade, foi neste estudo de 0.0. É importante frisar que bactérias não cultivadas foram incluídas na tabela, mas não na análise da identificação das BRS, uma vez que não fornecem dados relevantes para tal.

A bactéria *Thermovirga Lienii* é uma cepa termofílica anaeróbica redutora de enxofre pertencente à família *Synergistaceae* e filo “*Synergistetes*” (GÖKER et al., 2012) isolada de amostras de água produzida de campos petrolíferos do Mar do Norte (Noruega). Foi demonstrado que provavelmente se tratava de uma bactéria que ocorria naturalmente em campos petrolíferos, uma vez que o campo em questão não era submetido à injeção com água do mar (o que elimina uma fonte comum de contaminação) (DAHLE; BIRKELAND, 2006).

Após os resultados obtidos se mostrarem incongruentes, o cromatograma da amostra **AV-005** foi avaliado novamente pelo Bio Edit demonstrando que de fato havia duas bactérias na mesma amostra, todavia, a segunda sequência era quase imperceptível, deixando apenas uma sequência em evidência. Foi necessária uma avaliação extremamente minuciosa do cromatograma para ratificar que de fato existia uma contaminação. A bactéria *Thermovirga lienii* encontrava-se em maior quantidade na amostra, conseqüentemente havia uma abundância de seu material genômico. Após o sequenciamento do fragmento rRNA 16S, a presença do DNA da segunda bactéria *Desulfovibrio alaskensis* foi insignificante, acarretando na identificação da amostra como sendo exclusivamente a bactéria *Thermovirga lienii*. Entretanto, após o sequenciamento dos produtos de PCR referentes à região codificante para a DSR, específica para procariotos redutores de sulfato, apenas a bactéria *Desulfovibrio alaskensis* foi identificada. Posteriormente a estes achados, todos os cromatogramas das amostras contaminadas não identificadas através do sequenciamento do fragmento do rRNA 16S foram analisados, e foi possível

perceber que todos possuíam a mesma situação, contendo sequências pertencentes à bactérias diferentes, no entanto, nestas amostras o material genômico das bactérias apareciam com quantidades semelhantes, o que facilitou a identificação inicial de uma contaminação (o que não ocorreu com a amostra **AV-005**).

Após o mesmo processo de sequenciamento dos amplicons referentes à região codificante da enzima sulfito redutase, as amostras **AV-001**, **AV-002**, **AV-003**, **AV-004** foram identificadas como *Desulfovibrio alaskensis*, sendo interessante ressaltar que esta identificação se deu graças às sequências do genoma completo desta bactéria depositado no *GenBank*, que foi alinhado com as sequências obtidas possibilitando encontrar o local de adequado do fragmento alvo da enzima dentro do genoma, este mesmo processo foi utilizado para a realização da árvore, uma vez que não foram encontradas sequências pertencentes a DSR desta bactéria. A amostra **BRS-01**, por sua vez, foi identificada como *Desulfovibrio vulgaris*. Possivelmente as outras bactérias pertencentes a estas amostras não são procariotos redutores de sulfato, da mesma forma ocorrida na amostra **AV-005**, desta forma não possuem a enzima sulfito redutase, o que acarretou na identificação das BRS. Existe a possibilidade que esteja ocorrendo um processo simbiótico bacteriano entre BRS e outras bactérias que não possuem a enzima sulfito redutase, uma vez que o processo de isolamento foi extremamente meticuloso e laborioso, mas ainda assim não separou as bactérias citadas, entretanto mais estudos devem ser realizados com o intuito de ratificar esta hipótese.

Dhillon e colaboradores (2003) exploraram a diversidade filogenética e funcional das bactérias redutoras de sulfato caracterizando amplificadas pela PCR dos genes da enzima sulfito redutase reductase (*dsrAB*) e rRNA 16S do sedimento contaminado por hidrocarbonetos do petróleo da bacia de Guaymas (Golfo da Califórnia). A abordagem do sequenciamento do fragmento responsável pela codificação da *dsrAB* revelou um novo grupo de procariotos redutores de sulfato que não podiam ser identificadas pelo sequenciamento do rRNA 16S.

Neste estudo, contudo, o sequenciamento do fragmento para rRNA 16S permitiu a identificação da amostra **BA-001** como sendo da espécie *Desulfovibrio dechloracetivorans*, através da análise no GenBank do BLAST, sendo que o sequenciamento do fragmento referente à região codificante para a DSR não permitiu a identificação da bactéria. Este resultado foi elucidado através da construção das árvores filogenéticas, uma vez que foi possível encontrar sequências

referentes ao fragmento do rRNA 16S da bactéria previamente depositados no *GenBank*, porém não havia nenhuma sequência referente à enzima sulfito redutase nem referente ao genoma completo desta bactéria. Este fato sugere que o sequenciamento do fragmento da enzima obtido a partir desta amostra anteriormente identificada pela análise no *GenBank* do rRNA 16S como *Desulfovibrio dechloracetivorans*, forneceu novas informações acerca da DSR desta espécie, contribuindo desta forma, para o aumento do banco de dados praticamente limitado sobre microrganismos sulfetogênicos.

As árvores filogenéticas construídas corroboraram com os achados, agrupando as sequências obtidas similares com sequências previamente depositadas no *GenBank* do BLAST (*NCBI*), além disso evidenciou a falta de informações acerca de enzima sulfito redutase, havendo poucas sequências que possibilitem a identificação de uma determinada espécie de BRS através da análise dos produtos de PCR do gene funcional da DSR.

Foi observada também uma diversidade demasiadamente pequena de cepas pertencentes ao grupo das bactérias redutoras de sulfato isoladas neste estudo. Segundo Magot, Ollivier e Patel (2000), as bactérias redutoras de sulfato mesofílicas mais frequentemente isoladas de campos petrolíferos pertencem ao gênero *Desulfovibrio*, único gênero de BRS encontrado no estudo em questão. Entretanto, esta ínfima diversidade nas cepas isoladas também pode ser devido ao uso indiscriminado de biocidas em campos de petróleo, o que acarretaria na mudança abrupta da biodiversidade microbiana pertencente ao campo da pesquisa. Um estudo realizado por Telang e colaboradores (1998) investigaram os efeitos de biocidas a base de diamina na população microbiana de um campo de petróleo utilizando a técnica de Sondagem Genômica por Amostragem Reversa (RSGP), uma técnica utilizada para rastrear várias bactérias de campos de petróleo em um único ensaio. Como resultado, os estudos utilizando a técnica de RSGP de populações microbianas sésseis obtidas de cupons de corrosão de instalações de campo de petróleo indicaram o domínio de *Desulfovibrio spp*, provavelmente devido ao tratamento com biocidas. Cabe ressaltar, que possivelmente as cepas isoladas de BRS neste estudo são de bactérias resistentes devido ao uso de biocidas nos campos petrolíferos, entretanto esta hipótese deve ser ratificada com o auxílio de testes de resistência, que não foi um objetivo proposto por esta pesquisa.

## 7 CONCLUSÃO

1. Os métodos clássicos de cultura demonstraram-se falhos neste estudo, apresentando contaminações em algumas amostras por bactérias que não pertenciam ao grupo das BRS, mostrando ser imprescindível a utilização de uma abordagem molecular na identificação dos microrganismos sulfetogênicos.
2. A análise simultânea das sequências amplificadas dos genes rRNA 16S e *dsr* permitiu uma avaliação mais detalhada das culturas e identificação de três espécies de BRS pertencentes ao gênero *Desulfovibrio* (*Desulfovibrio dechloracetivorans*, *Desulfovibrio alaskensis* e *Desulfovibrio vulgaris*) e da bactéria redutora de enxofre *Thermovirga lienii*.
3. A avaliação das sequências do gene da DSR demonstrou que ainda existem poucas informações acerca da enzima sulfito redutase depositadas no *GenBank* do BLAST (*NCBI*), prevalecendo uma gama de sequências de DSR de bactérias não cultivadas, sem dar o suporte necessário para uma melhor identificação.
4. O estudo contribuiu com o aumento de informações no banco de dados acerca das BRS, principalmente no que tange às sequências de DSR, além de fornecer sequências da enzima sulfito redutase pertencentes às bactérias *Desulfovibrio dechloracetivorans*, não encontrada no *GenBank* e *Desulfovibrio alaskensis*, encontrado apenas o genoma completo depositado.

## REFERÊNCIAS

AGRAWAL, A.; LAL, B. Rapid detection and quantification of bisulfite reductase genes in oil field samples using real-time PCR. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 69, p. 301–312, 2009

ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, R. C. C.; CARVALHO, E. B.; SILVA, C. H. T. P.; TAFT, C. A. Overview of sulfate-reducing bacteria and strategies to control biosulfide generation in oil waters. In: Carlton A. Taft. (Org.). **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**. Kerala: Research Signpost, v. 1, p. 183-197, 2006

BARTON, L. L.; TOMEI, F. A. Characteristics and activities of sulfate-reducing bacteria in sulfate-reducing bacteria. Barton LL (ed), **Biotechnology Handbooks**, v. 8, Plenum Press, New York 80, 1995

BEECH, I. B.; SUNNER, J. A.; HIRAOKA, K. Microbe–surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. **International Microbiology**, v. 8, p. 157-168, 2005

BEECH, I. B. Sulfate-reducing bacteria in biofilms on metallic materials and corrosion. **Microbiology today**, v. 30, p. 115–117, 2003

BEN-DOV, E., BRENNER, A. KUSHMARO, A. Quantification of Sulfate-reducing Bacteria in Industrial Wastewater, by Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) using *dsrA* and *apsA* Genes. **Microbial Ecology**, v. 54, p. 439-451, 2007

BERNARDEZ, L. A.; ANDRADE LIMA, L. R. P.; JESUS, E. B.; RAMOS, C. L. S.; ALMEIDA, P. F. A kinetic study on bacterial sulfate reduction. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 1861-1869, 2013



BISSEAR, R. **PCR-DGGE profiing of Sulfate-Reducing Bacteria inhabiting two grassland soils: The effect of water salinity and tidal regime on the community composition.** 2005. 84p. Faculdade Natur e Techniek, 2005

CARVALHO, C. M.; MEDEIROS, S. R. B.; LIMA, L. F. A.; BLAHA, C. A. G. Detecção de procariotos redutores de sulfato (PRS) em amostras ambientais do manguezal de Diogo Lopes, Bacia Petrolífera Potiguar. In: **4 Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás**, Campinas-SP, 2007

CASTRO, H. F.; WILLIAMS, N. H.; OGRAM, A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 31, p. 1–9, 2000

CIFUENTES, A.; ANTÓN, J.; WIT, R.; RODRÍGUES-VALERA, F. Diversity of *Bacteria* and *Archaea* in sulphate-reducing enrichment cultures inoculated from serial dilution of *Zostera noltii* rhizosphere samples. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 754-764, 2003

COOK R. B.; KELLY C. A. Sulphur cycling and fluxes in temperate dimictic lakes. In **Sulphur cycling on the continents** (ed. R. W. Howarth, J. W. B. Stewart, and M. V. Ivanov), pp. 145-188. John Wiley & Sons Ltd., 1992

CORD-RUWISCH, R.; KLEINITZ, W.; WIDDEL, F. Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production. **Journal of Petroleum Technology**, p. 97 - 106, 1987

CORTEZ, M. T. S. C. **Abordagem molecular na resolução de problemas com biocorrosão.** 2009. 130p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Aveiro, Portugal, 2009

DAHLE, H.; BIRKELAND, N. K. *Thermovirga lienii* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, anaerobic, amino-acid-degrading bacterium iso-lated from a North Sea oil well. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.1539-1545, 2006

DAR, S. A.; YAO, L.; DONGEN, U. V; 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, n. 2, p. 594-604, 2007

DHILLON, A.; TESKE, A.; DILLON, J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L. Molecular Characterization of Sulfate-Reducing Bacteria in the Guaymas Basin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 5, p. 2765–2772, 2003

EDEN, R. D.; LAYCOCK, P. J.; FIELDER, M. Oilfield Reservoir Souring. **UK Health and Safety Executive OTH 92385**, HMSO, 1993

FELSENSTEIN, J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.695. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, 2013

FELSENSTEIN, J.; CHURCHILL, G. A. A Hidden Markov Model approach to variation among sites in rate of evolution, and the branching order in hominoidea. **Molecular Biology and Evolution**. v. 13, n. 1, p. 93–104, 1996

GIEG, L. M.; JACK, T. R.; FOGHT, J. M. Biological souring and mitigation in oil reservoirs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p. 263–282, 2011

GILOTEAUX L, GOÑI-URRIZA M, DURAN R. Nested PCR and New Primers for analysis of sulfate-reducing bacteria in low-cell-biomass environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 9, p. 2856-2865, 2010

GITTEL, A.; SORENSEN, K. B.; SKOVHUS, T. L.; INGVORSEN, K.; SCHRAMM, A. Prokaryotic community structure and sulfate reducer activity in water from high-temperature oil reservoirs with and without nitrate treatment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 7086–7096, 2009

GÖKER, M.; SAUNDERS, E.; LAPIDUS, A.; NOLAN, M.; LUCAS, S.; HAMMON, N.; DESHPANDE, S.; CHENG, J. F.; HAN, C.; TAPIA, R.; GOODWIN, L. A.; PITLUCK, S.; LIOLIOS, K.; MAVROMATIS, K.; PAGANI, I.; IVANOVA, N.; MIKHAILOVA, N.; PATI, A.; CHEN, A.; PALANIAPPAN, K.; LAND, M.; CHANG, Y. J.; JEFFRIES, C. D.; BRAMBILLA, E. M.; ROHDE, M.; SPRING, S.; DETTER, J. C.; WOYKE, T.; BRISTOW, J.; EISEN, J. A.; MARKOWITZ, V.; HUGENHOLTZ, P.; KYRPIDES, N. C.; KLENK, H. P. Genome sequence of the moderately thermophilic, amino-acid-degrading and sulfur-reducing bacterium *Thermovirga lienii* type strain (Cas60314T). **Standards in Genomic Sciences**, v.6, p. 230-239, 2012

JAN-ROBLERO, J.; ROMERO, J. M.; AMAYA, M.; BORGNE, S. Phylogenetic characterization of a corrosive consortium isolated from a sour gas pipeline. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 862-867, 2004

JORGENSEN B. B. The sulfur cycle of a coastal marine sediment (Limfjorden, Denmark). **Limnology and Oceanography**, v. 22, n. 5, p. 814-832, 1977

JORGENSEN, B. B. Mineralization of organic matter in the sea bed—the role of sulphate reduction. **Nature**, London, v. 296, p. 643–645, 1982

KARR, E. A.; SATTLEY, W. M.; RICE, M. R.; JUNG, D. O.; MADIGAN, M. T.; ACHENBACH, L. A. Diversity and Distribution of Sulfate-Reducing Bacteria in Permanently Frozen Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 6353-6359, 2005

KISHINO, H; HASEGAWA, M. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoidea. **Journal of Molecular Evolution**. v.29, n. 2, p. 170–179, 1989

KJELLERUP, B.V.; VEEH, R.H.; SUMITHRATNE, P.; THOMSEN, T.R.; BUCKINGHAM-MEYER, K.; FROLUND, B.; STURMAN, P. Monitoring of microbial souring in chemically treated, produced-water biofilm systems using molecular techniques. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 163–170, 2005

KLEIKEMPER, J. **Activity and diversity of sulfate-reducing and methanogenic microorganisms in a petroleum-contaminated aquifer**. 2003. 217p. Tese (Doutorado) – Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, 2003

Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, v.23, p.2947-2948, 2007

LEÃO, B. A. **Agentes inibidores da atividade metabólica e do processo de adesão de *Desulfotomaculum nigrificans* em superfície de aço inoxidável**. 2009. 84p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009

LEMOS, R. S.; GOMES, C. M.; SANTANA, M.; LEGALL, J.; XAVIER, A. V.; TEIXEIRA, M. The “strict” anaerobe *Desulfovibrio gigas* contains a membrane-bound oxygen-reducing respiratory chain. **FEBS Letters**, v. 496, p. 40-43, 2001

LÓPEZ-JIMÉNEZ, G.; LE BORGNE, S.; LOERA, O.; RAMIRÉZ, F.; MONROY, O.; FERNÁNDEZ-L, L. Development of molecular probe by random amplified polymorphic DNA (RAPD) of sulphate-reducing bacteria isolated from Mexican gas-pipelines. Disponível em: < [http://ippec.utulsa.edu/Conf2001/lopez\\_jimenez\\_27.pdf](http://ippec.utulsa.edu/Conf2001/lopez_jimenez_27.pdf)>, acessado em 20 de outubro de 2011

LOUBINOUX , J.; JAULHAC, B.; PIEMNOT, Y.; MONTEIL, H.; FAOU, A. E. L. Isolation of Sulfate-Reducing Bacteria from Human Thoracoabdominal Pus. **Journal of clinical Microbiology**. v. 41, n. 3, p.1304-1306, 2003

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Redução de sulfato. In: **Microbiologia de Brock**. 10<sup>a</sup> ed. Pearson- Prentice Hall, 2004

MAGOT, M.; B. OLLIVIER, B.; PATEL, K. C. Microbiology of petroleum reservoirs. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 77, p. 103–116, 2000

MILETTO, M.; BODELIER, P. L. E.; LAANBROEK, H. J. Improved PCR-DGGE for high resolution diversity screening of complex sulfate-reducing prokaryotic communities in soils and sediments. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, p. 103-111, 2007

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

MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 441-454, 2008

NAKAGAWA, T.; FUKUI, M. Molecular characterization of community structures and sulfur metabolism within microbial streamers in Japanese hot springs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 7044–7057, 2003

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS, H. B. JR.; DEERFIELD, D.W. II. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, **EMBNW NEWS**, v. 4, n. 14, 1997

OLLIVIER, B.; MAGOT, M. **Petroleum microbiology**. Washington D.C: ASM Press, 2005

ORPHAN, V. J.; TAYLOR, L. T.; HAFENBRADI, D.; DELONG, E. F. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 700-711, 2000

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. R.; YOUNG, L. Y.; KERKHOF, L. J. Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in anaerobic hydrocarbon-degrading consortia and pure cultures using the dissimilatory sulfate reductase (*dsrAB*) genes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, p.145-150, 2001

PHELPS, C. D.; KERKHOF, L. J.; YOUNG, L. Y. Molecular characterization of a sulfate-reducing consortium which mineralizes benzene. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 27, p. 269–279, 1998

POSTGATE, J. R. **The sulphate-reducing bacteria**. Cambridge: Cambridge University Press, 1979

RAMPINELLI, L. R. **Isolamento e caracterização de uma nova espécie de bactéria redutora de sulfato obtida de drenagem ácida de mina**. 2007. 85p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2007

REYSENBACH, A. L.; LONGNECKER, K.; KIRSHTEN, J. Novel Bacterial and Archaeal Lineages from an In Situ Growth Chamber Deployed at a Mid-Atlantic Ridge Hydrothermal Vent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.9, p. 3798–3806, 2000

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

SASS, H.; CYPIONKA, H.; BABENZIEN, H. D. Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 22, n. 3, p. 245-255, 1997

SOUSA, K. A. **Avaliação da biogênese de sulfeto sob diferentes concentrações de bactérias redutoras de nitrato, bactérias redutoras de sulfato e nitrato**. 2009. 143p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009

SOUSA, K. A.; CAMMAROTA, M. C.; SÉRVULO, E. F. C. Efeito da aplicação de nitrato na redução biogênica de sulfeto sob diferentes concentrações iniciais de bactérias redutoras de nitrato e sulfato. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 273-278, 2010

TELANG, A. J.; EBERT, S. FOGHT J. M.; WESTLAKE, D. W. S.; VOORDOUW, G. Effects of two diamine biocides on the microbial community from an oil field. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 44, n.11, p.1060-1065, 1998

VIDELA, H. A.; HERRERA, L. K. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. **International Microbiology**. v. 8, p. 169-180, 2005

WAGNER, M.; ROGER, A. J.; FLAX, J. L.; BRUSSEAU, G. A.; STAHL, D. A. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 2975–2982, 1998

WETLER-TONINI, R. M. C.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Biodegradação Bacteriana de Petróleo e seus Derivados. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 2, p. 78-87, 2011

WIDDEL, F. Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In **Biology of Anaerobic Microorganisms** (ed. A. J. B. Zehnder), p. 469-585. John Wiley & Sons, Inc., 1988

ZHU, X. Y.; LUBECK, J.; KILBANE II, J. J. Characterization of Microbial Communities in Gas Industry Pipel. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.9, p. 5354–5363, 2003

ZVERLOV, V.; KLEIN, M.; LUCKER, S.; FRIEDRICH, M. W.; KELLERMANN, J.; STAHL, D. A.; LOY, A.; WAGNER, M. Lateral Gene Transfer of Dissimilatory (Bi)Sulfite Reductase Revisited. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 6, p. 2203–2208, 2005



## APÊNDICE A – Sequências do fragmento codificante para o rRNA 16S das BRS isoladas de água produzida

>AV-005-Thermovirga-lienii

GCAGTCGGACGGGGTGAGTTAGTGGAAGCTTTCCGGTTGAAGCTGACTTACCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG  
 AATTACCTACCCTAGGGAGGGGATAACGCCTGGAAACGGGTGCTAATACCCCATAGGCCGGGAGGTTAAAGGGAGAAAT  
 CTGCCCTAGGATGGGTTTCGCGTCTATCAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGAAGACGGGTAGCCGGTCTG  
 AGAGGATGTACGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGGCAATG  
 GCGCAAGCCTGACCCAGCGACGCCGCGTGAGGGAAGAAGGCCTTTGGGTTGTAACCTCTGTTGTACGGGAAGAAGGC  
 AGTGACGGTACCGTACGAGGAAGCCCCGGCAAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCC  
 GGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGCAGGCGGATATGCAAGTCTGCTGTGTAATGTCATGGCTCAACCGTGTATTGCGG  
 TGGAAACTGCATATCTGGAGTACTGGAGAGGGGAGTGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAGGAA  
 CACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCAGTTACTGACGCTCATGCGGAAAGCTGGGGGAGCGAACC GGATTAGATAC  
 CCGGGTAGTCCCAGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTGGGTGTCTAGGGCATCTGTGCCGAGTTAACGCGATAAGCA  
 TTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCACGTGGT  
 TTAATTCGATGCAAACCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGTACGTGGTACTGACCTGAAAGGGGAGGGACCCATACTT  
 CGGTATGGGAGCGTACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGACGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC  
 GCAACCCCTGCATCTAGTTGCCAACGGGTGAAGCTGGGCACTCTAGATGGACTGCCGGCGACAAGCCGGAGGAAGGTGG  
 GGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTATGTCCAGGGCGACACACGTGCTACAATGGCCGGTACAGCGGGAAGCGAAGG  
 GGAGACCTGGAGCGGATCTCTGAAAGCCGGTCCCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGC  
 TAGTAATCGCGGATCAGCCAAGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACCCGAGTTGG  
 GTGCACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTATGGG

>AV-006-Thermovirga-lienii

CAGTCGGACGGGGTGAGTTAGTGGAAGCTTTCCGGTTGAAGCTGACTTACCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAA  
 TTACCTACCCTAGGGAGGGGATAACGCCTGGAAACGGGTGCTAATACCCCATAGGCCGGGAGGTTAAAGGGAGAAATCT  
 GCCCTAGGATGGGTTTCGCGTCTATCAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGAAGACGGGTAGCCGGTCTGA  
 GAGGATGTACGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGGCAATGG  
 GCGCAAGCCTGACCCAGCGACGCCGCGTGAGGGAAGAAGGCCTTTGGGTTGTAACCTCTGTTGTACGGGAAGAAGGCA  
 GTGACGGTACCGTACGAGGAAGCCCCGGCAAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCG  
 GAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGCAGGCGGATATGCAAGTCTGCTGTGTAATGTCATGGCTCAACCGTGTATTGCGGT  
 GGAAACTGCATATCTGGAGTACTGGAGAGGGGAGTGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAGGAAC  
 ACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCAGTTACTGACGCTCATGCGGAAAGCTGGGGGAGCGAACC GGATTAGATACC  
 CGGGTAGTCCCAGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTGGGTGTCTAGGGCATCTGTGCCGAGTTAACGCGATAAGCAT  
 TCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCACGTGGT  
 TAATTCGATGCAAACCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGTACGTGGTACTGACCTGAAAGGGGAGGGACCCATACTTC  
 GGTATGGGAGCGTACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGACGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG  
 CAACCCCTGCATCTAGTTGCCAACGGGTGAAGCTGGGCACTCTAGATGGACTGCCGGCGACAAGCCGGAGGAAGGTGGG  
 GATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTATGTCCAGGGCGACACACGTGCTACAATGGCCGGTACAGCGGGAAGCGAAGGG  
 GAGACCTGGAGCGGATCTCTGAAAGCCGGTCCCAGTTCGGATTGTAGTTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTA  
 GTAATCGCGGATCAGCCAAGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACCCGAGTTGGT  
 GCACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTAATGGG

>AV-007-Desulfovibrio-alaskensis

GTCGTACGCGAAAGTTCTTCGGGGATGAGTAAAGTGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTGGATTATCTACCTGCATCACCG  
 GAATAACGGTTGGAAACGACTGCTAATGCCGGATAGTCTTGAAAGGGTAAAGGGGGCCTCTGCTTGCAAGCTTCCGGGTG  
 CTGATGAGTCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGGCAACGATCAGTAGCAGGTTTGAGAGGAT

GACCTGCCACACTGGGACTGGAACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAA  
GCCTGACGCAGCGACGCCCGTGGAGGATGAAGGCCTTCGGGTCGTAAACTCCTGTCAAGAGGGAAGAACCGTATGCGG  
AATAATACGCCGCATGCCTGACGGTACCTCTAGAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGG  
GTGCAAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGCTTGGTAAGTCAGGTGTGAAAGCCCCGGCCC  
AACCGGGGAATTGCACTTGATACTGCTAGGCTAGAGTTCAGGAGAGGGTGGCGGAATTCCAGGTGTAGGAGTGAAATCCG  
TAGATATCTGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGACTGACACTGACGCTGAGGTGCCAAAGCGTGGGTAGC  
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGATACTAGGTGTGCGGGACTTGATCCTCGGTGCCGTAG  
CTAACCGTAAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGGCTGAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCGCACAAGCG  
GTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTAGGCTTGACATCCGGAGAATCCCTCCGAAAAGAGGG  
AGTGCCCTTCGGGGAGCTCCGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGGTTAAGTCCCG  
CAACGAGCGCAACCCCTATCTTCAGTTGCCATCAGGTAATGCTGGGCACTCTGGAGAGACTGCCCGTTAACGGGGAGG  
AAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGCCTAGGGCTACACACGTAACAATGGCGCATACAAAGGGTTG  
CGATACCGCGAGGTGGAGCTAATCCAAAAAGTGCCTCAGTCCGGATTGCAGTCTGCAACTCGACTGCATGAAGTCCG  
AATCGCTAGTAATCCCGTATCATCATGACGGGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAAAG  
TTGGTTCTGCCGACGCCGATGAGCTAACCCGCAAGGGAGGCAG

>AV-008-Desulfovibrio-alaskensis

GCAGTCGTACGCGAAAGTTCCTTCGGGGATGAGTAAAGTGCGCACGGGTGAGTAACGCGTGGATTATCTACCTGCATCA  
CCGGAATAACGGTTGGAAACGACTGCTAATGCCGGATAGTCTTGAAGGGTAAAGGGGGCCTCTGCTTGAAGCTTCCGG  
GTGCTGATGAGTCCGCTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGGCAACGATCAGTAGCAGGTTTGAGAG  
GATGACCTGCCACACTGGGACTGGAACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCG  
AAAGCCTGACGCAGCGACGCCCGTGGAGGATGAAGGCCTTCGGGTCGTAAACTCCTGTCAAGAGGGAAGAACCGTATG  
CGGAATAATACGCCGCATGCCTGACGGTACCTCTAGAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGG  
AGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGCTTGGTAAGTCAGGTGTGAAAGCCCCGG  
CCCAACCGGGGAATTGCACTTGATACTGCTAGGCTAGAGTTCAGGAGAGGGTGGCGGAATTCCAGGTGTAGGAGTGAAT  
CCGTAGATATCTGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGACTGACACTGACGCTGAGGTGCCAAAGCGTGGGT  
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGATACTAGGTGTGCGGGACTTGATCCTCGGTGCCG  
TAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGGCTGAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCGCACAA  
GCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTAGGCTTGACATCCGGAGAATCCCTCCGAAAAGA  
GGGAGTGCCCTTCGGGGAGCTCCGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGGTTAAGTC  
CCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTCAGTTGCCATCAGGTAATGCTGGGCACTCTGGAGAGACTGCCCGTTAACGGGG  
AGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGCCTAGGGCTACACACGTAACAATGGCGCATACAAAGGG  
TTGCGATACCGCGAGGTGGAGCTAATCCAAAAAGTGCCTCAGTCCGGATTGCAGTCTGCAACTCGACTGCATGAAGTC  
GGAATCGCTAGTAATCCCGTATCATCATGACGGGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGA  
AAGTTGGTTCTGCCGACGCCGATGAGCTAACCCGCAAGGGAGGCAG

>BA-001-Desulfovibrio-dechloracetivorans

GCAGTCGAGCGAGAAGCTCTCTTCGGAGAGTGAGTAGAGCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTGGATAATCTGCCCTGAA  
GATCGGGATAACAGTTGGAAACGGCTGCTAATACCGTATAATCTGCATATTTAACTTTATGTGGGAAAGATGGCCTTACAT  
GTACGCTATCGCTTTTGGATGAGTCCGCGTCTCATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGAGTAGC  
TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC  
GCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCGACGCCCGTGTAGGAAGAAGGCCCTTCGGGTCGTAAACTACTGTCAAGAGGGAA  
GAAACCGTAGAGCATTAAACGGCTCTGCGCTGACGGTACCTCTAGAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC  
GGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGCGGCGTATCAAGTCAGGCGTGA  
AAGCCCTCGGCTCAACCGGGGAATTGCGCTTGAACCTGGTATGCTAGAGTCTCGGAGAGGTTGGCGGAATTCCAGGTGTA  
GGAGTGAATCCGTAGATATCTGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCAACTGGACGAGTACTGACGCTGAGGTACGA  
AAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGGATATTAGGTGTGCGGGGTTTTACTTC  
GGTGCCGCAGTTAACGCGTTAATATCCCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  
CGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTAGGCTTGACATCCTGAGAACCCTCCC  
GAAACGGAGGGGTGCCCTTCGGGGAATTCAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGG  
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGCTAGTTGCCATCACATAATGGTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCCGGTCA

ACCGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGCCTAGGGCTACACACGTAACAATGGTGCATAC  
 AAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTCGAGCCAATCCCAGAAAATGCATCCCAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCG  
 TGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCCCGGATCAGCATGCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC  
 ACCACGAAAGCTGGTTCTACCCGACAACGGCGGACTAACCCCTTCGGGAGGT

>BA-002-Desulfovibrio-dechloracetivorans

GTCGAGCGAGAAGCTCTCTTCGGAGAGTGAGTAGAGCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTGGATAATCTGCCCTGAAGATC  
 GGGATAACAGTTGAAAACGGCTGCTAATACCGTATAATCTGCATATTTAACTTTATGTGGGAAAGATGGCCTCTACATGTAC  
 GCTATCGCTTTTGGATGAGTCCGCGTCTCATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGAGTAGCTGGT  
 CTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCA  
 ATGGGGGAAACCCTGACGCAGCGACGCCGCTGTAGGAAGAAGGCCTTCGGTTCGTAACACTACTGTCAAGAGGGAAGAA  
 ACCGTAGAGCATTAAACGGCTCTGCGCTGACGGTACCTCTAGAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGT  
 AATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGCGGCGTATCAAGTCAGGCGTAAAAG  
 CCCTCGGCTCAACCGGGGAATTGCGCTTAAACTGGTATGCTAGAGTCTCGGAGAGGTTGGCGGAATTCCAGGTGTAGGA  
 GTGAAATCCGTAGATATCTGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCAACTGGACGAGTACTGACGCTGAGGTACGAAAG  
 CGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGGATATTAGGTGTCGGGGTTTTACTTCGGT  
 GCCGCAAGTTAACGCGTTAAATATCCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC  
 ACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTAGGCTTGACATCCTGAGAACCCTCCCGAA  
 ACGGAGGGGTGCCCTTCGGGGAAATTCAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTCCCGTGAAGGTGTTGGGTTAA  
 GTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGCTAGTTGCCATCACATAATGGTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCCGGGTCAACC  
 GGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGCCTAGGGCTACACACGTAACAATGGTGCATACAAA  
 GGGCAGCGAAACCGCGAGGTCGAGCCAATCCCAGAAAATGCATCCCAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGA  
 AGTTGGAATCGCTAGTAATCCCGGATCAGCATGCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACC  
 ACGAAAGCTGGTTCTACCCGACAACGGCGGACTAACCCCTTCGGGAGGTAG

>BA-003-Desulfovibrio-dechloracetivorans

CAGTCGAGCGAGAAAGCTCTCTTCGGAGAGTGAGTAGAGCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTGGATAATCTGCCCTGAA  
 GATCGGGATAACAGTTGAAAACGGCTGCTAATACCGTATAATCTGCATATTTAACTTTATGTGGGAAAGATGGCCTCTACAT  
 GTACGCTATCGCTTTTGGATGAGTCCGCGTCTCATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGAGTAGC  
 TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC  
 GCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCGACGCCGCTGTAGGAAGAAGGCCTTCGGTTCGTAACACTACTGTCAAGAGGGAA  
 GAAACCGTAGAGCATTAAACGGCTCTGCGCTGACGGTACCTCTAGAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC  
 GGTAAACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGCGGCGTATCAAGTCAGGCGTGA  
 AAGCCCTCGGCTCAACCGGGGAATTGCGCTTAAACTGGTATGCTAGAGTCTCGGAGAGGTTGGCGGAATCCAGGTGTA  
 GGAGTAAAATCCGTAGATATCTGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCAACTGGACGAGTACTGACGCTGAGGTACGA  
 AAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGGATATTAGGTGTCGGGGTTTTACTTC  
 GGTGCCGCAAGTTAACGCGTTAAATATCCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  
 CGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTAGGCTTGACATCCTGAGAACCCTCCC  
 GAAACGGAGGGGTGCCCTTCGGGGAAATTCAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTCCCGTGAAGGTGTTGGG  
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGCTAGTTGCCATCACATAATGGTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCCGGGTCA  
 ACCGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGCCTAGGGCTACACACGTAACAATGGTGCATAC  
 AAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTCGAGCCAATCCCAGAAAATGCATCCCAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCG  
 TGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCCCGGATCAGCATGCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC  
 ACCACGAAAGCTGGTTCTACCCGACAACGGCGGACTAACCCCTTCGGGAGGTA

>BA-004-Desulfovibrio-dechloracetivorans

GCAGTCGAGCGAGAAGCTCTCTTCGGAGAGTGAGTAGAGCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTGGATAATCTGCCCTGAA  
 GATCGGGATAACAGTTGAAAACGGCTGCTAATACCGTATAATCTGCATATTTAACTTTATGTGGGAAAGATGGCCTCTACAT  
 GTACGCTATCGCTTTTGGATGAGTCCGCGTCTCATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGAGTAGC  
 TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC  
 GCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCGACGCCGCTGTAGGAAGAAGGCCTTCGGTTCGTAACACTACTGTCAAGAGGGAA

GAAACCGTAGAGCATTAAACGGCTCTGCGCTGACGGTACCTCTAGAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC  
 GGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGCGTATCAAGTCAGGCGTGA  
 AAGCCCTCGGCTCAACCGGGGAATTGCGCTTGAAACTGGTATGCTAGAGTCTCGGAGAGGTTGGCGGAATCCAGGTGTA  
 GGAGTGAAATCCGTAGATATCTGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCAACTGGACGAGTACTGACGCTGAGGTACGA  
 AAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGGATATTAGGTGTGGGGTTTTACTTC  
 GGTGCCGCAGTTAACGCGTTAAATATCCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  
 CGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTAGGCTTGACATCCTGAGAACCCTCCC  
 GAAACGGAGGGGTGCCCTTCGGGAATTCAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTCCGTGAGGTGTTGGG  
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGCTAGTTGCCATCACATAATGGTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCCGGTCA  
 ACCGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGCTAGGGCTACACACGTACTACAATGGTGCATAC  
 AAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTGAGCCAAATCCAGAAAATGCATCCAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCG  
 TGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCCCGGATCAGCATGCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTAC  
 ACCACGAAAGCTGGTTCTACCCGACAACGGCGGACTAACCCCTTCGGGAGGTAG

>C-001-Desulfovibrio-dechloracetivorans

CAGTCGAGCGAGAAGCTCTCTTCGGAGAGTGAGTAGAGCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTGGATAATCTGCCCTGAAG  
 ATCGGGATAACAGTTGAAACGGCTGCTAATACCGTATAATCTGCATATTTAACTTTATGTGGGAAAGATGGCCTCTACATG  
 TACGCTATCGCTTTTGGATGAGTCCGCGTCTCATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGAGTAGCT  
 GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC  
 GCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGTAGGAAGAAGGCCCTTCGGGTTCGTAACACTACTGTCAAGAGGGAA  
 GAAACCGTAGAGCATTAAACGGCTCTGCGCTGACGGTACCTCTAGAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC  
 GGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGCGTATCAAGTCAGGCGTGA  
 AAGCCCTCGGCTCAACCGGGGAATTGCGCTTGAAACTGGTATGCTAGAGTCTCGGAGAGGTTGGCGGAATCCAGGTGTA  
 GGAGTGAAATCCGTAGATATCTGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCAACTGGACGAGTACTGACGCTGAGGTACGA  
 AAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGGATATTAGGTGTGGGGTTTTACTTC  
 GGTGCCGCAGTTAACGCGTTAAATATCCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  
 CGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTAGGCTTGACATCCTGAGAACCCTCCC  
 GAAACGGAGGGGTGCCCTTCGGGAATTCAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTCCGTGAGGTGTTGGG  
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGCTAGTTGCCATCACATAATGGTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCCGGTCA  
 ACCGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGCTAGGGCTACACACGTACTACAATGGTGCATAC  
 AAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTGAGCCAAATCCAGAAAATGCATCCAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCG  
 TGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCCCGGATCAGCATGCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTAC  
 ACCACGAAAGCTGGTTCTACCCGACAACGGCGGACTAACCCCTTCG

>C-002-Desulfovibrio-dechloracetivorans

GCAGTCGAGCGAGAAGCTCTCTTCGGAGAGTGAGTAGAGCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTGGATAATCTGCCCTGAA  
 GATCGGGATAACAGTTGAAACGGCTGCTAATACCGTATAATCTGCATATTTAACTTTATGTGGGAAAGATGGCCTCTACAT  
 GTACGCTATCGCTTTTGGATGAGTCCGCGTCTCATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGAGTAGC  
 TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC  
 GCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGTAGGAAGAAGGCCCTTCGGGTTCGTAACACTACTGTCAAGAGGGAA  
 GAAACCGTAGAGCATTAAACGGCTCTGCGCTGACGGTACCTCTAGAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC  
 GGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGCGTATCAAGTCAGGCGTGA  
 AAGCCCTCGGCTCAACCGGGGAATTGCGCTTGAAACTGGTATGCTAGAGTCTCGGAGAGGTTGGCGGAATCCAGGTGTA  
 GGAGTGAAATCCGTAGATATCTGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCAACTGGACGAGTACTGACGCTGAGGTACGA  
 AAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGGATATTAGGTGTGGGGTTTTACTTC  
 GGTGCCGCAGTTAACGCGTTAAATATCCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  
 CGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTAGGCTTGACATCCTGAGAACCCTCCC  
 GAAACGGAGGGGTGCCCTTCGGGAATTCAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTCCGTGAGGTGTTGGG  
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGCTAGTTGCCATCACATAATGGTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCCGGTCA  
 ACCGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGCTAGGGCTACACACGTACTACAATGGTGCATAC  
 AAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTGAGCCAAATCCAGAAAATGCATCCAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCG

TGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCCCGGATCAGCATGCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAC  
ACCACGAAAGCTGGTTCTACCCGACAACGGCGGACTAACCCCTCGGGAGGTAG

>C-003-Desulfovibrio-dechloracetivorans

GAGTAGAGCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTGGATAATCTGCCCTGAAGATCGGGATAACAGTTGGAAACGGCTGCTAAT  
ACCGTATAATCTGCATATTTAACTTTATGTGGGAAAGATGGCCTCTACATGTACGCTATCACTTTTGGATGAGTCCGCGTCTC  
ATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGAC  
TGAAACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGAAACCCTGACGCAGCGACGCC  
GCGTGTAGGAAGAAGGCCCTTCGGGTCGTAACTACTGTCAAGAGGGAAGAAACCGTAGAGCATTAAACGGCTCTGCGCT  
GACGGTACCTCTAGAGGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGT GCGAGCGTTAATCGGA  
ATCACTGGGCGTAAAGCGT GCGTAGGCGGCGTATCAAGTCAGGCGT GAAAGCCCTCGGCTCAACCGGGGAATTGCGCTT  
GAAACTGGTATGCTAGAGTCTCGGAGAGGTTGGCGGAATCCAGGTGTAGGAGT GAAATCCGTAGATATCTGGAGGAACA  
CCGGTGGCGAAGGCGGCCAACTGGACGAGTACTGACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCC  
TGGTAGTCCACGCTGTAACAGATGGATATTAGGTGTCGGGGTTTTACTTCGGTGCCGCAGTTAACGCGTTAAATATCCCGC  
CTGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTC  
GATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTAGGCTTGACATCCTGAGAACCCTCCCGAAACGGAGGGGTGCCCTTCGGGGAAATTC  
GTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTG  
CTAGTTGCCATCACATAATGGTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCCGGTCAACCGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAGT  
CATCATGGCCCTTACGCCTAGGGCTACACACGTAACAATGGTGCATACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTGCGAGCCA  
ATCCAGAAAATGCATCCCAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCCCGGATCA  
GCATGCCGGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGATC

>C-004-Desulfovibrio-dechloracetivorans

CAGTCGAGCGAGAAGCTCTCTTCGGAGAGTGAGTAGAGCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTGGATAATCTGCCCTGAAG  
ATCGGGATAACAGTTGGAAACGGCTGCTAATACCGTATAATCTGCATATTTAACTTTATGTGGGAAAGATGGCCTCTACATG  
TACGCTATCGCTTTTGGATGAGTCCGCGTCTCATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGAGTAGCT  
GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGC  
GCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGTAGGAAGAAGGCCCTTCGGGTCGTAACTACTGTCAAGAGGGAA  
GAAACCGTAGAGCATTAAACGGCTCTGCGCTGACGGTACCTCTAGAGGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC  
GGTAATACGGAGGGT GCGAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGT GCGTAGGCGGCGTATCAAGTCAGGCGTGA  
AAGCCCTCGGCTCAACCGGGGAATTGCGCTT GAAACTGGTATGCTAGAGTCTCGGAGAGGTTGGCGGAATCCAGGTGTA  
GGAGT GAAATCCGTAGATATCTGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCAACTGGACGAGTACTGACGCTGAGGTACGA  
AAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGGATATTAGGTGTCGGGGTTTTACTTC  
GGTGCCGCAGTTAACGCGTTAAATATCCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  
CGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTAGGCTTGACATCCTGAGAACCCTCCC  
GAAACGGAGGGGTGCCCTTCGGGGAATTCAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGG  
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGCTAGTTGCCATCACATAATGGTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCCGGTCA  
ACCGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGCCTAGGGCTACACACGTAACAATGGTGCATAC  
AAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTGCGAGCCAATCCCAGAAAATGCATCCCAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCG  
TGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCCCGGATCAGCATGCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAC  
ACCACGAAAGCTGGTTCTACCCGACAACGGCGGACTAACCCCTCGGGAGGTAG

>C-005-Desulfovibrio-dechloracetivorans

CAGTCGAGCGAGAAGCTCTCTTCGGAGAGTGAGTAGAGCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTGGATAATCTGCCCTGAAG  
ATCGGGATAACAGTTGGAAACGGCTGCTAATACCGTATAATCTGCATATTTAACTTTATGTGGGAAAGATGGCCTCTACATG  
TACGCTATCGCTTTTGGATGAGTCCGCGTCTCATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGAGTAGCT  
GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGC  
GCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGTAGGAAGAAGGCCCTTCGGGTCGTAACTACTGTCAAGAGGGAA  
GAAACCGTAGAGCATTAAACGGCTCTGCGCTGACGGTACCTCTAGAGGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC  
GGTAATACGGAGGGT GCGAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGT GCGTAGGCGGCGTATCAAGTCAGGCGTGA  
AAGCCCTCGGCTCAACCGGGGAATTGCGCTT GAAACTGGTATGCTAGAGTCTCGGAGAGGTTGGCGGAATCCAGGTGTA

GGAGTGAAATCCGTAGATATCTGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCAACTGGACGAGTACTGACGCTGAGGTACGA  
 AAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGGATATTAGGTGTCGGGGTTTTACTTC  
 GGTGCCGCAGTTAACGCGTTAAATATCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  
 CGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTAGGCTTGACATCCTGAGAACCCTCCC  
 GAAACGGAGGGGTGCCCTTCGGGAATTCAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGG  
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGCTAGTTGCCATCACATAATGGTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCCCGGTCA  
 ACCGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGCCTAGGGCTACACACGTACTACAATGGTGCATAC  
 AAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTCGAGCCAATCCCAGAAAATGCATCCCAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCG  
 TGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCCCGGATCAGCATGCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAC  
 ACCACGAAAGCTGGTTCTACCCGACAACGGCGGACTAACCCCTTCGGGAGGTAG

>C-006-Desulfovibrio-dechloracetivorans

CAGTCGAGCGAGAAGCTCTTTCGGAGAGTGAGTAGAGCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTGGATAATCTGCCCTGAAG  
 ATCGGGATAACAGTTGAAACGGCTGCTAATACCGTATAATCTGCATATTTAACTTTATGTGGAAAGATGGCCTCTACATG  
 TACGCTATCGCTTTTGGATGAGTCCGCTCTCATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGAGTAGCT  
 GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGTC  
 GCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAGCAGCCGCTGTAGGAAGAAGGCCCTTCGGGTGCTAAACTACTGTCAAGAGGGAA  
 GAAACCGTAGAGCATTAAATACGGCTCTGCGCTGACGGTACCTCTAGAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC  
 GGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGCGGCGTATCAAGTCAGGCGTGA  
 AAGCCCTCGGCTCAACCGGGGAATTGCGCTTGAAACTGGTATGCTAGAGTCTCGGAGAGGTTGGCGGAATCCAGGTGTA  
 GGAGTGAAATCCGTAGATATCTGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCAACTGGACGAGTACTGACGCTGAGGTACGA  
 AAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGGATATTAGGTGTCGGGGTTTTACTTC  
 GGTGCCGCAGTTAACGCGTTAAATATCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  
 CGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTAGGCTTGACATCCTGAGAACCCTCCC  
 GAAACGGAGGGGTGCCCTTCGGGAATTCAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGG  
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGCTAGTTGCCATCACATAATGGTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCCCGGTCA  
 ACCGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGCCTAGGGCTACACACGTACTACAATGGTGCATAC  
 AAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTCGAGCCAATCCCAGAAAATGCATCCCAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCG  
 TGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCCCGGATCAGCATGCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAC  
 ACCACGAAAGCTGGTTCTACCCGACAACGGCGGACTAACCCCTTCGGGAGGTAG

## APÊNDICE B – Sequências do fragmento codificante para a enzima sulfito redutase das BRS isoladas de água produzida

>AV-001-Desulfovibrio\_alaskensis

CGTTATCGGCCGTTACTGTGACCAGCCCGAAATGTTCCCCGGCGTGGCACATTTCCACACCGTCCGCGTGAACCAGCCTG  
CAGGTAAGTTCTACACCTCCGAATACCTGCGCAAGCTCTGCGATATCTGGGACCTGCGCGGTTCCGGCCTGACCAACATG  
CACGGCTCCACCGGTGACATCGTTCTGCTGGGTACCACCACTCCCCAGCTGGAAGAGATTTTCTGGGAACTGACCCACGA  
TCTGAAACCGACCTCGGCGTTCGGGCTCCAACCTGCGTACCCCTGCTGCCTGTATGGGTGAATCGCGCTGCGAATACG  
CATGTTACGATTCCCAGCAGATGTGCTACGATCTTACTCAGGAATATCAGGACGAACTTCACCGTCCCGCATTCCCCTACAA  
GTTCAAGTTCAAGTTCGATGCCTGCCCAACGGCTGCGTTGCTTCCATCGCACGTTCCGACTTCTCCGTGATCGGTACATG  
GAAAGACTCCATCAAGATCGATCAGGACGCAGTTGCCGAATACGTTGCCGGCAAGATCGCACCCAACGCCGGTGCACACT  
CCGGCCGCGACTGGGGCAAGTTCGACATCGAAGCTGAAGTTGTTAACCGTTGCCCTCCAAGGCTCTTAGCTGGGACGGT  
TCCAAGCTGTCCGTGAACGCCAAGGACTGCGTACGTTGCATGCACTGCATCAACACCATGCCCAAGGCTGTTTCGCATCGG  
TGACGAGCGCGGCGCCTCCATTCTGGTTCGGCGCAAAGGCTCCCATTCTCGACGGCGCCAGATGGGCTCCCTGCTGGTT  
CCCTTCATCGAAGCCAAGGACCCCTGGGACGAAGTCAAGGAAGTCATTGAGAACATCTGGGACTGGTGGATGGAAGAAAG  
GCAAGAACCGCAACGTGTGGGTGAAACCATCAAGCGCCTCAGCCTGCAGAAGCTGCTTGAAGTTACCAATACGGCTCCC  
CAGCCGCAGCACGTTGTCGAGCCTCGTTCCAACCCCTACATCTTCTTCAAGGAAGAAGAAGTTCCCGGTGGTTGGGATCGT  
GACATCACGGAATACCGTAAGAGACACCAGCGCTAAACTTAAGAGGGGTACCCAAAAATGGCATTTCATCTTCTTCTGGATAC  
AATCCCAGAAAAACCGATGGAAGGTTCGGATTACCGACATTGGCCCGCAGCATTACGCACAGTTCTACCCGCCTGTTATCGCA  
CGTAACAAGGGTAAGTGGCTGTACCACGAAATCATCGAACCCGGCGTCTGGTGCACGTGGCTGAATCCGGCGAAAAAGT  
GTACACCGTCCGTGTGGGCGCTGCACGTCTGATGTCCATCACCCACATTTCGCGAAATCTGCGAAATCGCAGACAAGCATTG  
CGGCGGACATCTGCGTTTACCACCCGTAACAACGTTGAATTCATGGTGGAAACCGAAGAAGCCATGAAAGCTCTGCGTGA  
CGACCTTGCTTCGCGCAAGTTCGACGGCGGTTCCAAGAAGTTCCCGTGGGCGGCACCGGTGCTGGTATTTCCAACATCG  
TGACACTCAGGGCTGGGTACACTGCCACACCCCGCCACCGACGCTTCCGGTCCGGTTAAGGCCATCATGGACGAAGTC  
TTCGAAGACTTCAGAGCATGCGCCTTCCCGTCCCGTGCATTTTCGCTGGCCTGCTGCATCAACATGTGCGGCGCCGT  
TCACTGCTCCGACATCGGCGTTGTGGGTATCCACCGCAAGCCCGGATGATCGACCACGCATGGACCGACAGCTGTGCG  
AAATCCCGCTGGCCGTTGCTTCTGCCCCACCGCCGCTGTTTCGTCACCAAGGTTGAAACTGGACGGCAAAAAAGGTAAA  
CAG

>AV-002-Desulfovibrio\_alaskensis

CGTTATCGGCCGTTACTGTGACCAGCCCGAAATGTTCCCCGGCGTGGCACATTTCCACACCGTCCGCGTGAACCAGCCTG  
CAGGTAAGTTCTACACCTCCGAATACCTGCGCAAGCTCTGCGATATCTGGGACCTGCGCGGTTCCGGCCTGACCAACATG  
CACGGCTCCACCGGTGACATCGTTCTGCTGGGTACCACCACTCCCCAGCTGGAAGAGATTTTCTGGGAACTGACCCACGA  
TCTGAAACCGACCTCGGCGTTCGGGCTCCAACCTGCGTACCCCTGCTGCCTGTATGGGTGAATCGCGCTGCGAATACG  
CATGTTACGATTCCCAGCAGATGTGCTACGATCTTACTCAGGAATATCAGGACGAACTTCACCGTCCCGCATTCCCCTACAA  
GTTCAAGTTCAAGTTCGATGCCTGCCCAACGGCTGCGTTGCTTCCATCGCACGTTCCGACTTCTCCGTGATCGGTACATG  
GAAAGACTCCATCAAGATCGATCAGGACGCAGTTGCCGAATACGTTGCCGGCAAGATCGCACCCAACGCCGGTGCACACT  
CCGGCCGCGACTGGGGCAAGTTCGACATCGAAGCTGAAGTTGTTAACCGTTGCCCTCCAAGGCTCTTAGCTGGGACGGT  
TCCAAGCTGTCCGTGAACGCCAAGGACTGCGTACGTTGCATGCACTGCATCAACACCATGCCCAAGGCTGTTTCGCATCGG  
TGACGAGCGCGGCGCCTCCATTCTGGTTCGGCGCAAAGGCTCCCATTCTCGACGGCGCCAGATGGGCTCCCTGCTGGTT  
CCCTTCATCGAAGCCAAGGACCCCTGGGACGAAGTCAAGGAAGTCATTGAGAACATCTGGGACTGGTGGATGGAAGAAGG  
CAAGAACCGCAACGTGTGGGTGAAACCATCAAGCGCCTCAGCCTGCAGAAGCTGCTTGAAGTTACCAATACGGCTCCCC  
AGCCGCAGCACGTTGTCGAGCCTCGTTCCAACCCCTACATCTTCTTCAAGGAAGAAGAAGTTCCCGGTGGTTGGGATCGTG  
ACATCACGGAATACCGTAAGAGACACCAGCGCTAAACTTAAGAGGGGTACCCAAAAATGGCATTTCATCTTCTTCTGGATACAA  
TCCCAGAAAAACCGATGGAAGGTTCGGATTACCGACATTGGCCCGCAGCATTACGCACAGTTCTACCCGCCTGTTATCGCACG  
TAACAAGGGTAAGTGGCTGTACCACGAAATCATCGAACCCGGCGTCTGGTGCACGTGGCTGAATCCGGCGAAAAAGTGT  
ACACCGTCCGTGTGGGCGCTGCACGTCTGATGTCCATCACCCACATTTCGCGAAATCTGCGAAATCGCAGACAAGCATTGC  
GGCGGACATCTGCGTTTACCACCCGTAACAACGTTGAATTCATGGTGGAAACCGAAGAAGCCATGAAAGCTCTGCGTGAC

GACCTTGCTTCGCGCAAGTTCGACGGCGGTTCCAAGAAGTTCCTCCGTTGGGCGGCACCGGTGCTGGTATTTCCAACATCGT  
 GCACACTCAGGGCTGGGTACTGACACTGCCACACCCCCGCCACCGACGCTTCCGGTCCGGTTAAGGCCATCATGGACGAAGTCT  
 TCGAAGACTTCCAGAGCATGCGCCTTCCCGCTCCCGTGCCTATTTGCTGGCCTGCTGCATCAACATGTGCGGCGCCGTT  
 CACTGCTCCGACATCGGCGTTGTGGGTATCCACCGCAAGCCCCGATGATCGACCACGCATGGACCGACCAGCTGTGCGA  
 AATCCCGCTGGCCGTTGCTTCTGCCCCACCGCCGCTGTTTCGTCCACCAAGTTGAAACTGGACGGCAAAAAGGTAAC  
 AG

>AV-003-Desulfovibrio\_alaskensis

CAAGCTCGTCGCGGCGGCGTTATCGGCCGTTACTGTGACCAGCCCGAAATGTTCCCGGCGTGGCACATTTCCACACCGT  
 CCGCGTGAACCAGCCTGCAGGTAAGTTCTACACCTCCGAATACCTGCGCAAGCTCTGCGATATCTGGGACCTGCGCGGTT  
 CCGGCCTGACCAACATGCACGGCTCCACCGGTGACATCGTTCTGCTGGGTACCACCACTCCCAGCTGGAAGAGATTTTC  
 TGGGAACTGACCCACGATCTGAAACCGACCTCGGCGGTTCCGGCTCCAACCTGCGTACCCCTGCTGCCTGTATGGGTGA  
 ATCGCGCTGCGAATACGCATGTTACGATTCCCAGCAGATGTGCTACGATCTTACTCAGGAATATCAGGACGAACTTACCCG  
 TCCCGCATTCCCTACAAGTTCAAGTTCAAGTTTCGATGCCTGCCCAACGGCTGCGTTGCTTCCATCGCACGTTCCGACTT  
 CTCCGTGATCGGTACATGGAAGACTCCATCAAGATCGATCAGGACGCAGTTGCCGAATACGTTGCCGGCAAGATCGCAC  
 CCAACGCCGGTGCACACTCCGGCCGCGACTGGGGCAAGTTGACATCGAAGCTGAAGTTGTTAACCGTTGCCCTCCAAG  
 GCTCTTAGCTGGGACGTTTCCAAGCTGTCCGTGAACGCCAAGGACTGCGTACGTTGCATGCACTGCATCAACACCATGCC  
 CAAGGCTGTTTCGATCGGTGACGAGCGCGGCGCCTCCATTCTGGTCCGGCGCAAAGGCTCCCATTTCTGACGGCGCCCAG  
 ATGGGCTCCCTGCTGTTCCCTTCATCGAAGCCAAGGACCCCTGGGACGAAGTCAAGGAAGTCAATTGAGAACATCTGGGA  
 CTGGTGGATGGAAGAAGGCAAGAACC CGAACGTGTGGGTGAAACCATCAAGCGCCTCAGCCTGCAGAAGCTGCTTGAAG  
 TTACCAATACGGCTCCCCAGCCGACGACGTTGTGAGCCTCGTTCCAACCCTACATCTTCTTCAAGGAAGAAGAAGTTCC  
 CGGTGGTTGGGATCGTGACATCACGGAATACCGTAAGAGACACCAGCGCTAAACTTAAGAGGGGTACCCAAAAATGGCATT  
 CATCTCTTCTGATACAATCCCGAAAAACCGATGGAAGGTCCGATTACCGACATTGGCCCGCAGCATTACGCACAGTTCTA  
 CCCGCTGTTATCGCACGTAACAAGGGTAAGTGGCTGTACCACGAAATCATCGAACCCGGCGTTCTGGTGCACGTGGCTG  
 AATCCGGCGAAAAAGTGTACACCGTCCGTGTGGGCGCTGCACGTCTGATGTCCATCACCCACATTCCGCGAAATCTGCGAAA  
 TCGCAGACAAGCATTGCGGCGGACATCTGCGTTTACCACCCGTAACAACGTTGAATTCATGGTGGAAACCGAAGAAGCCA  
 TGAAAGCTCTGCGTGACGACCTTGTTCGCGCAAGTTTCGACGGCGGTTCCAAGAAGTTCCTCCGTTGGGCGGCACCGGTGCT  
 GGTATTTCCAACATCGTGCACACTCAGGGCTGGGTACTGCCACACCCCCGCCACCGACGCTTCCGGTCCGGTTAAGGC  
 CATCATGGACGAAGTCTTCAAGACTTCCAGAGCATGCGCCTTCCCGCTCCCGTGCCTATTTGCTGGCCTGCTGCATCAA  
 CATGTGCGGCGCCGTTCACTGCTCCGACATCGGCGTTGTGGGTATCCACCGCAAGCCCCGATGATCGACCACGCATGGA  
 CCGACCAGCTGTGCGAAATCCCGCTGGCCGTTGCTTCTGCCCCACCGCCGCTGTTTCGTCCACCAAGGTTGAACTGGAC  
 GGCAAAAAGGTGAACAGCAT

>AV-004-Desulfovibrio\_alaskensis

GCGTTATCGGCCGTTACTGTGACCAGCCCGAAATGTTCCCGGCGTGGCACATTTCCACACCGTCCGCGTGAACCAGCCT  
 GCAGGTAAGTTCTACACCTCCGAATACCTGCGCAAGCTCTGCGATATCTGGGACCTGCGCGGTTCCGGCCTGACCAACAT  
 GCACGGCTCCACCGGTGACATCGTTCTGCTGGGTACCACCACTCCCAGCTGGAAGAGATTTTCTGGGAACTGACCCACG  
 ATCTGGAACCGACCTCGGCGGTTCCGGCTCCAACCTGCGTACCCCTGCTGCCTGTATGGGTGAATCGCGCTGCGAATAC  
 GCATGTTACGATTCCCAGCAGATGTGCTACGATCTTACTCAGGAATATCAGGACGAACTTCACCGTCCCGCATTCCCCTACA  
 AGTTCAAGTTCAAGTTTCGATGCCTGCCCAACGGCTGCGTTGCTTCCATCGCACGTTCCGACTTCTCCGTGATCGGTACAT  
 GGAAAGACTCCATCAAGATCGATCAGGACGCAGTTGCCGAATACGTTGCCGGCAAGATCGCACCCAACGCCGGTGCACAC  
 TCCGGCCGCGACTGGGGCAAGTTGACATCGAAGCTGAAGTTGTTAACCGTTGCCCTCCAAGGCTCTTAGCTGGGACGG  
 TTCCAAGCTGTCCGTGAACGCCAAGGACTGCGTACGTTGCATGCACTGCATCAACACCATGCCCAAAGCTGTTGCGATCGG  
 TGACGAGCGCGGCGCCTCCATTCTGGTCCGGCGCAAAGGCTCCCATTTCTGACGGCGCCAGATGGGCTCCCTGCTGGTT  
 CCTTCATCGAAGCCAAGGACCCCTGGGACGAAGTCAAGGAAGTCATTGAGAACATCTGGGACTGGTGGATGGAAGAAAG  
 GCAAGAACC CGAACGTGTGGGTGAAACCATCAAGCGCCTCAGCCTGCAGAAGCTGCTTGAAGTTACCAATACGGCTCCC  
 CAGCCGACGACGTTGTCGAGCCTCGTTCCAACCCCTACATCTTCTTCAAGGAAGAAGAAGTTCCCGGTGGTTGGGATCGT  
 GACATCACGGAATACCGTAAGAGACACCAGCGCTAAACTTAAGAGGGGTACCCAAAAATGGCATTTCATCTTCTTGGATAC  
 AATCCCGAAAAACCGATGGAAGGTCCGATTACCGACATTGGCCCGCAGCATTACGCACAGTTCTACCCGCTGTTATCGCA  
 CGTAACAAGGGTAAGTGGCTGTACCACGAAATCATCGAACCCGGCGTTCTGGTGCACGTGGCTGAATCCGGCGAAAAAGT  
 GTACACCGTCCGTGTGGGCGCTGCACGTCTGATGTCCATCACCCACATTCCGCGAAATCTGCGAAATCGCAGACAAGCATTG



CGGCGGACATCTGCGTTTCACCACCCGTAACAACGTTGAATTCATGGTGGAAACCGAAGAAGCCATGAAAGCTCTGCGTGA  
 CGACCTTGCTTCGCGCAAGTTCGACGGCGGTTCCAAGAAGTTCCTCCCGTGGGCGGCACCGGTGCTGGTATTTCCAACATCG  
 TGACACTCAGGGCTGGGTACTGACCACACCCCGCCACCGACGCTTCCGGTCCGGTTAAGGCCATCATGGACGAAGTC  
 TTCGAAGACTTCCAGAGCATGCGCCTTCCCGTCCCGTGCATTTTCGCTGGCCTGCTGCATCAACATGTGCGGGCGCCGT  
 TCACTGCTCCGACATCGGCGTTGTGGGTATCCACCGCAAGCCCCGATGATCGACCACGCATGGACCGACCAGCTGTGCG  
 AAATCCCGCTGGCCGTTGCTTCTGCCCCACCGCCGCTGTTTCGTCACCAAGTTGAACTGGACGGCAAAAAGGTGAAC  
 AG

>AV-005-Desulfovibrio\_alaskensis

CAACGCTTCGTCGCGGCGGCGTTATCGGCCGTTACTGTGACCAGCCCGAAATGTTCCCGGCGTGGCACATTTCCACACC  
 GTCCGCGTGAACCAGCCTGCAGGTAAGTTCTACACCTCCGAATACCTGCGCAAGCTCTGCGATATCTGGGACCTGCGCGG  
 TTCCGGCCTGACCAACATGCACGGCTCCACCGGTGACATCGTTCTGCTGGGTACCACCACTCCCAGCTGGAAGAGATTTT  
 CTGGAACTGACCCACGATCTGGAACCGACCTCGGCGGTTCCGGCTCCAACCTGCGTACCCTGCTGCCTGTATGGGTG  
 AATCGCGCTGCGAATACGCATGTTACGATTCCAGCAGATGTGCTACGATCTTACTCAGGAATATCAGGACGAACTTCACC  
 GTCCCGCATTCCCCTACAAGTTCAAGTTCAAGTTTCGATGCCTGCCCAACGGCTGCGTTGCTTCCATCGCACGTTCCGACT  
 TCTCCGTGATCGGTACATGGAAGACTCCATCAAGATCGATCAGGACGCAGTTGCCGAATACGTTGCCGGCAAGATCGCAC  
 CCAACGCCGCTGCACACTCCGGCCGCGACTGGGGCAAGTTTCGACATCGAAGCTGAAGTTGTTAACCGTTGCCCTCCAAG  
 GCTCTTAGCTGGGACGGTTCCAAGCTGTCCGTGAACGCCAAGGACTGCGTACGTTGCATGCACTGCATCAACACCATGCC  
 CAAGGCTGTTGCGATCGGTGACGAGCGCGGCGCCTCCATTCTGGTCGGCGCAAAGGCTCCCATTCTCGACGGCGCCAG  
 ATGGGCTCCCTGCTGGTTCCCTTCATCGAAGCCAAGGACCCCTGGGACGAAGTCAAGGAAGTCATTGAGAACATCTGGGA  
 CTGGTGGATGGAAGAAGGCAAGAACCGCAACGTGTGGGTGAAACCATCAAGCGCCTCAGCCTGCAGAAGCTGCTTGAAG  
 TTACCAATACGGCTCCCCAGCCGACGACGTTGTGAGCCTCGTTCCAACCCCTACATCTTCTTCAAGGAAGAAGAAGTTC  
 CCGGTGGTTGGGATCGTGACATCACGGAATACCGTAAGAGACACCAGCGCTAAACTTAAGAGGGGTACCCAAAAATGGCA  
 TTCATCTTCTTGATACAATCCCAAAAACCGATGGAAGGTCGGATTACCGACATTGGCCCCGACGATTACGCACAGTTC  
 TACCCGCTGTTATCGCACGTAACAAGGGTAAGTGGCTGTACCACGAAATCATCGAACCCGGCGTTCTGGTGCACGTGG  
 CTGAATCCGGCGAAAAAGTGTACACCGTCCGTGTGGGCGCTGCACGTCTGATGTCCATCACCCACATTGCGGAAATCTGC  
 GAAATCGCAGACAAGCATTGCGGCGGACATCTGCGTTTTACCACCCGTAACAACGTTGAATTCATGGTGGAAACCGAAGAA  
 GCCATGAAAGCTCTGCGTGACGACCTTGTTCGCGCAAGTTTCGACGGCGGTTCCAAGAAGTTCCTCCGTTGGGCGGCACCG  
 GTGCTGGTATTTCCAACATCGTGACACTCAGGGCTGGGTACTGACCACACCCCGCCACCGACGCTTCCGGTCCGGTT  
 AAGGCCATCATGGACGAAGTCTTCAAGACTTCCAGAGCATGCGCCTTCCCGTCCCGTGCATTTTCGCTGGCCTGCTG  
 CATCAACATGTGCGGCGCCGTTCACTGCTCCGACATCGGCGTTGTGGGTATCCACCGCAAGCCCCGATGATCGACCAG  
 CATGGACCGACCAGCTGTGCGAAATCCCGTGGCCGTTGCTTCTGCCCCACCGCCGCTGTTTCGTCACCAAAAGGTTGA  
 AACTGGACGGCAAAAAGGTAA

>AV-007-Desulfovibrio\_alaskensis

CGTTATCGGCCGTTACTGTGACCAGCCCGAAATGTTCCCGGCGTGGCACATTTCCACACCGTCCGCGTGAACCAGCCTG  
 CAGGTAAGTTCTACACCTCCGAATACCTGCGCAAGCTCTGCGATATCTGGGACCTGCGCGGTTCCGGCCTGACCAACATG  
 CACGGCTCCACCGGTGACATCGTTCTGCTGGGTACCACCACTCCCAGCTGGAAGAGATTTTCTGGAACTGACCCACGA  
 TCTGGAACCGACCTCGGCGGTTCCGGCTCCAACCTGCGTACCCTGCTGCCTGTATGGGTGAATCGCGCTGCGAATACG  
 CATGTTACGATTCCCAGCAGATGTGCTACGATCTTACTCAGGAATATCAGGACGAACTTACCCTCCCGCATTCCCCTACAA  
 GTTCAAGTTCAAGTTTCGATGCCTGCCCAACGGCTGCGTTGCTTCCATCGCACGTTCCGACTTCTCCGTGATCGGTACATG  
 GAAAGACTCCATCAAGATCGATCAGGACGCAGTTGCCGAATACGTTGCCGGCAAGATCGCACCCAACGCCGGTGCACACT  
 CCGGCCGCGACTGGGGCAAGTTTCGACATCGAAGCTGAAGTTGTTAACCGTTGCCCTCCAAGGCTCTTAGCTGGGACGGT  
 TCCAAGCTGTCCGTGAACGCCAAGGACTGCGTACGTTGCATGCACTGCATCAACACCATGCCCAAGGCTGTTTCGATCGG  
 TGACGAGCGCGGCGCCTCCATTCTGGTCCGGCGCAAAGGCTCCCATCTCGACGGCGCCAGATGGGCTCCCTGCTGGTT  
 CCCTTATCGAAGCCAAGGACCCCTGGGACGAAGTCAAGGAAGTCATTGAGAACATCTGGGACTGGTGGATGGAAGAAGG  
 CAAGAACC CGAACGTTGGGTGAAACCATCAAGCGCCTCAGCCTGCAGAAGCTGCTTGAAGTTACCAATACGGCTCCCC  
 AGCCGACGACGTTGTGAGCCTCGTTCCAACCCCTACATCTTCTTCAAGGAAGAAGAAGTTCCTCCGGTGGTTGGGATCGTG  
 ACATCACGGAATACCGTAAGAGACACCAGCGCTAAACTTAAGAGGGGTACCCAAAAATGGCATTTCATCTTCTTGATACAA  
 TCCCAAAAACCGATGGAAGGTCGGATTACCGACATTGGCCCCGACGATTACGCACAGTTTACCCGCTGTTATCGCACG  
 TAACAAGGGTAAGTGGCTGTACCACGAAATCATCGAACCCGGCGTTCTGGTGCACGTGGCTGAATCCGGCGAAAAAGTGT

ACACCGTCCGTGTGGGCGCTGCACGTCTGATGTCCATCACCCACATTTCGCGAAATCTGCGAAATCGCAGACAAGCATTGC  
 GGCGGACATCTGCGTTTACCACCCGTAACAACGTTGAATTCATGGTGGAAACCGAAGAAGCCATGAAAGCTCTGCGTGAC  
 GACCTTGCTTCGCGCAAAGTTTCAGCGCGGTTCCAAGAAGTTCCCCGTGGGCGGCACCGGTGCTGGTATTTCCAACATCGT  
 GCACACTCAGGGCTGGGTACTGCCACACCCCCGCCACCGACGCTTCCGGTCCGGTTAAGGCCATCATGGACGAAGTCT  
 TCGAAGACTTCCAGAGCATGCGCCTTCCCGCTCCCGTGCGTATTTGCTGGCCTGCTGCATCAACATGTGCGGCGCCGTT  
 CACTGCTCCGACATCGGCGTTGTGGGTATCCACCGCAAGCCCCGATGATCGACCACGCATGGACCGACCAGCTGTGCGA  
 AATCCCCGTGGCCGTTGCTTCTGCCCCACCGCCGCTGTTCTGCCACCAAGTTGAACTGGACGGCAAAAAGGTGAACA  
 G

>BA-001-Não identificada

GTTATCGGCCGTTACTGTGACCAGCCCAGATGTTCCCCGGCGTCGCTCACTTCCACACCGTCCGCGTGGCTCAGCCCAA  
 CGGCAAGTGGTACAACACCGAGCTGCTGCGCAACCTGGTCAAGATCTGGGAGCTTCGCGGTTCCGGCCTGACCAACATGC  
 ACGGCGCCACCGGCGACATCGTGTCTTGGGCACCACCACCCCGAGCTCGAGGAAATCTTCTGGGAGCTGACCCACGA  
 CCTCGAGATCGACCTCGGCGGTTCCGGCTCCAACCTGCGTACCCCGGCCACCTGCCTCGGCATGTCCCGTTGCGAGTAC  
 GCCTGCTACGACACCCAGGAGCTGTGCTACAACCTGACCCAGGAATACCAGGACGAGCTCCATCGCCCGGCGTTCCCTA  
 CAAGTTCAAGTTCAAGTTTCAGCGGTTGCCCAACGGCTGCGTGGCCGCCATCGCTCGTTCGACCTCTCCTTCATCGGTAC  
 CTGAAAAGACCAGATCAAGGTCGACCAGGAAGCCGTCGCCGCTATGTCGGCGGTGAGATCGCTCCCAACGCCGGCGCC  
 CACGCGGGCCGCGACTGGGGTGCCTTCGACATCCAGAAGGAAGTCGTTGACCTGTGTCCGTCCAGTGCATCACCTACGA  
 AGGCGGCAAGCTGACCATCGACAACAAGGAATGCGTCCGCTGCATGCACTGCATCAACACCATGCCTCGCGCTCTGAAGG  
 TCGGTGACGAACGCGGCTGCTCCATCTGTGCGGCGCCAAGGCCCGATCCTCGACGGTCCCCAGATGGGCTCCCTGCT  
 CGTGCCTTTTCATCGAAGTCAACAAGGACGACGATTACCAGGCCATCAAGGACATCATCGAAAACGTCTGGGATTGGTGGAT  
 GGAAGAAAGGCAAGAACCCTGAGCGTATCGGTGAGACCATGAAGCGTCTGGGCATGGCCGCCCTGATCGACGCCGCCG  
 TGTCCCGGTCGACGCCCGCCAGGTTCAAGAACCTCGCCACAACCCCTACATCTTCTGAAAAGCCGAAGATGTCGAAGGT  
 GGTGGGAGCGCGACATCAACGATTTCCGCAAGCGTACCAGCGCTAAAAAGAGGAGTGTATCAATATGGCTTTTATTTCT  
 TCTGGGTACAATCCCGACAAACCGATGGAAGGTCGGATTTCCGACATCGGACCTCGTCACTTCGGCGAGTATCTGCCCC  
 GGTTATCAAAGAAAACCTTGGTAAATGGGACTACCATGAGATCATCGAGCCCGGCATCCTGCTGCACGTGGCCCAAGTCCCG  
 CGACAAGACCTACACCGTCCGCGCCGATCCGCCCGCCTGATGTCCGTCACCTCATATCCGTGAAATCTGCGACATCGCCG  
 ACAAGTTCTCCGCGGTTACGTCCGTTTACCACCCGCAACAACCTCGAGTTCCAGGTCGAGACCGAAGAGGCCGCCAAG  
 GAACTGAAGGCCCTTCTGAACGAGCAGAAGTTCCCGCGGAGCCTACAAGTTCCCGGTGCGCGGCACCGGCGCCGGTG  
 TGACGAACATCGTCCACACCCAGGGTTGGGTCCACTGCCACACCCCGGCCACCGACGCTTCGGGTACCGTCAAGGCCAC  
 CATGGACGTGCTTTCGACGACTTACCAGACATGAAGCTGCCCGCCCGGTGCGCATCTCCATGGCCTGCTGCCTGAACA  
 TGTGCGGCGCGGTGCACTGCTCCGATATCGCCATTCTCGGTATCCACCGCAAACCGCCCTCATCGACCACAAGTTCCTC  
 GACAACCTGTGCGAGATTCCCCTGGCCGTGGCCGCTGCCACCCGGTGCAGTCCGTCCGTCCAAGGTGCGAGCTCGACG  
 GCGAGACCTACAAGACCG

>BRS-001-Desulfovibrio\_vulgaris

ATGGATCGTCGCGGCGGCGTATCGGCCGTTACTGTGACCAGCCGAAAAGTTCCCCGGCGTGGCGCACTTCCATACCGT  
 GCGCGTGGCCAGCCTTCCGGCAAGTACTACTCTGCCACTACCTGCGCCAGCTGTGCGACATCTGGGACCTGCGCGGT  
 TCCGGTCTGACCAACATGCACGGCTCCACGGGTGACATCGTTCTCCTCGGCACGCAGACCCCCAGCTCGAAGAAATCTT  
 CTTGAACTGACCCACAACCTGAACACCGACCTTGGTGGTTCCGGTTCGAACCTGCGTACCCCTGAATCGTGCCTCGGCAA  
 GTCGCGTTGCGAATTCGCTGCTACGACTCTCAGGCCGCTGCTACGAACTGACCATGGAATACCAGGACGAACTGCACC  
 GTCCGGCGTTCCCTACAAGTTCAAGTTCAAGTTTCGACGCTGCCCAACGGCTGCGTGGCCTCCATCGCCGTTCCGAC  
 TTCTCGGTATCGGTACCTGGAAGGACGACATCAAGATCGACGCCGAAGCCGTCAAGGCCTACGTGGCCGGTGAGTTCAA  
 GCCCAACGCCGGTGCCACTCCGGTCTGACTGGGGCAAGTTTCGACATCGAAGCCGAAGTCGTAATCGCTGCCCTCC  
 AAGTGCATGAAGTGGGACGTTCCAAGCTGTCGATCGACAACAAGGAATGCGTCCGTTGCATGCACTGCATCAACACCATG  
 CCCCAGCCCTGCACATCGGCGACGAGCGTGGCGCCTCCATCCTCTGCGGTGCGAAGGCTCCCATCCTCGACGGTGGCC  
 AGATGGGCTCTGCTGTTCCCTTCGTCGCCCGCAAGAGCCCTTCGACGAGATCAAGGAAGTGCCTGAGAAGATCTGG  
 GACTGGTGGATGGAAGAAGGCAAGAACCGGAGCGCCTCGGCGAGACCATGAAGCGCCTCAGCTTCCAGAAGCTGCTCG  
 AAGTGAACGAAATCGCTCCGGTGCCCCAGCATGTCAAGGAACCCCGCACCAACCCGTACATCTTCTCAAGGAAGAAGAA  
 GTACCTGGTGGCTGGGATCGCGACATCACGGAATACCGCAAGAGACACCTGAGATAAGAAGAGGGGTGCAAGAAAGATGG  
 CATTATATCTTCCGGGTACAATCCCGAAAAGCCGATGGCAAACCGTATCACGGACATCGGCCCCCGCAAGTTTCGACGAGT

TCTTCCCGCCGGTCATTGCCAAGAACTTCGGTTCGTGGCTGTACCATGAGATCCTCGAGCCCGGCGTGCTCATGCACGTG  
 GCCGAGTCCGGCGACAAGGTGTACACCGTACGCGTTGGTGTCTGCTCGCTGATGTGATCACCCACATCCGCGAGATGTG  
 CGACATCGCCGACAAGTACTGCGGCGGTACCTGCGCTTACCACGCGTAACAACGTGGAATTCATGGTCGCCGACGAGG  
 CTAGCCTCAAGGCCCTGAAGGAAGACCTCGCCAGCCGCAAGTTCGACGGCGGCTCGCTCAAGTTCCCCATCGGCGGCAC  
 CGGCGCTGGCGTGAGCAACATCGTTCACACCCAGGGCTGGGTACACTGCCACACCCCTGCGACCGACGCCTCCGGCCCCG  
 GTCAAGGCGATCATGGACGAAGTCTTCAAGACTTCCAGAGCATGCGCCTTCCCGCTCCGGTTCGCATCTCGCTGGCTTG  
 CTGCATCAACATGTGCGGCGCCGTTCACTGCTCCGACATCGGCGTTGTGGGTATCCACCGCAAGCCCCCGATGATCGACC  
 ACGAGTGGACCGACCAGCTGTGCGAAATCCCGCTGGCCGTTGCCTCCTGTCCACCGCTGCGGTGCGTCCCACCAAGCT  
 GGAAATCGGCGACAAGAAGGTCAACACCAT

>DV-002-Desulfovibrio vulgaris

TCATCGGCCGTTACTGTGACCAGCCCGAAAAGTTCGCCGGCGTGCGCACTTCCATACCGTGCAGCGTGGCCAGCCTTCC  
 GGCAAGTACTACTCTGCCGACTACCTGCGCCAGCTGTGCGACATCTGGGACCTGCGCGGTTCCGGTCTGACCAACATGCA  
 CGGCTCCACGGGTGACATCGTTCTCCTCGGCACGCAGACCCCCAGCTCGAAGAAATCTTCTTCAAGTACCCACAACC  
 TGAACACCGACCTTGGTGGTTCGGTTCGAACCTGCGTACCCCTGAATCGTGCCTCGGCAAGTCGCGTTGCGAATTCGCC  
 TGCTACGACTCTCAGGCCGCTGCTACGAAGTACCATGGAATACCAGGACGAAGTGCACCGTCCGGCGTTCCTTACAA  
 GTTCAAGTTCGAAGTTCGACGCCTGCCCAACGGCTGCGTGGCCTCCATCGCCCGTTCGACTTCTCGTTCATCGGTACCT  
 GGAAGGACGACATCAAGATCGACGCCGAAGCCGTCAAGGCCTACGTGGCCGGTGAGTTCAAGCCCAACGCCGGTGCCCA  
 CTCCGGTTCGTGACTGGGGCAAGTTCGACATCGAAGCCGAAGTCGTCAATCGCTGCCCTCCAAAGTGCATGAAGTGGGACG  
 GTTCCAAGCTGTGATCGACAACAAGGAATGCGTCCGTTGCATGCACTGCATCAACACCATGCCCCGCGCCCTGCACATC  
 GCGACGAGCGTGGCGCCTCCATCCTCTGCGGTGCGAAGGCTCCCATCCTCGACGGTGCCAGATGGGCTCTCTGCTGG  
 TTCCCTTCGTGCGCGCCGAAGAGCCCTTCGACGAGATCAAGGAAGTCGTGAGAAAGATCTGGGACTGGTGGATGGAAGAA  
 GGCAAGAACCAGCGAGCGCCTCGGCGAGACCATGAAGCGCCTCAGCTTCCAGAAGTGTGCGAAGTACCGGAAATCGCTC  
 CGGTGCCCCAGCATGTCAAGGAACCCCGCACCAACCCGTACATCTTCTTCAAGGAAGAAGAAGTACCTGGTGGCTGGGAT  
 CGCGACATCACGAATACCGCAAGAGACACCTGAGATAAGAAGAGGGGTGCAGAAAGATGGCATTATATCTTCCGGGTA  
 CAATCCCGAAAAGCCGATGGCAAACCGTATCACGGACATCGGCCCCCGCAAGTTCGACGAGTTCCTCCCGCCGGTCATTG  
 CCAAGAACTTCGGTTCGTGGCTGTACCATGAGATCCTCGAGCCCGGCGTGCTCATGCACGTGGCCGAGTCCGGCGACAAG  
 GTGTACACCGTACGCGTTGGTGTGCTCGCCTGATGTGATCACCCACATCCGCGAGATGTGCGACATCGCCGACAAGTA  
 CTGCGGGCGGTACCTGCGCTTACCACGCGTAACAACGTGGAATTCATGGTCGCCGACGAGGCTAGCCTCAAGGCCCTGA  
 AGGAAGACCTCGCCAGCCGCAAGTTCGACGGCGGCTCGCTCAAGTTCCTCCATCGGCGGCACCGGCGCTGGCGTGAGCAA  
 CATCGTTACACCCAGGGCTGGGTACACTGCCACACCCCTGCGACCGACGCCTCCGGCCCGGTCAAGGCGATCATGGAC  
 GAAGTCTTCAAGACTTCCAGAGCATGCGCCTTCCCGCTCCGGTTCGCATCTCGCTGGCTTGTGATCAACATGTGCGG  
 CGCCGTTCACTGCTCCGACATCGGCGTTGTGGGTATCCACCGCAAGCCCCGATGATCGACCACGAGTGGACCGACCAG  
 CTGTGCGAAATCCCGCTGGCCGTTGCCTCCTGTCCACCGCTGCGGTGCGTCCCACCAAGCTGGAATCGGCGACAAGAA  
 GGTCAACACCA