**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Descrição da comunidade microbiana ativa em solos de
manguezais por metagenômica e metatranscriptômica**

Luana Lira Cadete

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2014**

Luana Lira Cadete
Engenheira Agrônoma

**Descrição da comunidade microbiana ativa em solos de manguezais por
metagenômica e metatranscriptômica**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO DINI ANDREOTE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Cadete, Luana Lira

Descrição da comunidade microbiana ativa em solos de manguezais por metagenômica e metatranscriptômica / Luana Lira Cadete. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.
83 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. RNA 2. DNA 3. Bactéria 4. Arquéias 5. Ciclo do nitrogênio 6. Ciclo do enxofre
I. Título

CDD 631.46
A559d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

A Deus que nos guia, a cada dia,
com seu amor eterno,
e me deu a oportunidade de
realizar esse sonho.

Aos meus queridos pais, Anunciada e Vivaldo,
minha irmã Luciana, meu cunhado Flávio,
e meu sobrinho Pedro.

A meus pais por toda paciência, carinho e amor,
A minha irmã por tudo que ela representa pra mim.
A meu cunhado por ser um exemplo de integridade, trabalho, marido e pai.
A meu sobrinho que amo tanto.
Por fim, pelo incentivo, carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Fernando Dini Andreote, por ter me dado esta oportunidade, junto a seu excelente grupo de pesquisa, por ter me apoiado e acreditado e me orientado durante esta etapa de minha vida.

Às agências CAPES e CNPq, pela concessão de apoio financeiro.

Aos técnicos Denise, Fernando, João Silva, pela boa disposição de ajudar, sempre, e a secretária da PGG Microbiologia Agrícola Maria Fernanda pelo apoio valoroso.

A todos os colegas que conheci durante o curso de pós-graduação, com quem passei ótimos momentos e vivi ricas experiências.

A meus colegas de laboratório pela convivência; Ademir, Cristiane, Danice, Danielle, Diogo, Dorotéia, Fábio, Filipe, Joelma, Júlia, Juliana, Marcus Vinícius. Maryeimy, Michele, Mylenne, Pedro e Simone,

Aos colegas Diogo Pedro, pelo apoio em especial, na minha chegada a Piracicaba, Greice, Marcos Guilherme, Maryeimy e Nelson, pelo convívio.

A meus amigos que conquistei em Piracicaba Yesid Mariño, Maryeimy e Nelson pela amizade e apoio. A meus colegas latinos, Eleonora, Silvia e Stalin, pelas festas rizadas e coleguismo.

Aos meus colegas de graduação e iniciação científica, na Universidade Federal Rural de Pernambuco, na pessoa da professora Júlia Kuklinsky Sobral, por quem rego sinceros agradecimentos, por todo o apoio e amizade, que me oferece, muito obrigada.

A minha família, por todo apoio e carinho, sempre com muito amor, obrigada por sempre estarem comigo, em todos os momentos, mesmo de longe, e desculpas pela ausência em momentos importantes.

E a todos contribuíram de alguma forma para esta realização, fica uma sincero sentimento de muito obrigada!!!

EPÍGRAFE

“Até os adolescentes podem esgotar-se, e jovens robustos podem cambalear,
Mas aqueles que contam com o senhor
Renovam suas forças;
Ele dá-lhes asas de águia.
Correm sem se cansar,
Vão para frente sem se fatigar.”

ISAÍAS, 40,30-31.

“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.
Antoine de Saint-Exupéry

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	19
2 OBJETIVOS E HIPÓTESES	23
3 DESENVOLVIMENTO	25
3.1 Revisão Bibliográfica	25
3.1.2 Características do ecossistema de manguezais	25
3.1.3 Diversidade microbiana nos solos de manguezais	26
3.1.4 Ciclo do nitrogênio - grupos envolvidos na fixação e desnitrificação em solos de manguezais	28
3.1.5 Grupos microbianos envolvidos no ciclo do enxofre em solos de manguezais	31
3.1.6 Abordagem Metagenômica e Metatranscriptômica	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Áreas de estudo e delineamento experimental	35
4.2.1 Sequenciamento em larga escala via Illumina HiSeq 2000	37
4.2.2 Processamento das sequências obtidas	38
5.1 Obtenções das sequências por metagenômica e metatranscriptômica	41
5.2 Comparação entre os perfis taxonômicos e funcionais das diferentes áreas de manguezais	41
5.2 Análises taxonômicas	43
5.2.1 Análises taxonômicas das sequências relacionadas ao domínio Bacteria	44
5.4 Análises das sequências relacionadas ao Domínio Archaea	50
5.3 Análises Funcionais	53
5.3.1 Categorias COG e KEGG acessados no metagenoma e metatranscriptoma aplicados a solos de manguezais	54
5.3.2 Vias metabólicas Envolvidas no Ciclo do Nitrogênio e Enxofre	57
5.3.3 Microrganismos Envolvidos no Ciclo do Nitrogênio e Enxofre em Solos de Manguezais	62
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
REFERÊNCIAS	71

RESUMO

Descrição da comunidade microbiana ativa em solos de manguezais por metagenômica e metatranscriptômica

Alguns ecossistemas chamam atenção devido à particular combinação de condições ambientais únicas, que resultam na evolução de espécies capazes de colonizar estes ambientes. Os manguezais compõem um bioma composto por espécies de plantas, animais e microrganismos que interagem neste ambiente, que tem como principal característica a interface entre o continente e o oceano em regiões intertropicais. Nosso objetivo foi acessar via sequenciamento massivo de DNA e RNA (via Illumina HiSeq 2000) o perfil taxonômico e funcional da comunidade microbiana de quatro manguezais com distintos níveis de contaminação. As sequências foram analisadas na plataforma MG-RAST, para a análise taxonômica foi utilizado BlastN contra a base de dados RDP ou M5Nr, enquanto que a análise funcional foi baseada na comparação por BlastX das sequências obtidas com as disponíveis no banco de dados M5RNA e M5Nr. Na análise funcional, as sequências classificadas foram ainda integradas na classificação hierárquica SEED (subsystems), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) e COG (Clusters of Orthologous Group). No total, foram obtidas 682 milhões de sequências válidas (88,2, 303,1 e 290,9 milhões a partir das análises de DNA, RNA total e RNA purificado, respectivamente). Estas indicaram como grupos taxonômicos mais abundantes as classes Gammaproteobacteria e Deltaproteobacteria (dentro do domínio Bacteria), e Methanomicrobia e Methanobacteria (dentro do domínio Archaea). Além destas observações, alterações na representação de determinados grupos quando as análises de DNA e RNA são comparadas. Em relação a classificação funcional das sequências, foi possível observar uma similaridade no número de funções encontradas nos diferentes manguezais, mas uma maior quantidade de sequências anotadas foi observada, como esperado, na análise de DNA. De maneira mais detalhada, o estudo das funções relacionadas a transformação de nitrogênio e enxofre indicou que há uma correlação entre a abundância de sequências de um referido gene na análise metagenômica, e sua correspondente quantidade dentro dos grupos de dados de metatranscriptômica. Os grupos microbianos mais representados nestes ciclos foram Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria, atuantes principalmente nos processos de fixação de nitrogênio atmosférico (N_2), desnitrificação e redução de sulfato, enquanto que para oxidação do enxofre as classes mais frequentes foram Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria e Epsilonproteobacteria. De maneira geral, este estudo fornece indícios sobre a atividade microbiana nos manguezais, e indica que as frequentemente correlações observadas entre os resultados da análise metagenômica e metatranscriptômica, porém essas correlações se tornam menos evidentes quando analisamos em nível de ordem ou em níveis mais específicos.

Palavras-chave: RNA; DNA; Bactérias; Arquéias; Ciclo do nitrogênio; Ciclo do enxofre

ABSTRACT

Description of active microbial community in mangrove soils by metagenomics and metatranscriptômica

Some ecosystems call particular attention due to unique combination of environmental conditions that result in evolution of species capable of colonizing these environments. Mangroves constitute a biome composed of species of plants, animals and micro-organisms that interact in this environment, whose main characteristic is the interface between the continent and the ocean in tropical areas. Our goal was to access via massive sequencing of DNA and RNA (via Illumina HiSeq 2000) the taxonomic and functional profile of the microbial community four mangroves with different levels of contamination. The sequences were analyzed on MG-RAST platform for taxonomic analysis was performed using BLASTN against the RDP database or M5NR, while the functional analysis was based on comparison of the sequences obtained by BlastX available on M5RNA with the database and M5Nr. In functional analysis, the sequences were classified yet integrated into the hierarchical classification SEED (subsystems), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) and COG (Clusters of Orthologous Group). A total of 682 million valid sequences were obtained (88.2, 303.1 and 290.9 million from DNA analyzes, purified total RNA and RNA, respectively). These indicated as the most abundant taxa Gammaproteobacteria and Deltaproteobacteria classes (within the domain Bacteria), and Methanomicrobia and Methanobacteria (within the domain Archaea). In addition to these observations, changes in the representation of particular groups when analyzes of DNA and RNA are compared. Regarding the functional classification of the sequences was observed in the number of a similarity functions found in different mangrove, but a greater amount of annotated sequences was observed, as expected, the analysis of DNA. In more detail, the study of the functions related to transformation of nitrogen and sulfur indicated that there is a correlation between the abundance of sequences of said gene in metagenomic analysis, and its corresponding quantity within the metatranscriptômica data groups. The microbial groups were over-represented in these cycles and Deltaproteobacteria Gammaproteobacteria mainly active in nitrogênioatmosférico fixation processes (N₂), the denitrification and sulfate reduction, while for sulfur oxidation were the most frequent class Gammaproteobacteria, and Betaproteobacteria Epsilonproteobacteria. Overall, this study provides evidence of microbial activity in the mangroves, and often indicates that the correlations observed between the results of metagenomics and metatranscriptômica analysis, but these correlations become less evident when we look at order level or other specific levels.

Keywords: RNA; DNA; bacteria; Archaea; Nitrogen cycle; Sulfur cycle

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Perfil de amostragem. Área situada na cidade de Bertioga: Oil Mgv- contaminada com óleo, subdividida em BrMgv01 – baixa contaminação e BrMgv02- alta contaminação, AntMgv- contaminação antropogênica. Área situada na cidade de Cananéia: PrsMgv- sem contaminação aparente, BrMgv04..... 35
- Figura 2 - PCoA baseada na matriz de similaridade *Bray–Curtis*, das quatro áreas BrMgv01, BrMgv02, BrMgv03 e BrMgv04, com base no DNA total RNA total e RNA enriquecido. Os dados foram anotados automaticamente via blastX, utilizando MG-RAST e os bancos de dados M5NR e SEED, para os níveis de classe (taxonômico) e nível 3 (funcional)..... 43
- Figura 3 – Distribuição da classificação das sequências afiliadas ao domínio Bactéria (ao nível de classe nas análises baseadas no DNA e RNA dos solos de manguezais estudados (A - BrMgv01,B- BrMgv02, C - BrMgv03 e D - BrMgv04). Os valores são indicados como frequência relativa (log 10), e os pontos coloridos indicam classes com diferença significativa (segundo o teste *Welch's t-test* a 95% de confiança (STAMP®): em vermelho (*) - classes que apresentaram diferença estatística em todos os manguezais, e com Preto (#) - classes que apresentaram diferenças estatísticas no manguezal referido, O círculo delimita as classes mais frequentes do filo proteobacteria..... 45

- Figura 4 - Distribuição da classificação das sequências afiliadas ao domínio Archaea (ao nível de classe nas análises baseadas no DNA e RNA dos solos de manguezais estudados (A - BrMgv01, B - BrMgv02, C - BrMgv03 e D - BrMgv04). Os valores são indicados como frequência relativa ($\log 10$), e os pontos coloridos indicam classes com diferença significativa (segundo o teste *Welch's t-test* a 95% de confiança (STAMP®): em vermelho (*) - classes que apresentaram diferença estatística em todos os manguezais, e com Preto (#) - classes que apresentaram diferenças estatísticas no manguezal referido..... 53
- Figura 5 - Anotação funcional utilizando COG - *Clusters of Orthologous Groups* (nível 2) baseadas no DNA (A) e RNA (B) dos solos de manguezais estudados (BrMgv01, BrMgv02, BrMgv03 e BrMgv04)..... 56
- Figura 6 - Distribuição das funções metabólicas – KEEG-(nível 2) baseadas no DNA e RNA dos solos de manguezais estudados (A - BrMgv01, B - BrMgv02, C - BrMgv03 e D - BrMgv04). Os valores são indicados como frequência relativa ($\log 10$), e os pontos coloridos indicam classes com diferença significativa (segundo o teste *Welch's t-test* a 95% de confiança (STAMP®): em vermelho (*) - funções que apresentaram diferença estatística em todos os manguezais, e com Preto as funções que apresentaram diferenças estatísticas no manguezal referido..... 56
- Figura 7 - Mapa metabólico (KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) parâmetros: máximo e-valor $1e^{-5}$, Mínimo de identidade 60% mínimo comprimento de alinhamento de 15pb. A - Ciclo do Nitrogênio.* vias com maior número de *hits* (maior abundância de sequências); B- Vias metabólicas selecionadas para análises posteriores..... 59

Figura 8 - Mapa metabólico (*KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), parâmetros: máximo e-valor $1e^{-5}$, Mínimo de identidade 60 % mínimo comprimento de alinhamento de 15pb. A - Ciclo do Enxofre,* vias com maior número de *hits* (maior abundância de sequências); B- Vias metabólicas selecionadas para análises posteriores..... 61

Figura 9 – PCoA baseada na matriz de similaridade Bray–Curtis, para sequencias dos ciclos do nitrogênio (Fixação e desnitrificação) e enxofre (redução e oxidação), nas quatro áreas BrMgv01, BrMgv02, BrMgv03 e BrMgv04, com base no DNA total RNA total e RNA. Os dados foram anotados automaticamente blastX, utilizando MGRAST utilizando os bancos de dados M5NR e SEED, para os níveis de classe e de função..... 63

Figura 10 – Microrganismos que participam dos ciclos do nitrogênio (Fixação e Desnitrificação) e enxofre (Redução e Oxidação)..... 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das quatro áreas de manguezais estudadas por nossa equipe, a serem exploradas no presente projeto (ANDREOTE et al., 2012).....	35
Tabela 2 - Informações sobre características gerais das bibliotecas (DNA e RNA) das sequencias obtidas.....	41
Tabela 3 - Distribuição dos grupos bacterianos acima de 1%, em nível de classe. Os dados foram anotados automaticamente blastX, utilizando MG-RAST e os bancos de dados M5NR e M5NRNA, a 80% de similaridade, para o DNA e RNA, respectivamente....	49
Tabela 4 - Distribuição dos grupos de arqueias acima de 1%, a nível de classe. Os dados foram anotados automaticamente blastX, utilizando MGRAST utilizando os bancos de dados M5NR e M5NRNA, a 80% de similaridade, para o DNA e RNA, respectivamente.....	52
Tabela 5 - Riqueza de funções acessadas por meio da base de dados <i>KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> e categorias por meio da base de dados <i>COG - Clusters of Orthologous Groups</i>) - via <i>metagenômica</i> e <i>Metatranscriptômica</i>	55
Tabela 6 - Número de sequencias afiliados as vias do ciclo do nitrogênio e enxofre, anotação realizada utilizando o banco de dados Subsystems.....	61

1 INTRODUÇÃO

Os manguezais são áreas localizadas nas planícies de inundao das mars, compondo um dos ambientes naturais mais degradados no Brasil, onde ocorrem srios impactos ambientais. O Brasil tem uma das maiores extenses de manguezais do mundo, desde o Cabo Orange no Amap at o municpio de Laguna em Santa Catarina, abrangendo uma rea de 25.000 Km² (MAYER et al., 2008).

Os microrganismos exercem funo crucial nos ciclos biogeoqumicos destes locais, participando do fluxo de energia nesses ecossistemas e influenciando a disponibilidade destes nutrientes a nvel global. O emprego de abordagens como metagenmica e metatranscriptmica, possibilita uma viso mais geral e fiel da taxonomia e funcionalidade dos grupos microbianos que ocorrem neste ambiente (MAYER et al., 2008; LESNIEWSKI et al., 2012)

Recentemente, as comunidades bacterianas totais, diazotrficas, oxidadoras e redutoras de enxofre, presentes nos solos de manguezais do Estado de So Paulo, foram avaliadas quanto estrutura, abundncia e diversidade, descrevendo assim, possveis grupos e genes que so diferentemente selecionados no ecossistema manguezal, sendo estes principalmente afiliados as classes Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria, entre outras (ANDREOTE et al., 2012; DIAS et al., 2012; VARON-LOPEZ et al., 2014). Estes trabalhos mostraram ainda a estruturao distinta, destas comunidades, quando acessadas em manguezais sob diferentes estgios de contaminao. No entanto, estas anlises baseadas em DNA deixam em aberto a similaridade entre os padres observados e aqueles obtidos com base em molculas mais relacionadas a funcionalidade microbiana nos solos de manguezais (RNA e proteinas).

Dessa forma, o uso de metodologias que acessam o funcionamento dos grupos microbianos nos manguezais, bem como a descrio dos grupos que hospedam genes relacionados a importantes transformaes neste sistema, importante no avano do conhecimento sobre este ambiente, encontrado apenas em regies tropicais e subtropicais de nosso planeta.

2 OBJETIVOS E HIPÓTESES

O presente projeto visa dar continuidade aos trabalhos desenvolvidos pelo grupo no qual a dissertação se insere, buscando entender por metodologias independentes de cultivo, com base em moléculas de DNA e RNA, a ocorrência de grupos e funções importantes em solos de manguezais. Dessa forma, dentro deste projeto os objetivos específicos podem ser divididos da seguinte maneira:

- Caracterizar o perfil taxonômico da comunidade microbiana em solos de quatro áreas de manguezais com base no sequenciamento de RNA total do solo;
- Caracterizar o perfil funcional da comunidade microbiana em solos de quatro áreas de manguezais com base no sequenciamento de RNAm do solo;
- Comparar os dados obtidos com sequenciamento de RNA com os obtidos com o sequenciamento de DNA das mesmas amostras;
- Acessar via sequenciamento massivo de DNA e RNA grupos importantes nos ciclos biogeoquímicos do enxofre e do nitrogênio em solos de manguezais, descrevendo a ocorrência de processos predominantes, e a taxonomia dos organismos promotores destas transformações;
- Dar subsídios a projetos futuros que poderão descrever a modulação da expressão dos genes em diferentes cenários de ocorrência nos solos de manguezais.

Tais objetivos deverão auxiliar na comprovação das seguintes hipóteses que sustentam este projeto:

- A diversidade taxonômica dos microrganismos que habita solos de manguezais, quando caracterizada com base no RNA ambiental, é diferente daquela encontrada com base na análise de DNA;
- Áreas de manguezais distintas em relação à contaminação ambiental apresentam perfis diferenciais de expressão gênica (RNA), que são melhores diferenciados do que quando as comparações feitas com base em dados metagenômicos (DNA).
- A abundância de sequências de DNA e RNA podem indicar, por serem similares, os processos mais abundantes nos solos de manguezais, relacionados as transformações de nitrogênio e enxofre.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 Revisão Bibliográfica

3.1.2 Características do ecossistema de manguezais

Os manguezais estão localizados em ambientes costeiros alocados nas zonas tropicais e subtropicais, e apresentam certas peculiaridades, dentre elas a transição entre o continente e o ecossistema marinho, sob a influência de água doce e salobra abrigando grande riqueza biológica da fauna, flora e microbiota (ANDREOTE et al., 2012; DIAS et al., 2012; MAITI, et al., 2013).

A população mundial reconhece a importância dos ecossistemas de manguezais, que contribui na proteção dos continentes contra catástrofes naturais, na regulação natural do clima, servindo de abrigo e alimento para organismos marinhos e terrestres, e como fontes de recursos naturais para sociedade (BARKER, 2009; KRAUSS et al., 2014). Estudos recentes mostram que os manguezais estão sob forte pressão de degradação, sendo que somente entre 1980 e 2005 houve uma redução de 30% a 50% da área de manguezais no mundo, como resultado do desenvolvimento urbano e mudanças climáticas (HOLGUIN et al., 2006; MAITI et al., 2013; ELLEGAARD et al., 2014). Esse ecossistema está sujeito a flutuações ao longo do dia, passando da condição alagada a seca em questões de horas alterando o potencial redox, salinidade, aeração dos solos entre outros (BARKER, 2009).

Os solos são influenciados diretamente pelas raízes e pneumatóforos de plantas como *Rhizophora mangle*, *Avicennia schaueriana* e *Laguncularia racemosa*, que são dominantes em manguezais do Brasil (DIAS et al., 2011, LIMA et al., 2013; ARRIVABENE et al., 2014). Essas plantas possuem características de tolerância à salinidade e se mostram eficientes na liberação de nutrientes nos solos pela exsudação radicular, meio pelo qual também promovem a oxigenação do ambiente (FERREIRA et al., 2007, KRAUS et al., 2014).

As constantes mudanças desse ecossistema controlam processos relacionados aos ciclos biogeoquímicos e a dispersão microbiana, sendo que há nesses locais uma complexa gama de interações que influenciam o ambiente, tanto localmente como globalmente (BOLHUIS, 2013). Em termos locais, as mudanças ocorridas nesses habitats regulam a dinâmica das comunidades de microrganismos, plantas e animais, e assim a produção primária e secundária, levando a degradação do

sistema a impactos ambientais e socioeconômicos. Em termos globais esses locais têm papel fundamental na ciclagem de nutrientes, em particular, nitrogênio, carbono, fósforo e enxofre (DIAS et al., 2012; TAKETANI et al., 2009; BARKER, 2009; VARON-LOPEZ et al., 2014). Assim, a comunidade microbiana exerce papel fundamental para a manutenção da rede trófica e o fluxo de energia nesse ecossistema.

3.1.3 Diversidade microbiana nos solos de manguezais

As comunidades microbianas estão associadas a questões de saúde, alimentação (vegetal ou animal), degradação de poluentes, aplicações para biotecnologia. Além disso são conhecidas como fontes genéticas valiosas tendo sua diversidade metabólica como resultado de um processo evolutivo pela responsabilidade de atuar na base da cadeia trófica e na manutenção dos ciclos biogeoquímicos em todos os ambientes (DAVID, 2012; LEIS et al., 2013). Para exemplificar a relevância da comunidade microbiana, estima-se que comunidade microbiana possui em sua biomassa cerca de 10 vezes mais carbono e nitrogênio, que as plantas (DAVID, 2012; PROSSER et al., 2007; BROOKER et al., 2009).

Os manguezais são ambientes altamente variáveis e dinâmicos permitindo o sucesso ecológico de muitos grupos microbianos. Essa diversidade pode variar com o local, a profundidade, a sazonalidade e as condições físicas e químicas do ambiente que exercem pressão seletiva sobre as comunidades, sua estrutura e funcionalidade (DIAS et al., 2010; MENDES et al., 2011; VARON-LOPEZ et al., 2014).

A microbiota exerce papel fundamental no funcionamento nos ambientes, exibindo diversidade taxonômica e plasticidade funcional. Essa diversidade acessada em solos de manguezais brasileiros é dominada por organismos pertencentes aos filos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes e Chloroflexi (ANDREOTE et al., 2012). De maneira mais específica, num manguezal localizado na cidade de Cananéia (mais especificamente na Ilha do Cardoso), a análise do gene 16S RNAr via método Sanger revelou a predominância de bactérias afiliadas a Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Acidobacteria (DIAS et al., 2010), enquanto que grupos minoritários se afiliaram a Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes. Em uma análise

mais completa, com base no gene ribossomal 16S RNAr por meio de pirosequenciamento, foi observado uma configuração diferenciada da comunidade microbiana (VARON-LOPEZ, 2014). Neste estudo, amostras de distintos manguezais foram utilizadas, sendo em todas elas verificada a predominância de sequências afiliadas a Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria.

As comunidades de arqueias também foram acessadas em distintos solos de manguezais do Brasil. Recentemente, esse grupo procarioto foi classificado, recentemente, dentro dos filos Aenigmarchaeota, Crenarchaeota, Diapherotrites, Euryarchaeota, Geoarchaeota, Nanoarchaeota, Nanohaloarchaeota, Parvarchaeota, Korarchaeota, e Thaumarchaeota (KOZUBAL et al., 2013; RINKE et al., 2013). As arqueias representam um grupo abundante e diverso em solos de manguezais, onde a ocorrência de grupos endêmicos foi recentemente sugerida (DIAS et al., 2011). Amostrando áreas de manguezais do estado de São Paulo, foram descritos como filos mais abundantes Euryarchaeota, Crenarchaeota e Thaumarchaeota (DIAS et al., 2011), sendo que em condições de contaminação antropogênicas o filo Thaumarchaeota se manteve em maior número (MENDES et al., 2012). As arqueias participam de forma significativa nos ciclos biogeoquímicos em manguezais, principalmente pela ação de grupos metanogênicos e oxidantes de amônio (VETRIANE et al., 1999, TAKETANI et al., 2010; DIAS et al., 2011, MENDES et al., 2012).

Na busca de microrganismos com potencial biotecnológico em solos de manguezais, bactérias afiliadas as ordens *Vibrionales*, *Actinomycetales* e *Bacillales* provenientes dos solos de manguezais foram caracterizadas quanto a sua capacidade de produzir diversas enzimas, como amilases, esterases, proteases e lipases (DIAS et al., 2009). A produção de enzimas relacionadas a degradação da celulose, como as endoglucanases e exoglucanases foram também observadas em isolados bacterianos, sendo os grupos mais amplamente representados pertencentes aos gêneros *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas* e *Bacillus* (SOARES et al., 2013).

No entanto, apesar desta ampla descrição de grupos microbianos em manguezais, ainda necessita-se aplicar estudos que visem a descrição da funcionalidade da microbiota dos manguezais, bem como as alterações sobre cada função devido a estes fatores analisados em outros estudos.

3.1.4 Ciclo do nitrogênio - grupos envolvidos na fixação e desnitrificação em solos de manguezais

O nitrogênio é um dos elementos mais abundantes em nosso planeta, perfazendo quase 80% da atmosfera terrestre. A entrada desse elemento na biosfera, por processos naturais, ocorre por meio de descargas elétricas (raios) (SUMMERS et al., 2012) e por meio da ação de diversos grupos de micro-organismos procarióticos, pertencente ao domínio Bacteria Arquéias também são encontradas frequentemente em análises de gene *nifH*, no entanto até o momento não foi possível confirmar a atividade fixadora de nitrogênio nesses grupos (DEKAS et al., 2013).

No ciclo do nitrogênio, vários processos ocorrem continuamente como a fixação de nitrogênio, oxidação do amônio (nitrificação), desnitrificação e *anammox*, redução dissimilatória e assimilatória de nitrato a amônia (VOSSENBERG et al., 2012).

Mais de 99% do nitrogênio da superfície da terra está disponível na forma de gás N_2 , que deve ser reduzido a amônia, a fim de ser assimilado pelos organismos para a síntese de proteínas. Essa redução (fixação) é possível somente pela atividade de um complexo enzimático denominado nitrogenase, uma vez que o nitrogênio é reduzido a amônia (NH_3) é incorporado na matéria orgânica ou reage com água, gerando o íon amônio (NH_4^+). A partir desse processo de fixação, o nitrogênio fica sujeito a uma série de reações de oxirredução que faz parte dos processos reativos do ciclo deste elemento nos ecossistemas (MIRZA et al., 2014; VOSSENBERG et al., 2013)

A fixação do nitrogênio é um dos processos biológicos mais importantes e essenciais para vida, atuando como principal processo de disponibilização de nitrogênio nos sistemas naturais (DIXON et al., 2004; SANTOS et al., 2012; VITOUSEK et al., 2012). Mais de 100 gêneros de bactérias e arqueias, que apresentam o gene *nif*, que codifica enzimas essenciais para o funcionamento do complexo nitrogenase (RAIMOND et al., 2004). Esta ampla distribuição do complexo enzimático nitrogenase é suportado pelas evidências de que este seja mobilizado por transferência horizontal, sendo atuante em organismos com grande variedade de contextos metabólicos, tanto baseados em metabolismo aeróbio como anaeróbio (DIXON et al., 2004; RAYMOND et al., 2003; ZEHR et al., 1993).

Os principais grupos de microrganismos fixadores de nitrogênio são bactérias verdes do enxofre, Firmicutes, Actinobacteria, Cyanobacteria, todas as subdivisões do filo Proteobacteria e alguns grupos de arqueias (DIXON, et al., 2004). Em arqueias, a ocorrência de genes relacionados à fixação de nitrogênio está restrita as arqueias metanogênicas pertencentes ao filo Euryarcheota (DIXON et al., 2004; DEKAS et al., 2009), sendo as principais classes Methanobacteria, Methanococci e Methanomicrobia (OFFRE et al., 2013).

Em ambientes costeiros, como manguezais, há um acúmulo de matéria orgânica biodegradável, com a predominância de condições anaeróbicas, o que leva a uma indução do processo de fixação de nitrogênio, que ocorre devido à disponibilidade de energia por meio da decomposição da matéria orgânica, e pelo rápido consumo de nitrogênio mineral neste ambiente, em processos como imobilização ou desnitrificação (HOLGUIN et al., 1999). O filo Proteobacteria, em particular a classe Gammaproteobacteria, é a mais bem representada entre as bactérias diazotróficas, simbiontes, endofíticas e de vida livre, sendo posteriormente encontrados organismos pertencentes às classes Betaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Epsilonproteobacteria (COLLAVINO et al., 2014; LOVELL et al., 2001, VIDEIRA et al., 2012; FLORES-MEIRELES et al., 2007; DIAS et al., 2012; JUN-BIN et al., 2007). Além destes, foi também encontrado em solos de manguezais, genes *nifH* afiliados aqueles presentes em bactérias do filo Firmicutes e similares aos encontrados em bactérias redutoras de enxofre (DIAS et al., 2012). Em estudos de manguezais, foi demonstrado que a ativação de grupos diazotróficos ocorre mesmo em mesocosmos simuladores de condições de poluição ambientais, indicando que a fixação pode estar ocorrendo mesmo em condições adversas, como em solos de manguezais poluídos por hidrocarbonetos (TAKETANI et al., 2009). Recentemente Dias et al. (2012b) identificaram grupos bactérias fixadoras de nitrogênio em solos de manguezais por meio de detecção dos genes *nifH*. Estes autores acessaram representantes das classes Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Firmicutes, além de anaeróbicas redutoras de enxofre em solos de manguezais, demonstrando que o ecossistema abriga este gene em diferentes grupos microbianos. Quanto a desnitrificação, que é um processo chave neste ambiente predominantemente redutor, os estudos tem mostrado que Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria são os grupos mais

abundantes capazes de promover tal transformações em solos de manguezais (FLORES-MEIRELES et al., 2007).

Além da fixação do nitrogênio, outro processo fundamental na ciclagem deste elemento nos solos é a amonificação, que libera a partir da mineralização da matéria orgânica, o nitrogênio mineral no solo, na forma de amônio (NH_4^+). Esse processo tem alta redundância funcional na maioria dos ambientes, sendo realizado por fungos, bactérias e arqueias, ativos mesmo frente a diversas condições ambientais (VANZOMEREN et al., 2013).

Posteriormente, o nitrogênio nas formas de amônia ou amônio é convertido em matéria orgânica, no processo de imobilização, ou oxidado em nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), num processo de oxidação da amônia, realizado por bactérias autotróficas, como os gêneros *Nitrossomonas* e *Nitrobacter* (AOB – *ammonia oxidizing bacteria*), e por arqueias oxidadoras de amônia, pertencentes ao filo Thaumarchaeota (AOA – *ammonia oxidizing archaea*) (RATHAWEE et al., 1997; LI et al., 2011; NIFTRIK et al., 2012; SPIECK et al., 2014).

A desnitrificação é uma característica amplamente difundida entre os três domínios da vida, mas mais bem estudado em bactérias pertencentes ao filo Proteobacteria (classes Alfa, Beta, Gama e Epsilonproteobacteria) (GREEN et al., 2010; HAYATSU et al., 2008). É um processo dissimilatório onde o nitrogênio oxidado é utilizado como aceptor de elétrons, dando base ao metabolismo celular microbiano (FLORES-MEIRELES, 2007). Resumidamente, a desnitrificação é um processo respiratório (CONRADO; STUART, 1998), no qual o nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO), e óxido nitroso (N_2O), são sucessivamente produzidos, e por fim reduzidos a gás nitrogênio (N_2). Esta via é considerada a maior causa de perda de nitrogênio na agricultura, contribuindo para produção de N_2O , um gás que tem participação importante no efeito estufa. Nessa reação, o nitrogênio que encontra-se oxidado, serve como receptor de elétrons, em ambientes anaeróbios, para micro-organismos que metabolizam fontes orgânicas de energia.

Por fim a via *anammox* refere-se à oxidação anaeróbica de amônio, e consiste na oxidação de amônia a dinitrogênio utilizando nitrito como elemento oxidante (OP DEN CAMP et al., 2007). Este processo é promovido pelo metabolismo específico encontrado em células classificadas taxonomicamente como afiliadas ao filo Planctomycetes (SONTHIPHAND. et al., 2014).

Todo esse conjunto de processos formam a cadeia de reações de oxirredução pela qual o nitrogênio é reciclado no ecossistema, com a ação indispensável de vários grupos de microrganismos. O estudo da comunidade microbiana nos proporciona entender melhor a estrutura, dinâmica dos microrganismos e sua função no ambiente.

3.1.5 Grupos microbianos envolvidos no ciclo do enxofre em solos de manguezais

O enxofre é o décimo elemento mais abundante na terra, faz parte da constituição de aminoácidos e possui vários estados de oxidação desde seu estado de maior redução (S^{2-} sulfeto) até seu estado de maior oxidação (SO_4^{2-} Sulfato) (HOLGUIN et al., 2001; TOSTEVIN et al., 2014). Possui grande importância nas reações químicas e biológicas nos diferentes ecossistemas, e seu ciclo se baseia na redução dissimilativa do sulfato, redução assimilativa (imobilização), respiração do enxofre elementar, oxidação e mineralização (MUYZER et al., 2008, JAMES, 2014).

A redução do enxofre pode ser compreendida em três partes distintas: (a) redução dissimilativa do sulfato que ocorre quando os microrganismos utilizam o sulfato, que comumente está ligado a outros elementos, como acceptor final de elétrons, sendo este processo acoplado a degradação de compostos orgânicos, produzindo sulfeto (MUYZER et al., 2008). (b) Respiração do enxofre elementar que ocorre quando microrganismos colonizam substratos de carbonos simples como acetato, etanol e propanol, em combinação com o enxofre elementar (S^0), que é usado como acceptor final de elétrons. (c) Redução assimilativa do enxofre, que é um processo encontrado em algumas plantas e microrganismos, que incorporam o enxofre elementar (S^{2-}) em aminoácidos (MUYZER et al., 2008; TOSTEVIN et al., 2014).

A redução do enxofre ocorre em condições aeróbicas e anaeróbicas, onde várias enzimas codificadas por muitos genes participam ativamente destes processos. Dentre estes genes o *dsrAB* (composto pelas subunidades A e B) que codifica a enzima redutase dissimilatória de sulfato (dSiR), é responsável pela redução de sulfato para sulfeto, e ocorre somente em condições anaeróbicas, como as condições predominantes em manguezais. Este gene possui regiões variáveis e conservadas, sendo portanto utilizado para afiliações taxonômicas e inferências

funcionais de organismos transformadores de enxofre nos solos (MUYZER et al., 2008; VARON-LOPEZ et al., 2014).

De maneira geral, com base na análise comparativa de sequências do gene ribossomal 16S DNAr, as bactérias redutoras de sulfato (SRP) podem ser agrupadas em 7 grupos filogenéticos, 5 dentro do grupo bactéria e 2 dentro das arqueias. Muitos dos redutores de sulfato pertencem a 23 gêneros dentro da classe Deltaproteobacteria, seguidos do filo Firmicutes (Gram-positivas) e, dentro dele, a classe Clostridia, com destaque para os gêneros *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus* e *Desulfosporomusa*, além dos filotipos Nitrospira (gênero *Thermodesulfovibrio*), Thermodesulfobacteria (gênero *Thermodesulfobacterium*) e Thermodesulfobiaceae (gênero *Thermodesulfobium*). Dentro do domínio Archaea, o gênero *Archaeoglobus*, em Euryarchaeota e os gêneros *Pyrobaculum*, *Thermocladium* e *Calditerrivirga*, em Crenarchaeota, têm destaque neste processo (LIU; BEER; WHITMAN, 2012; MUYZER; STAMS, 2008; ZHOU et al., 2011).

Em manguezais, os microrganismos redutores e oxidantes de sulfato são abundantes e possuem importante papel nesse sistema. Taketani et al. (2010) mostrou em solo de manguezal amostrados em distintas profundidades que redutores de sulfato se afiliam a diversos gêneros, dentre eles *Desulfobacter* ssp., *Desulfotomaculum* ssp., *Desulfovibrio* ssp., *Desulfomicrobium* ssp. Varon-lopez et al. (2014) mostraram em distintos manguezais brasileiros sob diferentes estados de conservação, que não só os grupos de organismos transformadores de enxofre variam, mas também a abundância relativa entre redutores e oxidantes das diferentes formas de enxofre encontradas no solo. Dentre eles podemos citar as Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria, descritas com base na análise dos genes *aprA*, e a afiliação das sequências do gene *dsrB* as ordens *Desulfobacterales*, *Desulfovibrionales*, membros do filo das Deltaproteobacteria.

Acredita-se que ainda há muito que explorar sobre as comunidades microbianas envolvidas nos processos supracitados, onde o emprego de abordagens como metagenômica e metatranscriptômica podem contribuir significativamente para a compreensão dos grupos microbianos, sua funcionalidade no ecossistema de manguezal e também sobre os fatores que modulam a estruturação e a funcionalidade dessas comunidades.

3.1.6 Abordagem Metagenômica e Metatranscriptômica

O estudo da diversidade taxonômica e fisiológica das comunidades microbianas do solo era limitado pela incapacidade de mimetização das condições ambientais em meios de cultivo. Contudo, técnicas independentes do cultivo vêm sendo aplicadas em amostras ambientais para auxiliar no entendimento das interações entre os microrganismos no solo, e na descrição de mecanismos e funções que possibilitam seu sucesso ecológico (HAWLEY et al., 2013). As metodologias independentes de cultivo vêm sendo usadas para acessar a informação genética e funcional contida no microbioma dos mais variados ambientes, como sedimentos marinhos (HAWLEY et al., 2013), solos tropicais (DEANGELIS, 2013), solos de manguezais (ANDREOTE et al., 2012; SANTOS et al., 2011), micro-organismos associados à rizosfera, rizoplane em plantas de uso agrícola como o arroz e a cana-de-açúcar (REDDY et al., 2013; WONGWILAIWALIN et al., 2013), solos de florestas (YOU et al., 2014; LELIE et al., 2012), microbioma das plantas, humano ou de outros animais (LEPAGE et al., 2014; HE et al., 2013; HESS et al., 2011).

As técnicas independentes de cultivo recentemente denominadas de “ômicas” (genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica, entre outras) tem sido aplicadas no estudo de sistemas ecológicos naturais, ou artificialmente gerados e controlados (por exemplo microcosmos), acessados de maneira direta por meio de marcadores moleculares (DNA/RNA) (SANTOS et al., 2010; URICH et al., 2013). Esse tipo de inferência nos fornece uma visão mais apurada acerca dos microrganismos e genes funcionais, e como estes interagem com o ambiente (químico, físico e biológico). Contudo, existe uma demanda de mais ferramentas para a melhor interpretação da miríade de informação que está sendo gerada pelos sequenciamentos massivos (DINI-ANDREOTE et al., 2012; PROSSER et al., 2007).

A metagenômica acessa o conteúdo dos genomas de diferentes microrganismos em um determinado habitat, ou seja, o conjunto gênico de um ambiente e seu potencial metabólico; já a abordagem metatranscriptômica infere sobre o conjunto de genes expressos no instante em que foi feita a amostragem (DAMON et al., 2012). Essas abordagens vêm sendo suportadas pelo avanço da geração de dados por tecnologias de sequenciamento, fornecendo dados com boa cobertura, e permitindo estudos mais completos e robustos, com visões mais

substanciais sobre a ecologia e funcionalidade dos ecossistemas (HE et al., 2013; TAKASAKI et al., 2013).

As análises metatranscriptômicas acessam diversos fragmentos de RNA. Num primeiro momento, o enriquecimento de regiões codificadoras de proteínas (RNA mensageiro - RNAm) se faz importante em relação RNA ribossomal. Sabe-se que o RNAm tem meia vida curta, sendo degradado em segundos após sua geração e utilização no processo traducional celular (JANG et al., 2012). Para células que estão expostas a um ambiente altamente dinâmico como, por exemplo, os manguezais, é interessante que os transcritos sejam rapidamente usados ou degradados para que novos transcritos sejam sintetizados (CHEN et al., 2008; YU; THANG, 2012). A rápida degradação e controle em nível de transcritos, permite aos microrganismos se adaptar rapidamente as pressões ambientais e a análise do RNA mensageiro nos fornece uma “visão instantânea” (do inglês “*snapshot*”) do que está ocorrendo na amostra naquele instante (CARVALHAEIS et al., 2012).

Avanços nas ferramentas moleculares aplicados no estudo de diversidade e função das comunidades microbianas contribuem para melhor compreensão da ecologia desses microrganismos, auxiliando no entendimento de processos importantes como as transformações dos elementos químicos dentro dos ciclos biogeoquímicos (SANTOS et al., 2011).

Estudos apontam em manguezais uma predominância de grupos microbianos que perpassa por Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes e Chloroflex, e a potencial função desses grupos nos ciclos biogeoquímicos nesse ecossistema (ANDREOTE et al., 2012; SANTOS et al., 2010; WANG et al., 2012). No entanto, ainda é escassa a informação de dados funcionais, a partir de abordagens como metatranscriptômica, que acesse a comunidade metabolicamente em ecossistemas de manguezais. Nesse intuito, o presente trabalho visa explorar dados metagenômicos e metatranscriptômicos para uma melhor compreensão da dinâmica dos solos de manguezais estudados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Áreas de estudo e delineamento experimental

No presente estudo foram avaliadas as comunidades microbianas presentes em quatro áreas de manguezais do Estado de São Paulo, sendo três localizadas no município de Bertioga, e uma localizada na cidade de Cananéia (figura 1, tabela 1). Os manguezais selecionados apresentam características peculiares e distintas entre si, sendo que um dos manguezais localizados no município de Bertioga foi afetado por contaminação com petróleo (Oil Mgv), devido a um derramamento de 35 milhões de litros de óleo cru, ocorrido no ano de 1983. Neste manguezal a mata nativa apresenta-se ainda em processo de regeneração. Este manguezal é dividido em duas sub-regiões, essa divisão é marcada por um rio que cruza o manguezal, correspondendo às bibliotecas de sequências BrMgv01 e BrMgv02. Próximo a este manguezal situa-se outro, sem a presença de derramamento de óleo, porém ainda com a pressão de contaminantes oriundo da proximidade de tal área com o centro urbano de Bertioga, correspondendo à biblioteca BrMgv03 (Ant Mgv). Em contraste os demais o manguezal localizado no município de Cananéia, encontra-se situado em área de reserva ambiental na Ilha do Cardoso, tendo como fator externo de impacto apenas um baixo efeito antrópico, decorrente da ação dos pescadores e catadores de caranguejos, as sequências obtidas do solo deste manguezal originou a biblioteca BrMgv04 (Prs Mgv) (Tabela 1).

Tabela 1 - Características das quatro áreas de manguezais estudadas por nossa equipe, a serem exploradas no presente projeto (ANDREOTE et al., 2012)

Áreas de Manguezal	Descrição	Cidade	Coordenadas	Água	Contaminação	Vegetação
BrMgv01	Área com baixa contaminação dentro do manguezal afetado pelo derramamento do óleo	Bertioga	23°53'49' S 46°12'28' W	Mistura do mar e pequenos rios	Baixo efeito do derramamento de óleo	Presença de todas espécies, características do ambiente
BrMgv02	Área altamente afetada pelo derramamento de óleo	Bertioga	23°53'49' S 46°12'28' W	Mistura do mar e pequenos rios	Alto efeito do derramamento de óleo	Em recuperação, baixa densidade de <i>Rhizophora Mangle</i>
BrMgv03	Manguezal próximo ao afetado pelo óleo, mas sem histórico de contaminação por petróleo.	Bertioga	23°54'06' S 45°15'03' W	Mistura do mar e pequenos rios	Origem antropogênica	Abundante, existência de espécies associadas, além daquelas típicas de manguezais
BrMgv04	Área localizada em uma reserva ambiental	Cananéia	25°05'02' S 47°57'42' W	Água do mar	Muito baixa	Abundante, exclusivamente composta por espécies típicas

Além dos fatores ambientais ou antrópicos considerados distintos entre os manguezais de Bertioga e Cananéia, pode ser salientada também a disponibilidade de oxigênio, a quantidade de nutrientes e de matéria orgânica, que são distintas entre os distintos manguezais estudados. Dentre tais fatores, algumas variáveis com grande diferença entre os manguezais são a salinidade, a condutividade elétrica que podem estar ligadas a inundação do manguezal de Cananéia diretamente pelo mar, enquanto que o manguezal de Bertioga é banhado por uma mistura de água oriunda do mar e do rio Iriri. Estes manguezais já foram alvos de uma série de estudos de nossa equipe, que os dividiu, com base em características de contaminação, vegetação, e microbiológicas, em quatro áreas distintas (ANDREOTE et al., 2012) (Tabela 1 e Figura 1). Desta maneira, os fatores citados anteriormente diferem o funcionamento dos manguezais acessados, o que permite sugerir que a ampla exploração destes manguezais pode levar a informações adicionais da diversidade microbiana e funcionalidade presente nestes ambientes.

Figura 1 - Perfil de amostragem. Área situada na cidade de Bertioga: Oil Mgv- contaminada com óleo: baixa contaminação - BrMgv01 e alta contaminação - BrMgv02; AntMgv: contaminação antropogênica - BrMgv03; - Área situada na cidade de Cananéia: PrsMgv: sem contaminação aparente: área livre de indícios de contaminação - BrMgv04.

Sendo assim, utilizamos o seguinte modelo experimental: 4 áreas de manguezais (BrMgv01, BrMgv02, BrMgv03 e BrMgv04), 3 abordagens (DNA total, RNA total e RNA purificado) x 3 repetições (Figura 2 Tabela 2). Desta forma, foi obtido um total de 36 grupos de sequências a serem analisadas.

Foram coletados aproximadamente 300 gramas por ponto amostrado, armazenados em sacos plásticos, e processados no dia seguinte a sua coleta. A partir destas amostras, alíquotas de foram usados 5,0 gramas de solo retirado do centro do material amostrado para garantir obtenção de material menos perturbado (HOLLIBAUGH et al., 2011), e utilizados para extração do material biológico alvo de análise (DNA ou RNA) .

4.2 Extrações de DNA e RNA das amostras – metagenômica e metatranscriptômica

Esta parte do projeto foi realizada com base em amostras das quatro áreas de manguezais descritas anteriormente. Amostras de 0,5 gramas dos solos dos manguezais foram utilizadas para extração de DNA, utilizando o kit *DNA PowerSoil® Total DNA Isolation* (MoBio Labs, Inc. Solana Beach, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração a integridade do DNA foi determinada em eletroforese em gel de agarose a 1% em TAE 1x (tris, ácido acético. EDTA). A extração de RNA foi realizada com o *kit RNA PowerSoil® Total RNA Isolation* (MoBio Labs, Inc. Solana Beach, USA), tendo como base 2,0 gramas dos solos amostrados e seguindo as recomendações do fabricante. Parte das amostras de RNA total foram utilizadas para o enriquecimento de RNA mensageiro, onde foram utilizados 15 µL de RNA total para o procedimento com o *kit Ribo-Zero™ rRNA Removal Kit** (Meta-Bacteria) (Epicentre®, Illumina).

4.2.1 Sequenciamento em larga escala via Illumina HiSeq 2000

O sequenciamento das amostras foi feito por meio do equipamento Illumina HiSeq 2000. Os ácidos nucleicos extraídos foram purificados e então submetidos ao sequenciamento em larga escala, com a finalidade de se obter um panorama dos RNA presentes em solos dos distintos manguezais estudados.

As amostras (DNA e RNA total e RNA enriquecido foram enviadas ao Laboratório Multiusuários Centralizado de Genômica Funcional aplicada a Agropecuária e Agroenergia, site: <http://genfis40.esalq.usp.br/multi/> localizado na Escola Superior de Agricultura Luíz de Queiroz". As amostras de DNA total foram devidamente quantificadas, NanoDrop ND-1000 e processadas de acordo com o *pipeline DNA library Illumina Nextera XT kit*. As amostras de RNA foram preparadas usando o *TruSeq RNA Sample Preparation Kit (version 2)* (Illumina, San Diego, CA, USA), para obtenção do cDNA, posteriormente utilizado como molde para o *Nextera XT kit*.

4.2.2 Processamento das sequências obtidas

As sequências foram trimadas com o objetivo de selecionar as que apresentaram qualidade *Phred* (*Q score*) maior que 20, que admite apenas um erro a cada 100 pares de bases, ou seja, permite uma acurácia de 99% das bases sequenciadas. Foram descartados *reads* com baixa qualidade, artefatos de sequenciamento e sequências com tamanho menor do que 50pb. Essa seleção inicial das sequências foi realizada no software *CLCbio®* (CLCbio, DEMARK) (BADIAL et al., 2011).

As sequências selecionadas foram então submetidas ao pipeline do Metagenomics Analysis Server (MG-RAST) (<http://metagenomics.anl.gov>) (MEYER, et al. 2008), onde os dados passaram novamente por outra *pipeline* de remoção de artefatos de sequenciamento e *reads* duplicados.

As sequências foram então relacionadas a genes ribossomais ou funcionais. Para a análise taxonômica foi utilizado BlastN das distintas bibliotecas de DNA total, RNA total e RNA enriquecido contra as bases de dados M5RNA genes ribossomais não redundantes (TANG et al., 2013) e M5Nr- Genes não redundantes codificadores de proteínas não redundantes (WILKE et al., 2012), utilizando a classificação dos melhores *hits*, segundo o seguinte critério de máximo *e-value* $1e^{-5}$, mínimo de identidade 60 % e comprimento mínimo de alinhamento de 15pb. Para a análise funcional (para genes codificadores de proteínas), as sequências foram submetidas a análise de blastX, utilizado a classificação hierárquica contra bases integradas como SEED (*subsystems*) (OVERBEEK et al., 2005) e KEGG: *Kyoto Encyclopedia of*

Genes and Genomes (KANEHISA, 2002) e COG - Clusters of Orthologous Groups (POWELL et al., 2011).

A similaridade entre os perfis taxonômicos e funcionais entre as áreas de manguezais foi avaliada pela análise de coordenadas principais (PCoA), realizadas tanto com base nos perfis obtidos com o sequenciamento do DNA como baseado nas sequências oriundas das amostras de RNA. Este tipo de análise foi feita com auxílio do software PAST (HAMMER et al., 2001).

As frequências relativas entre grupos taxonômicos e funções microbianas foram comparadas com base nos dados de DNA e RNA, identificando os grupos que apresentaram aumento na sua representação quando consideradas as diferentes moléculas para sua análise. Esta análise serviu para identificar grupos altamente ativos e pouco ativos nos solos dos diferentes manguezais estudados. A validação estatística das alterações observadas foram realizadas utilizando o software STAMP (*Statistical Analysis of Metagenomic Profiles*) (PARKS; BEIKO, 2010).

Numa análise mais específica, os dados taxonômicos e funcionais foram concatenados com análises utilizando o BlastX buscando os melhores *hits* contra o banco de dados M5NR (<http://tools.metagenomics.anl.gov/>) (WILKE et al, 2012) com o objetivo de acessar genes funcionais ligados ao ciclo biogeoquímico do nitrogênio e enxofre, bem como na descrição dos grupos microbianos que apresentam esse potencial metabólico em seu genoma e aqueles que apresentaram genes ativos para estes processos no momento da amostragem.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenções das sequências por metagenômica e metatranscriptômica

Os dados obtidos no presente estudo somam um total de aproximadamente 682 milhões de sequências, sendo 88,2, 303,1 e 290,9 milhões de sequências oriundas das análises baseadas em DNA total, RNA total e RNA enriquecido, respectivamente. Quando submetidas ao *pipeline* do servidor MG-RAST, destes 97.45%, 44.2% e 61.8% passaram no controle de qualidade, respectivamente (Tabela 2). Do total de sequências anotadas 1,5%, 62,28% 20,94% foram anotadas como genes ribossomais (DNA, RNA total e RNA enriquecido, respectivamente), enquanto que para sequências para genes codificadores de proteínas foram preditas 98,5%, 37,72% e 79,06% (DNA, RNA total e RNA enriquecido), respectivamente (Tabela 2). Esses números revelam um aumento de 41,34% nas predições de proteínas no banco de dados gerado pelo RNAm enriquecido, pela remoção do RNA total.

Tabela 4 - Informações sobre características gerais das bibliotecas (DNA e RNA) das sequências obtidas

Ácido Nucleico	N. de Seq. antes da QC*	N. de Seq. Depois da QC*	Média Comprimento das Seq.	Proteínas preditas*	RNAr*	% Proteínas Preditas	% RNAr
DNA TOTAL	88,2	86	86 ± 14	65,41	0,97	98,5	1,5
RNA TOTAL	303,1	134,2	98 ± 5	47,03	84,05	37,72	62,28
RNA (E)	290,9	179,8	98 ± 5	55,35	79,94	79,06	20,94

RNA(E)-RNAm enriquecido; * milhões de sequências ; pb – pares de bases

5.2 Comparação entre os perfis taxonômicos e funcionais das diferentes áreas de manguezais

As sequências de cada área foram separadas e anotadas, tanto com base em genes ribossomais (taxonômicos) como em genes codificadores de proteínas (funcionais). As análises taxonômicas, foram realizadas considerando base de dados de genes funcionais, para DNA total e RNA enriquecido, e no gene 16S RNAr para o RNA total. Mostraram que os manguezais BrMgv01 e BrMgv02 se separam dos

demais pelos eixos Y e X, com uma explicação de 24.24% e 50.82%, respectivamente (Figura 2).

Porém na análise funcional, somente o manguezal BrMgv02 é separado dos demais pelo eixo X (explicação de 46.09%). Quando analisamos o RNA, tanto taxonomicamente quanto funcionalmente, os manguezais BrMgv02 e BrMgv04 se mostraram mais próximos sendo a área BrMgv03 separada taxonomicamente dos demais, com uma explicação total de 79.19% (58.66 % e 20.53% nos eixos X e Y, respectivamente). Nesta análise, os manguezais BrMgv01 e BrMgv03 se diferenciaram dos demais (75.19% eixo X).

Portanto, a nível de RNAm o manguezal BrMgv03 apresentou maior diferença entre as áreas estudadas (Figura 2). Vale ressaltar que esse manguezal tem a característica de ser constantemente influenciado por fontes antropogênicas, que pode exercer uma pressão influenciando a estrutura da comunidade microbiana desta área. Em um estudo sobre a capacidade funcional microbiana no mar báltico, revelaram clara estratificação da comunidade microbiana, acentuada pela influência das contaminações antrópicas e eutrofização do ambiente (THUREBORN et al., 2013). Xiong et al. (2014) realizando um estudo da biogeografia da comunidade bacteriana em resposta a contaminação nitrogenada no mar leste chinês também encontrou mudanças na estrutura da comunidade bacteriana em função da contaminação antropogênica.

Conclusivamente, esses dados mostram que os metagenomas e metatranscriptomas apresentaram dados que diferem entre si, podendo revelar grupos ou funções diferencialmente selecionados nas distintas áreas de manguezais avaliados.

Figura 2 - PCoA baseada na matriz de similaridade *Bray-Curtis*, das quatro áreas BrMgv01, BrMgv02, BrMgv03 e BrMgv04, com base no DNA total RNA total e RNA enriquecido. Os dados foram anotados automaticamente via blastX, utilizando MG-RAST e os bancos de dados M5NR e SEED, para os níveis de classe (taxonômico) e nível 3 (funcional)

5.2 Análises taxonômicas

Os dados foram avaliados taxonomicamente utilizando tanto genes ribossomais como genes codificadores de proteínas. Dentro de cada conjunto de dados, não foram observadas diferenças quando os diferentes banco de dados foram utilizados, resultando em perfis taxonômicos bastante similares. Esta observação deu suporte para se realizar a comparação taxonômica onde os metagenomas (DNA) e metatranscriptomas enriquecidos com RNAm (RNA(E)). Estes foram anotados com base em banco de dados de proteínas (M5NR), enquanto que os

metatranscriptomas com RNA total foram anotados no banco de dados M5RNA, específico para genes ribossomais.

5.2.1 Análises taxonômicas das sequências relacionadas ao domínio Bacteria

Estas análises nos proporcionaram acessar, a partir do DNA e RNA ambiental, as comunidades microbianas totais e ativas em diferentes condições ambientais. Considerando todos os conjuntos de dados, o domínio Bacteria foi o que obteve a maior frequência relativa, perfazendo um total de 82.1% e 87.4% para na classificação das sequências de DNA e RNA, respectivamente. Dentro deste grupo, a maioria das sequências fora classificadas como oriundas de Proteobacteria (75.9% - 61.5 %) seguido de Bacterioidetes (6.2% - 3.2%), Chloroflexi (4.2% - 0.6%), Firmicutes (3.3% - 3.2%), Actinobacteria (2.1% - 1.4%) Verrucomicrobia (1.38% - 0.68%) Chlorobi (0.92% - 0.62%), Planctomycetes (0.92% - 0.43%), Acidobacteria(0.74% - 0.41%) e Cyanobacteria (0.67% - 0.39%).

As classes Molinicutes (Tenericutes), Erysipilotrichi (Firmicutes), Synergistia (Synergistetes), Ktedonobacteria (Chloroflexi) mostraram uma maior abundância nas análises de RNA, quando comparadas a DNA, em todos os manguezais estudados (Figura 3). Tenericutes, Firmicutes, Synergistia, Chloroflexi são filos compostos em sua maioria por bactérias anaeróbias, que têm sido encontrados em solos de manguezais (ANDREOTE et al., 2012; SCHERR et al., 2011).

Figura 3 – Distribuição da classificação das sequências afiliadas ao domínio Bactéria (anível de classe nas análises baseadas no DNA total e RNA (E) dos solos de manguezais estudados (A - BrMgv01, B - BrMgv02, C - BrMgv03 e D - BrMgv04). Os valores são indicados como frequência relativa (log 10), e os pontos coloridos indicam classes com diferença significativa (segundo o teste *Welch's t-test* a 95% de confiança (STAMP®): em vermelho (*) - classes que apresentaram diferença estatística em todos os manguezais, e com Preto (#) - classes que apresentaram diferenças estatísticas no manguezal referido, O círculo delimita as classes mais frequentes do filo proteobacteria.

Os grupos bacterianos supracitados são predominantemente quimioheterotróficos, podendo estar relacionados com a capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos, em vários ambientes inclusive manguezais (SINGH et al., 2014; HUG et al., 2013; GOMES et al., 2008; SHERRY et al., 2013; BEAZLEY et al., 2012). Essa característica pode estar envolvida com o aumento na frequência destes grupos nos manguezais BrMgv01 e BrMgv02, onde há

contaminação por petróleo (Figura 3 A,B), enquanto que seu aumento em outras áreas podem estar ligados a outros fatores, como por exemplo, degradação de compostos fonte antropogênica, na área BrMgv03 (Figura 3 C).

Estudos já reportaram a habilidade de bactérias afiliadas a Molinicutetes, Erysipelotrichi, Ktedonobacteria e Synergistia de se multiplicarem em áreas com histórico de derramamento de óleo, apresentando habilidade de degradar hidrocarbonetos, bem como outros componentes da matéria orgânica (SINGH et al., 2014; HAN et al., 2011; CHAPLEUR et al., 2013; JI-QUAN et al., 2014). No entanto, essas classes também se apresentam ativas na área BrMgv04, indicando que estes grupos, integrantes da biosfera rara, são metabolicamente importantes em todas as áreas.

Dentre os grupos com maior atividade (maior representatividade no RNA) foi possível detectar a ocorrência de grupos com baixa frequência relativa (biosfera rara). Algumas classes apresentaram aumento significativo, não em todas as áreas, mas em algumas em particular, é o caso de Betaproteobacteria, Elusimicrobia e Chlamydia na área BrMgv01 (Figura 3A). Elusimicrobia e Betaproteobacteria são comuns em ambientes marinhos e solos de manguezais (WU et al., 2013; THOMPSON et al., 2013). A classe Betaproteobacteria é reconhecidamente importante para o funcionamento do ecossistema solo, participando da oxidação do enxofre, fixação de nitrogênio e degradação de contaminantes como hidrocarbonetos (KRYACHKO et al., 2012).

Thermodesulfobacteria (classe) apresentou aumento em sua frequência relativa no RNA para as áreas BrMgv01 e BrMgv02 (figura 3 A,B), o que muito provavelmente se deve ao fato de organismos dessa classe serem bactérias estritamente anaeróbias, que apresentam metabolismo com base na redução dissimilatória de sulfato, comuns em ambientes marinhos, bem como em águas de reservatórios que abrigam jazidas de óleo (SHERRY et al., 2013) e solos com baixo potencial redox (ZELEKE et al., 2013). Isto corrobora o fato de Dictyoglomia ser encontrada em solos e ambientes marinhos e com alto teor de óleo cru (URICH et al., 2008; HAWLEY et al., 2013), assim como Negativicutes, que é comumente encontrada solos alagados (LV et al., 2014) e abriga bactérias anaeróbias que possuem alta capacidade de degradar celulose, produzir H₂ e CO₂, além de produzir endósporos (POEHLEIN et al., 2013). A produção de endósporos é uma característica fisiológica importante dessa classe, compartilhada com classes como

Clostridia (YUTIN et al., 2013), o que pode conferir resistência e ou resiliência a estresses sofridos por comunidades microbianas, como por exemplo, em solos contaminados por fontes orgânicas (VALENTÍN et al., 2013).

Os grupos Spirochaeta e Epsilonproteobacteria mostraram diferença significativa, aumentando sua atividade na área BrMgv02 (Figura 3B), onde houve uma maior incidência do derramamento de óleo. Este grupo é composto por bactérias heterotróficas que exercem importante função no ecossistema, degradando celulose entre outros compostos orgânicos (ZHAO-MING et al., 2014). Epsilonproteobacteria vem sendo associada a grupos quimiolitotróficos ligados ao metabolismo de H_2S e compostos orgânicos (THOMAS et al., 2014).

Os grupos Verrucomicrobia e Fibrobacteria aumentaram sua frequência na análise de RNA da área com contaminação antropogênica BrMgv03 (Figura 3C), possivelmente devido ao fato de organismos dessas classes apresentarem ampla capacidade de degradação de celulose (RUI et al., 2009), sendo importante para a reciclagem da matéria orgânica neste ambiente. Esta característica também é encontrada com organismos classificados como Solibacteres e Thermotogae (DEANGELIS et al., 2010; GUPTA et al., 2011), que foram detectados como mais ativos na área BrMgv04 (Figura 3D). Nesta área a classe Deferribacteres também foi diferencialmente encontrada na análise de RNA, tendo importância para o ciclo do Fe, participando das transformações deste elemento no ambiente (WRIGHT et al., 2014).

A classe Zetaproteobacteria aumentou sua representatividade na análise de RNA nas áreas BrMgv03 e BrMgv4, com diferença significativa (Figura 3 e Tabela 3). Esse grupo é composto por bactérias oxidadoras de ferro (FORGET et al., 2010), característica compartilhada por Deferribacteres (WRIGHT et al., 2014). A classe Zetaproteobacteria reúne grupos de bactérias autotróficas e podem exercer funções importantes para o ciclo de elementos como Fe, oxidando a Fe^{++} , de onde tiram energia para fixar o carbono (MCBETH et al., 2013). Desta forma é um grupo que exerce função importante em vários ecossistemas, como no ambiente marinho (MCBETH et al., 2013), fendas hidrotermais e na interface água-sedimento, em áreas costeiras (RUBIN-BLUM et al., 2014).

Nossos dados mostram que Zetaproteobacteria está presente nas áreas estudadas, apenas na área com maior contaminação por óleo a expressão deste grupo foi relativamente baixa, mostrando que esta classe tem uma alta atividade

metabólica nos manguezais estudados. Esse é o primeiro relato da classe Zetaproteobacteria em manguezais, sendo esta descrição atrelada a descrição da atividade deste grupo, mesmo em manguezais sob diferentes condições de contaminação, o que indica que esta classe pode participar de funções importantes neste ambiente.

Dentre as classes mais abundantes (acima de 1%) Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Betaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Epsilonproteobacteria apresentaram maior frequência tanto nos dados de DNA como no RNA em todas as áreas estudadas, totalizando 75.3% e 60.8% do DNA e RNA respectivamente. Outros grupos encontrados com maior abundância relativa foram Flavobacteria (2.8%), Bacterioidia (2.2%), Actinobacteria (2.1%) no DNA e Clostridia (1.8%), Actinobacteria (1.1%) e Bacilli (1.1%) no RNA (Tabela 3).

Apesar desta descrição inicial ser importante, a possibilidade de se comparar as afiliações e as respectivas abundâncias relativas dos grupos encontrados nas análises baseadas em DNA e RNA surge como uma importante ferramenta neste estudo. Neste tipo de análise observa-se, por exemplo, que o grupo Clostridia apresentou aumento nas análises de RNA, sendo esta diferença estatística apenas na área BrMgv02. Da mesma maneira, os grupos Betaproteobacteria e Verrucomicrobiae aumentaram sua representação nas amostras de RNA obtidas da área BrMgv01; E membros da classe Epsilonproteobacteria aumentaram nas análises de RNA dos manguezais contaminados pelo derramamento de petróleo (BrMgv01e BrMgv02) (Figura 3).

Quando analisamos os grupos que, apresentaram, com proporções estatisticamente diferentes nos dados de DNA verificamos Bacterioidia, Anaerolineae e Alphaproteobacteria mostraram menor frequência nos dados de RNA, em todas as áreas estudadas (Figura 3), pertencentes aos filos Bacterioidetes, Chloroflexi e Proteobacteria, respectivamente, as duas primeiras atuam degradação da matéria orgânica (UROZ et al., 2013; WIRTH et al., 2012), Alphaproteobacteria é uma classe reconhecida por abrigar grupos fixadores de nitrogênio (FLORES-MEIRELLES et al., 2007). Pett-Ridge et al. (2005) também encontrou baixa frequência de Alphaproteobacteria em condições de flutuações do potencial redox, em solos tropicais, variações como estas e outras condições no momento da amostragem, podem explicar a baixa expressão desses grupos nos dados de RNA.

Tabela 5 - Distribuição dos grupos bacterianos acima de 1%, em nível de classe. Os dados foram anotados automaticamente blastX, utilizando MG-RAST e os bancos de dados M5NR e M5NRNA, a 80% de similaridade, para o DNA e RNA, respectivamente

Filo	Classe	DNA								RNA							
		BrMgv01	BrMgv02	BrMgv03	BrMgv04	BrMgv01	BrMgv02	BrMgv03	BrMgv04	BrMgv01	BrMgv02	BrMgv03	BrMgv04	BrMgv01	BrMgv02	BrMgv03	BrMgv04
		400900*	495572*	406791*	488152*	13087061*	12100045*	11143778*	11228618*								
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	22,40	±6,08	36,00	±5,8	33,30	±2,9	33,80	±1,8	20,20	0,70	26,40	±4,0	31,60	±1,6	25,80	±3,7
	Deltaproteobacteria	20,90	±2,8	16,50	±1,4	19,90	±1,3	19,20	±2,8	11,00	1,80	16,70	±3,2	14,00	±1,8	17,20	±2,4
	Betaproteobacteria	14,50	±2,0	11,00	±1,7	7,20	±0,2	6,20	±1,5	18,70	±1,3	5,80	±3,6	6,90	±1,3	5,90	±3,9
	Alphaproteobacteria	9,20	±1,0	11,30	±2,0	8,50	±0,4	8,90	±1,1	3,80	±0,2	4,00	±0,1	4,10	±0,1	4,00	±0,1
	Epsilonproteobacteria	3,70	±3,1	1,20	±0,6	7,20	±1,0	10,40	±1,3	6,40	3,70	9,30	±3,0	3,30	±0,8	8,10	±0,9
	Zetaproteobacteria	0,20	±0,0	1,40	±0,5	0,20	±0,0	0,20	<0,01	0,20	0,00	0,30	±0,0	0,30	±0,0	0,30	±0,0
Bacteroidetes	Flavobacteria	2,50	±0,6	3,20	±0,8	2,50	±0,5	3,20	±1,4	1,00	0,10	0,80	±0,2	1,20	±0,2	0,80	±0,2
	Bacteroidia	2,90	±0,5	1,80	±0,3	2,10	±0,1	2,10	±0,4	0,90	0,20	0,60	±0,1	0,80	±0,1	0,70	±0,1
Chloroflexi	Dehalococcoidetes	2,30	±1,3	0,60	±0,1	3,60	±0,5	1,40	±0,2	0,40	0,10	0,50	±0,10	0,30	±0,10	0,50	±0,20
	Anaerolineae	2,40	±0,3	0,90	±0,1	1,60	±0,1	1,20	<0,01	0,00	0,00	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	<0,01
	Chloroflexi (class)	1,30	±0,3	0,50	±0,2	0,80	±0,4	0,60	±0,1	0,20	0,10	0,10	<0,01	0,10	±0,00	0,10	<0,01
Firmicutes	Clostridia	1,30	±0,5	1,10	±0,3	1,20	±0,3	1,30	±0,1	1,90	0,40	1,70	±0,10	1,70	±0,10	2,00	±0,10
	Bacilli	1,50	±0,9	1,70	±0,5	2,30	±0,3	1,80	±0,3	1,20	0,20	1,10	0,10	1,00	0,10	1,20	<0,01
Actinobacteria	Actinobacteria (class)	2,70	±0,9	2,10	±0,3	1,60	±0,3	2,30	±0,5	1,50	0,30	1,40	0,00	1,20	<0,01	1,50	±0,20
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	1,20	±0,3	0,80	±0,3	0,60	±0,1	0,20	±0,0	1,50	0,50	0,40	0,10	1,00	<0,01	0,40	±0,10
	Spartobacteria	0,30	±0,2	0,20	±0,1	0,10	±0,1	2,60	±0,1	0,10	0,00	0,00	0,00	0,10	<0,01	0,00	<0,01
	unclassified	0,10	±0,0	0,10	±0,0	0,10	±0,0	0,40	±0,1	0,10	0,00	0,00	0,00	0,10	<0,01	0,00	<0,01
Chlorobi	Chlorobia	1,50	±1,0	0,90	±0,1	0,60	±0,0	0,70	±0,1	1,10	1,60	0,20	0,00	0,20	<0,01	0,20	<0,01
Nitrospirae	Nitrospira (class)	0,50	±0,1	0,30	±0,2	0,40	±0,0	1,60	±0,1	0,20	0,10	0,20	0,00	0,20	<0,01	0,20	<0,01
Planctomycetes	Planctomycetia	1,10	±0,4	0,90	±0,1	0,80	±0,1	0,90	±0,1	0,70	0,10	0,60	0,00	0,80	<0,01	0,60	±0,10

*total de sequencias de cada biblioteca

Muitas das classes aqui identificadas já haviam sido reportadas em trabalhos que investigaram a composição e o potencial metabólico de comunidades microbianas neste ambiente (ANDREOTE et al., 2012). No entanto, esse é o primeiro caso em que é registrado o aumento da representatividade na análise do RNA do solo, de alguns grupos microbianos neste ecossistema.

5.4 Análises das sequências relacionadas ao Domínio Archaea

No domínio Archaea (1,0 e 1,1% do DNA e RNA, respectivamente) os filos Euryarchaeota (62% – 89,2%), seguido de Thaumarchaeota (0,2%- 16,18), Crenarchaeota (4,3% – 12,13%) e Korarchaeota (0,4% -1.1%) foram detectados nas análises de DNA e RNA, respectivamente (Tabela 4).

O grupo das Euryarchaeota hospeda os grupos filogenéticos de arqueias metanogênicas, que exercem importante função para a ciclagem do carbono em ambientes anaeróbicos (THAUER; SHIMA, 2006). Esse grupo foi o mais encontrado tanto nos dados de metagenômica como nos dados de metatranscriptômica, e apresentou aumento na sua representação nas análises do RNA em comparação com o DNA, o que pode ser explicado pela versatilidade e redundância metabólica deste grupo de arqueias (VARON-LOPEZ et al., 2014; DIAS et al., 2011). Crenarchaeota é composto por arqueias termófilas, e deste filo divergiu o grupo das Thaumarchaeota, arqueias mesófilas com importância nos ciclos biogeoquímicos (VETRIANE et al., 1999). Esses grupos de arqueias participam ativamente da oxidação da amônia e está bem distribuído nas águas marinhas e também em solos (KARNER et al., 2001; BARTOSSEK et al., 2012). Esses dois filos foram os mais abundantes nos manguezais BrMgv02 e BrMgv03, e já tinham sido reportados nestas áreas (DIAS et al., 2011).

As classes mais representativas foram Methanobacteria (40,2% – 17,6% - DNA e RNA, respectivamente), Methanomicrobia (27,1% – 58,7%), seguidas por Methanococci (1,5%) no DNA, e Archaeoglobi (2%) no RNA. Todas essas classes mais acessadas pertencem ao filo Euryarchaeota. Methanomicrobia (Euryarchaeota) apresentou diferença significativa entre DNA(%) e RNA(%) no manguezal com maior contaminação pelo derramamento de óleo (BrMgv02) (Figura 4 B). A classe Termoprotei (Crenarchaeota) apresentou diferença significativa em ambos os manguezais com derramamento de óleo (BrMgv01 e BrMgv02) enquanto

Thermococci apenas no manguezal com menor contaminação (BrMgv01) (Tabela 4; Figura 4 A, B).

Archaeoglobi (Euryarchaeota) apresentou diferença significativa entre suas proporções em todas as áreas estudadas. No nível de DNA essa classe representava apenas a 8ª classe mais abundante com 0.07% (metagenômica) passando para a 3ª mais abundante com 2%, representando um aumento maior que de 60x na sua frequência nas análises com base no RNA (metatranscriptômica). Archaeoglobi foi reportada como uma classe que hospeda organismos relacionados à redução de sulfato, característica metabólica que pode explicar o aumento na representação deste grupo de arqueias em todas as áreas estudadas (SHERRY et al., 2013, PRIHA et al., 2014). A única classe que apresentou maior proporção no DNA foi Methanobacteria, com diferenças significativas nas áreas BrMgv02, BrMgv03 e BrMgv04.

Esses grupos de arqueias podem ter papel fundamental na ciclagem de elementos como carbono, nitrogênio e enxofre nestes ambientes (OFFRE et al., 2013). A melhor compreensão da função de arqueias nos ciclos biogeoquímicos contribui de forma significativa para entender o papel desses microrganismos para o fluxo energético nos manguezais, em processos como metanogênese, redução de sulfato, participando da oxidação da amônia, passo inicial para a nitrificação, além de ter muitas espécies que apresentam os genes ligados a fixação biológica de nitrogênio (OFFRE et al., 2014; TAKETANI et al., 2010; DIAS et al., 2011; VARON-LOPES et al., 2014).

Avaliando os dados dos grupos de arqueias e bacterianos que apresentaram aumento significativo na frequência nas análises de RNA, verificou-se que uma maior prevalência de arqueias metanotróficas (Methanomicrobia, Methanococci), enquanto que para bactérias houve um aumento de grupos metanotróficos, por exemplo, as classes pertencentes ao filo Proteobacteria e Verrucomicrobia, além de outras classes heterotróficas e quimiolitotróficas, que produzem substrato para arqueias metanogênicas (H_2 e CO_2) (TVET et al., 2014). Esses dados indicam que na comunidade metabolicamente ativa, há ocorrência de grupos microbianos com prováveis metabolismos complementares podem indicar características metabólicas importantes para o funcionamento deste ecossistema.

Tabela 4 - Distribuição dos grupos de arqueias acima de 1%, a nível de classe. Os dados foram anotados automaticamente blastX, utilizando MGRAST utilizando os bancos de dados M5NR e M5NRNA, a 80% de similaridade, para o DNA e RNA , respectivamente

Filos	Classes	DNA								RNA							
		BrMgv01		BrMgv02		BrMgv03		BrMgv04		BrMgv01		BrMgv02		BrMgv03		BrMgv04	
		30043**		19514**		8397**		8175**		12905**		206753**		658082**		449027**	
Euryarchaeota	Methanomicrobia	74,14	±9,2	6,35	±9,3	4,73	±5,1	45,92	±15,72	80,43	±0,4	69,90	±19,01	35,73	±4,48	70,45	±6,52
	Methanobacteria	9,67	±8,8	54,31	±8,8	53,61	±8,2	33,07	±7,62	2,34	±0,0	5,45	±2,09	6,69	±2,82	5,22	±1,57
	Archaeoglobi	0,04	<0,01	0,09	±0,1	0,12	±0,1	0,12	±0,10	2,24	±0,2	5,24	±1,74	5,30	±0,74	4,71	±1,19
	Methanococci	1,05	±0,9	3,51	±1,5	0,06	±0,1	1,35	±2,34	0,57	<0,01	1,69	±0,79	1,87	±0,61	1,72	±0,73
	Thermoplasmata	1,12	±0,7	1,31	±2,1	1,08	±0,1	0,45	±0,41	0,90	<0,01	2,05	±0,81	2,27	±0,31	1,91	±0,61
	Thermococci	0,03	±0,0	0,22	±0,2	0,70	±0,9	0,38	±0,44	0,17	±0,02	0,37	±0,22	0,81	±0,37	0,37	±0,10
	Halobacteria	0,44	±0,2	0,87	±1,1	0,77	±0,2	0,25	±0,09	0,08	±0,02	0,05	±0,01	0,06	±0,01	0,05	<0,01
	Methanopyri	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,00	0,01	<0,01	0,02	±0,02	0,05	±0,01	0,03	±0,03
	unclassified	0,21	±0,1	0,59	±0,4	0,97	±0,3	0,31	±0,06	2,49	±0,03	1,97	±0,19	1,89	±0,21	1,99	±0,15
Crenarchaeota	Thermoprotei	0,14	±0,2	0,45	±0,5	0,70	±0,6	0,24	±0,25	2,70	±0,63	3,53	±2,09	9,96	±5,01	3,91	±1,27
	unclassified	0,74	±0,3	2,46	±1,8	1,84	±1,6	1,16	±0,57	0,72	±0,28	0,78	±0,45	2,18	±1,19	0,93	±0,39
Thaumarchaeota	unclassified	0,26	±0,2	16,19	±2,8	11,28	±0,9	2,33	±2,97	0,95	±0,08	2,11	±16,96	27,79	±11,33	2,10	±1,05
Korarchaeota	Unclassified	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,00	0,40	±0,13	0,49	±0,27	1,17	±0,41	0,58	±0,22

*total de sequencias de cada biblioteca.

Figura 4 - Distribuição da classificação das sequências afiliadas ao domínio Archaea (ao nível de classe nas análises baseadas no DNA e RNA dos solos de manguezais estudados (A - BrMgv01, B - BrMgv02, C - BrMgv03 e D - BrMgv04). Os valores são indicados como frequência relativa (log 10), e os pontos coloridos indicam classes com diferença significativa (segundo o teste *Welch's t-test* a 95% de confiança (STAMP®): em vermelho (*) - classes que apresentaram diferença estatística em todos os manguezais, e com Preto (#) - classes que apresentaram diferenças estatísticas no manguezal referido

5.3 Análises Funcionais

No intuito de se obter o perfil funcional da microbiota dos solos dos manguezais estudados, foram utilizados neste estudo o DNA total e o RNA enriquecido. O enriquecimento de RNAm nas amostras é importante, pois em termos gerais apenas 1.5% do RNA total, é composto por RNAm, sendo o restante é composto por outros tipos de RNAs como RNAt e RNAr (CARVALHAES et al., 2012). Na comparação

entre o RNA total e RNA enriquecido, notamos um incremento no percentual de RNAm, e consequentemente um aumento importante no número de genes funcionais anotados. Este mesmo tipo de análise já se mostrou eficiente em outro estudo recente (TVEIT et al., 2014).

Uma das maiores limitações para o estudo ecológico das comunidades metabolicamente ativas esta no fato de o RNAm ser pouco representado numa amostra de RNA total extraído do solo, além do fato de que a vida do RNAm é curta em organismos procarióticos (CARVALHAES et al., 2012). Além disso, outras dificuldades são o acesso e lise das células microbianas, devido muitas células serem localizadas em micro-nichos entre as partículas do solo, absorção de RNAs por partículas do solo, além da atuação deletéria de RNases, podem limitar este tipo de estudo (CARVALHAES et al., 2012). No entanto, mesmo frente a estas dificuldades, os resultados obtidos no presente estudo mostraram a eficiência da metodologia empregada, e forneceram uma visão mais detalhada dos aspectos funcionais da microbiota dos solos dos manguezais estudados.

5.3.1 Categorias COG e KEGG acessados no metagenoma e metatranscriptoma aplicados a solos de manguezais

O sequenciamento direto do DNA e RNA de amostras de solos de manguezais possibilitou uma visão das capacidades metabólicas, modo de vida e expressão gênica das comunidades microbianas neste ambiente. Valores de 72,2%, 35,8% e 67,4%, das sequências que foram afiliadas a proteínas preditas a partir das análises baseadas no DNA total, RNA total e RNA purificado, respectivamente. Desse montante foi possível encontrar afiliação a 38 categorias KEGG (nível 2) e 26 categorias COG (*Clusters of Orthologous Groups*) nível 3 (Tabela 5; Figura 9).

Nesta análise pode-se notar que a riqueza (número de funções e categorias acessadas) nos metagenomas é maior, uma vez que essa técnica acessa “todo” o potencial genético contido no DNA ambiental (CARVALHAES et al., 2012). Já os metatranscriptomas permitiram acessar as funções expressas no momento da amostragem, possibilitando uma visão dos processos ativos, o que gera um menor numero de funções detectadas (TVEIT et al., 2014).

Tabela 5 Riqueza de funções e categorias acessadas por meio da base de dados *KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - via metagenômica e Metatranscriptômica.

		BrMgv01	BrMgv02	BrMgv03	BrMgv04
	Funções	2151	2150	2083	2219
DNAtotal	Categorias	36	36	33	35
	Funções	204	156	171	189
RNAtotal	Categorias	31	34	35	33
	Funções	393	394	395	396
RNA(E)	Categorias	32	38	36	37

A categorias funcionais (COGs) confirmaram a dominância de comunidades procarióticas (ex. bactéria e arqueias) no solo de manguezais com alta abundância relacionada a categorias COG, como por exemplo, produção e conservação de energia, metabolismo de aminoácido, biogênese, e metabolismo de carboidratos, essas foram as categorias mais abundantes nas bibliotecas nos metagenomas e se mantiveram frequentes nos metatranscriptomas (Figura 5).

Nossos dados revelam uma riqueza de funções metabólicas, dentre estas podemos notar que funções exclusivas de eucariotos (processamento de RNA, estrutura da cromatina etc.) (TATUSOV et al., 2003), mostraram baixa abundância nos solos de manguezais, tanto a nível de DNA como RNA, corroborando estudos prévios que exploraram o DNA ambiental nestas áreas (ANDREOTE et al., 2012).

A anotação baseada no banco de dados KEGG indica a presença de funções essenciais para a capacidade de competição da comunidade microbianas que habitam os solos de manguezais, como, por exemplo, genes relacionados com metabolismo de vitaminas e cofatores, transporte via membrana, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de energia e metabolismo de carboidratos (MURÍNOVÁ et al., 2014; ANDREOTE et al., 2012).

apresentaram diferença estatística em todos os manguezais, e com Preto as funções que apresentaram diferenças estatísticas no manguezal estudado.

Comparando os dados de DNA e RNA foi possível observar um aumento na representação da função metabolismo energético nas amostras das áreas BrMgv01, BrMgv02 e BrMgv04 (Figura 10 A, B e D). Essa via envolve produção e utilização de energia, que são características fundamentais para a manutenção das comunidades, principalmente em um ambiente altamente complexo, como o de manguezais (MAITI et al., 2013). Os genes relacionados a funções como degradação de xenobióticos e adaptação apresentaram maior frequência relativa nos metatranscriptomas de todas as áreas estudadas (Figura 6). Esses dados indicam que essas vias são essenciais para o sucesso ecológico das comunidades microbianas, no ambiente altamente dinâmico e exposto a grandes variações, como são os solos de manguezais (ANDREOTE et al., 2012).

5.3.2 Vias metabólicas Envolvidas no Ciclo do Nitrogênio e Enxofre

Além de análises mais específicas, foi realizado um estudo mais detalhado das sequências relacionadas com processos de transformações do nitrogênio e do enxofre nos solos de manguezais (Figuras 6 e 7).

No ciclo do nitrogênio foram encontradas sequências afiliadas a genes relacionados a diferentes processos, como vias de redução, fixação de nitrogênio, redução assimilativa e dissimilatória de nitrato, desnitrificação, e vias de oxidação, nitrificação e oxidação anaeróbica do amônio (*anammox*) (KANEHISA, 2002; SONTHIPHAND et al., 2014). Todas as vias citadas foram detectadas no nível de DNA e RNA. Foi encontrado grande número de sequências relacionadas com genes envolvidos com a imobilização e mineralização do nitrogênio assim como genes envolvidos com transformações minerais deste elemento (Figura 6A). O balanço entre essas vias é influenciado fortemente pelas condições ambientais, tais como temperatura, oxigênio, disponibilidade de nitrato e conteúdo de matéria orgânica nos solos (GOMES et al., 2008; ANDREOTE et al., 2012).

Entre as vias metabólicas acessadas podemos observar que a desnitrificação, uma das vias de saída de N_2 do ecossistema (VOSSENBERG et al., 2013), foi uma das vias mais expressas (RNA) (Tabela 7). A desnitrificação é composta por vários genes podemos citar como exemplo: *nirK*, *nirS*, *norB*, *nosZ*, entre outros (HAYATSU

et al., 2008). É uma respiração na qual o nitrato ou o nitrito é utilizado como aceptor final de elétrons, sendo reduzido a N_2 . Esse processo acontece em ambientes que apresentam anaerobiose ou em ambientes de variável potencial de oxirredução com predominância de condições anaeróbias, como os manguezais (FLORES-MEIRELES et al., 2007).

A fixação biológica de nitrogênio, processo de redução do nitrogênio atmosférico para amônia, que é a forma reduzida de nitrogênio que é incorporada em aminoácidos e outras moléculas biologicamente importantes. A habilidade de fixação biológica, exclusiva de microrganismos procarióticos, é conferida pelo complexo enzimático nitrogenase (E.C. 1.18.61), encontrado em bactérias e arqueias (DEKAS et al., 2013; GABY et al., 2014). A via de fixação biológica de nitrogênio também apresentou alta representatividade nas análises de RNA de todas as áreas acessadas (Figura 7). Estudos recentes apontam esses ambientes como fonte de diversidade biológica de bactérias diazotróficas, inclusive com indícios de endemismo (DIAS et al., 2012). A importância deste tipo de processo é patente em manguezais, onde a alta disponibilidade de matéria orgânica se acopla a condições ambientais de difícil processo de mineralização da mesma, dando origem a um ambiente altamente benéfico a organismos capazes de obter N da atmosfera.

Por serem estas vias (fixação biológica do nitrogênio e desnitrificação) as mais bem representadas no mapa metabólico KEEG, estas foram escolhidas para uma análise taxonômica da comunidade microbiana com potencial genético para atuar nessas vias (Figura 7 A, B).

Figura 7 - Mapa metabólico (KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), parâmetros: máximo e-valor $1e^{-5}$, Mínimo de identidade 60% mínimo comprimento de alinhamento de 15pb. A - Ciclo do Nitrogênio.* vias com maior número de *hits* (maior abundância de sequências); B- Vias metabólicas selecionadas para análises posteriores.

O enxofre também passa por reações de oxiredução ao longo de suas transformações no solo, onde atua uma gama de microrganismos que exercem funções fundamentais para a ciclagem deste elemento nos ecossistemas (BEHERA et al., 2014). Existem duas principais vias de redução do enxofre, a assimilativa e a dissimilativa. A via assimilatória é amplamente difundida em vários organismos produtores de compostos reduzidos de enxofre para biossíntese de aminoácidos compostos com S, essa via não exporta diretamente o sulfeto (BEHERA et al., 2014). A via dissimilatória é restrita para bactérias e arqueias anaeróbicas onde o sulfato ou o enxofre elementar é o aceptor final de elétrons da cadeia respiratória, produzindo grandes quantidades de sulfureto ou ácido sulfúrico (H_2S) (BEHERA et al., 2014).

Os dados obtidos no presente estudo indicam que a maior parte do metabolismo de enxofre nos solos de manguezais se refere a formas reduzidas (sulfeto e H_2S), com alta expressão das vias que envolvem esses compostos, em todas as áreas estudadas (Figura 8 e Tabela 7), corroborando com estudos prévios

que acessaram o metabolismo deste elemento nestes manguezais (ANDREOTE et al., 2012).

A grande abundância desses genes esta relacionada à conversão de sulfato para adenilsulfato (PAS) codificada pelo gene *sat*, passo precursor, tanto da via de redução dissimilatória quanto para a oxidação do enxofre (Figura 6 A e Tabela 7). Essas vias metabólicas são complementares e importantes para o ciclo do enxofre no ecossistema de manguezal. No entanto, para algumas enzimas como, por exemplo, a sulfato redutase E.C. 1.8.99.1 (*dsrAB*) para qual não foi possível detectar *hits* na anotação via KEEG, foi feita a busca utilizando o banco integrado *Subsystems* (OVERBEEK et al., 2005). Essa enzima junto com a thioredoxin redutase E.C. 1.8.99.2 (*aprAB*), que é responsável pelos processos de redução e também oxidação de enxofre, foi altamente expressa em todas as áreas, apresentando diferença estatística entre os dados de DNA(%) e RNA(%), exceto para a área BrMgv03, na qual somente a enzima E.C.1.8.99.2 apresentou diferença estatística entre os dados de DNA(%) e RNA(%).

Levando em consideração a alta abundância de genes ligados à redução dissimilatória e oxidação do enxofre, e a importância dessas vias para o ciclo deste elemento, estas foram selecionadas para análise da comunidade microbiana que abriga esses genes que é metabolicamente ativa nestas transformações.

Figura 8 - Mapa metabólico (KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), parâmetros: máximo e-valor $1e^{-5}$, Mínimo de identidade 60 % mínimo comprimento de alinhamento de 15pb. A - Ciclo do Enxofre,* vias com maior número de *hits* (maior abundância de seqüências); B- Vias metabólicas selecionadas para análises posteriores

Tabela 6 - Número de sequencias afiliados as vias do ciclo do nitrogênio e enxofre, anotação realizada utilizando o banco de dados Subsystems

	BrMgv01		BrMgv02		BrMgv03		BrMgv04	
	DNA	RNA	DNA	RNA	DNA	RNA	DNA	RNA
Desnitrificação	194(111)	536(106)	296(141)	164(76)	188(112)	1208(245)	123(80)	302(103)
Fixação de N₂	1182(388)	9737(340)	1455(341)	5354(529)	937(292)	2884(404)	1461(372)	7792(598)
Redução de Sulfato	1019(172)	23940(290)	1323(177)	11394(270)	1017(173)	12877(265)	1152(173)	21787(292)
Oxidação de Enxofre	294(151)	2029(94)	300(150)	3080(331)	234(128)	2300(330)	310(158)	5013(394)

Anotação realizada via blastX utilizando o banco integrado *Subsystems*. Os números entre parênteses são referentes quantidade de *hits* no banco de dados

Os dados de ambos os ciclos corroboram os encontrados em um estudo prévio, (ANDREOTE et al., 2012), e indicam que a correlação entre o que se observa com base no DNA ou RNA é bastante alta. Isto remete a sugestão de que o *turnover*, ou seja, a troca da população ativa na comunidade microbiana nos solos de manguezais seja bastante alta.

5.3.3 Microrganismos Envolvidos no Ciclo do Nitrogênio e Enxofre em Solos de Manguezais

As vias de fixação biológica de nitrogênio, desnitrificação (Figura 7B), redução dissimilatória e oxidação do enxofre (Figura 8 B), foram selecionadas para análises taxonômicas das comunidades microbianas envolvidas em cada processo. As sequências de cada via foram avaliadas taxonomicamente e os dados mostram diferenças na composição das comunidade microbianas oriundas de cada local. Nos dados metagenômicos a houve a separação da área BrMgv02 das demais, sendo que a função com diferenciação mais clara foi a redução do sulfato, com 74,8% e 16,9% da variação explicada nos eixos X e Y, respectivamente (Figura 9).

Os dados de RNA mostram a separação da área BrMgv01 para todas as vias avaliadas e a separação da comunidade desnitrificante e oxidante de sulfato da área BrMgv03 (73,2% e 80,6% de explicação no eixo X) (Figura 9B - D), enquanto percebe-se, a exceção da comunidade fixadora de nitrogênio com uma aproximação das comunidades metabolicamente ativas nas áreas BrMv02 e BrMgv04 (Figura 9 B, C e D).

Os ambientes de manguezais abrigam uma vasta comunidade microbiana, bactérias, arqueias e fungos (DIAS et al., 2012; VARON-LOPES et al., 2014; FASANELLA et al., 2012), que podem participar de vários processos importantes, como degradação de hidrocarbonetos, decomposição da matéria orgânica, ciclos biogeoquímicos entre outros. Essa comunidade pode ser estruturada seguindo vários fatores ambientais, entre eles as características físicas e químicas, como potencial redox, conteúdo de matéria orgânica, contaminantes orgânicos e não orgânicos (VARON-LOPES et al., 2014; SANTOS et al., 2010; XIAO-TAO 2013; SANTOS et al., 2011). Esses dados podem, portanto, ajudar a explicar a diferenciação destas comunidades nas áreas estudadas.

Figura 9 – PCoA baseada na matriz de similaridade *Bray–Curtis*, para sequencias dos ciclos do nitrogênio (Fixação e desnitrificação) e enxofre (redução e oxidação), nas quatro áreas BrMgv01, BrMgv02, BrMgv03 e BrMgv04, com base no DNA total RNA total e RNA. Os dados foram anotados automaticamente blastX, utilizando MGRAST utilizando os bancos de dados M5NR e SEED, para os níveis de classe e de função

Vários trabalhos têm indicado que as comunidades destas áreas podem ser endêmicas (DIAS et al., 2010, 2011, 2012; SOARES-JUNIOR et al., 2013; VARON-LOPES et al., 2014), reforçando a importância de estudar essas comunidades, acessando a diversidade estrutural e funcional, potencialmente e metabolicamente ativa, com abordagem como metagenômica e metatranscriptômica (ANDREOTE et al., 2012).

Quanto aos grupos microbianos mais frequentes (acima de 1%) envolvidos em cada processo, podemos notar que houve diferenças entre os dados de DNA e RNA, mas os grupos com ocorrência em todos os manguezais, para o ciclo do nitrogênio, envolvidos na via de fixação de nitrogênio as classes mais frequentes foram Deltaproteobacteria (55,4% - 40,7%), Alphaproteobacteria (13,7% - 5,8%), Gammaproteobacteria (11,4% - 20,7%), Betaproteobacteria (5,9% - 12,6%), Chlorobia (5,4% - 2,3%), Dehalococcoidetes (4,1% - 0,4%, DNA e RNA, respectivamente) (Figura 10A). A comunidade desnitrificante foi dominada por Deltaproteobacteria (15% - 17,8%), Gammaproteobacteria (16% - 10,6%), Betaproteobacteria (14,1% - 5,3%), seguidas de Chlorobia (3% - 7%) Epsilonproteobacteria (2,3%) Chloflexi (1,9%) Alphaproteobacteria (1,7%), Flavobacteria (1,6%), Solibacteria (1% - 1%), e Clostridia (1%) (Figura 10B).

No ciclo do enxofre para a redução dissimilativa de sulfato, as classes mais frequentes foram Deltaproteobacteria (56,5% - 3,6%), Gammaproteobacteria (14% - 15,2%), Betaproteobacteria (10,4% - 16,1%), Alphaproteobacteria (1,1% - 2,0%) Chlorobia (1,0% - 1,3%) (Figura 10 C). Já para a oxidação do enxofre entre as classes que encontramos Betaproteobacteria (27,4% - 32,5%), Gammaproteobacteria (15,4% - 22,5%), Alphaproteobacteria (15,4% - 5,8%), Epsilonproteobacteria (12,4% - 16,2%), Chlorobia (3,8% - 1,0%) e Deltaproteobacteria (3,4% - 1,1%) foram as mais frequentes (Figura 10D).

Levando em consideração os dados de DNA e RNA, e entre as áreas estudadas, algumas classes são acessadas exclusivamente em determinadas áreas, como Clostridia para a fixação de nitrogênio na área BrMgv02 e Actinobacteria que não expressou o gene *nifH* na área BrMgv03 (DNA RNA) (Figura 10A).

Realizando desnitrificação a classe Termoprotei foi funcionalmente ativa, mas foi restrita a área mais contaminada (BrMgv02), Cytophagia expressou essa característica na área afetada (BrMgv03). Enquanto Halobacteria e Negativicutes foram acessadas nestas duas áreas, que exibem maior grau de contaminação, por derramamento de óleo e contaminação antropogênica, respectivamente. Clostridia também ficou restrita a área BrMgv02 (DNA e RNA) e apenas no metatranscriptoma da área BrMgv03, quando analisamos a redução dissimilatória, enquanto Chlorobia detectada nas áreas (BrMgv03 e BrMgv04) (Figura 10 C, D).

Figura 10 – Microorganismos que participam dos ciclos do nitrogênio (Fixação e Desnitrificação) e enxofre (Redução e Oxidação)

As classes Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria são as classes que mais se destacaram para as funções de fixação de nitrogênio, desnitrificação e redução dissimilativa de sulfato. Em relação a fixação de nitrogênio o grupo mais abundante foi Deltaproteobacteria no DNA e Gammaproteobacteria no RNA. Essas duas classes têm sido apontadas como dominantes estruturalmente no ambiente de manguezais (VARON-LOPES et al., 2014; XIAO-TAO et al., 2013; ANDREOTE et al., 2012), e agora há indícios de que estas sejam também as mais metabolicamente ativas neste ambiente.

Em particular, a classe Deltaproteobacteria demonstrou dominância para as três vias citadas (fixação biológica de nitrogênio, desnitrificação e redução dissimilatória de sulfato), com as ordens Syntrophobacterales (32,16% - 28,3%) e Desulfobacterales (28%- 34,4%) e Desulfomonadales (32,1% - 26,7%, DNA e RNA, respectivamente). Essa classe já foi apresentada como a mais frequente em manguezais chamando atenção para a necessidade de estudos buscando sua expressão genica nestes ambientes (ANDREOTE et al., 2012).

Trabalhos tem indicado Deltaproteobacteria como uma importante classe com grupos de microrganismos fixadores de nitrogênio em manguezais (DIAS et al., 2012), inclusive com unidades taxonômicas operacionais (sigla em inglês "OTUs"), que não se agruparam com nenhum grupo já descrito. Essa classe também é a mais dominante no ambiente de manguezais com a capacidade de reduzir o sulfato, composto abundante nestas áreas (VARON-LOPES et al., 2014; ANDREOTE et al., 2012).

Para o ciclo do nitrogênio Deltaproteobacteria foi relatada como uma classe envolvida com a fixação e desnitrificação (FLORES-MEIRELES et al., 2007; DIAS et al., 2012). Nossos dados, portanto, vem confirmar por meio de técnicas como as meta-ômicas, a alta atividade da classe Deltaproteobacteria em vias de alta relevância para a ciclagem de nitrogênio e enxofre, nos ambientes de manguezais, com atenção especial para áreas de contaminação por derramamento de óleo.

A classe Gammaproteobacteria foi mais bem representada pelas ordens Methylococcales (34,2% - 26,9%), seguida por Pseudomonadales (25,8% - 15,9%). Methylococcales foi restrita para as áreas com contaminadas por derramamento de óleo (BrMgv01 e BrMgv02), essas ordens contém membros metilotróficos (JOYE et al 2014) que podem atuar na degradação de componentes do óleo. Nos manguezais

virtualmente com contaminação antropogênica e sem contaminação Oceanopirilales (10,2% - 20,7%) foi mais ativa, para fixação biológica de nitrogênio.

Estudos recentes com a expressão de genes *nifH* em comunidades de zonas interditais apontaram Gammaproteobacteria e Deltaproteobacteria como as classes mais ativas para a fixação biológica do nitrogênio, com destaque para sua atividade em áreas de alta salinidade (SEVERIN et al., 2012)

Para o processo de desnitrificação Deltaproteobacteria: Syntrophobacterales (33,2% - 29,6%) Myxococcales (30,7% - 26,2%) e Desulfomonadales (16,7% - 18,3%), e Gammaproteobacteria: Chromatiales (23,7% - 29,6%), Alteromonadales (12% - 2%) a ordem Methylococcales (8,7% - 23%), e Pseudomonas (6% - 11%) foram as ordens que aumentaram sua representatividade nos dados de RNA indicando alta atividade dessas ordens junto com Chromatiales na desnitrificação em ambientes de manguezais. Quanto à atividade de Methylococcales, a exemplo do que aconteceu para a fixação de nitrogênio, onde manteve-se restrita as áreas contaminadas por óleo (BrMgv01 e BrMgv02), apresentou maior atividades nessas áreas, corroborando com a ideia de que esta ordem apresenta alta atividade metabólica nas com contaminação por derramamento de óleo. Chromatiales é uma ordem composta por microrganismos nitrificantes e oxidadores de enxofre, esses processos são amplamente distribuídos em solos de manguezais, corroborando a alta atividade dessa ordem nas áreas estudadas (Mori et al., 2008).

Para o ciclo do enxofre na redução de enxofre a classe Deltaproteobacteria foi a mais abundante, com Desulfomonadales (47% - 20%), Syntrophobacterales (14% - 18%) Myxococcales (25% - 13%), seguida de Gammaproteobacteria, representada principalmente por chromatiales (70 - 45%).

As classes mais abundantes envolvidas no processo de oxidação do enxofre foram Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria os resultados que corroboram com trabalhos recentes que apontam esses grupos como abundantes para esta característica em áreas de manguezais (VARON-LOPES et al., 2014). Betaproteobacteria - Burkholderiales (45,7% - 42,6%) Hydrogenophilales (37,2% - 48,4%). Para a classe Gammaproteobacteria a ordem Chromatiales (51% - 59%), foi a de maior frequência relativa, tanto no DNA como no RNA, se mostrando, com alta atividade metabólica e realizando a oxidação do enxofre nas áreas estudadas.

Epsilonproteobacteria tem sido reportada em manguezais, principalmente na zona da rizosfera de plantas (XIAO-TAO et al., 2013), encontramos essa classe

metabolicamente ativa para oxidação do S_2H ou enxofre elementar (S), em particular em áreas mais contaminadas (BrMgv02) onde notamos maior expressão dessa classe. A ordem Campylobacterales foi a única pertencente a classe Epsilonproteobacteria, além de apresentar alta frequência relativa em todos os manguezais, apresentou aumento na atividade metabólica, em particular no manguezal BrMgv02.

Bactérias oxidadoras de enxofre, incluídas na classe Epsilonproteobacteria são reportadas em vários ambientes, atuando na biodegradação em ambiente com alto teor de óleo (TAN et al., 2014a), assim como em ambientes marinhos e manguezais, onde a ordem Campylobacterales vem sendo reportada, principalmente na rizosfera das plantas. Nossos dados mostram essa ordem como a única representante da classe Epsilonproteobacteria, apresentando atividade em todas as áreas estudadas, atuando na oxidação de enxofre e desnitrificação, assim como ocorre em ambientes marinhos (BEHERA, et al., 2014).

As áreas exibem comunidades distintas para as vias dos ciclos biogeoquímicos abordados, há diferenças significativas entre as comunidades com o potencial genético (DNA), para atuar nesses processos, e a comunidade, metabolicamente ativa (RNA), nessas vias estudadas.

Para nosso conhecimento, esse é o primeiro trabalho que explora dados metagenômicos e metatranscriptômicos em manguezais, confirmando a presença e atividade de microrganismos como os pertencentes às classes Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria, como as mais ativas metabolicamente, em processos como fixação de nitrogênio, desnitrificação e redução de sulfato, enquanto a oxidação foi mais expressiva para as classes Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Epsilonproteobacteria essa última, em particular para o manguezal com maior contaminação por petróleo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo são primeiramente de grande importância por gerarem um enorme banco de dados a ser explorado em estudos posteriores. No entanto, de forma mais pragmática, as análises realizadas permitem obter as seguintes conclusões:

- Na análise do perfil taxonômico, os grupos de bactérias e arqueias mais frequentes pertencem às classes Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria e Metanohomicrobia e Methanobacteria, respectivamente. Além disso, identificamos pela primeira vez como grupo ativo a classe Zetaproteobacteria, mais representada nas análises de RNA do que nos dados de DNA em todos os manguezais;
- Grupos minoritários, como Mollicutes (Tenericutes), Erysipilotrichi (Firmicutes), Synergistia (Synergistetes), Thermodesulfobacteria (Thermodesulfobacteria), Ktedonobacteria (Chloroflexi) apresentaram aumento significativo nos dados de RNA, indicando que grupos microbianos pertencentes a biosfera rara tem funções importantes no funcionamento destes ecossistemas;
- O perfil funcional das comunidades dos ambientes estudados indicam a dominância de bactérias e arqueias, neste ambiente, expressando alta abundância de genes envolvidos com características de adaptação ao ambiente, em particular ligados a contaminação, como degradação de xenobióticos, além de genes relacionados a capacidade de competição das comunidades microbianas;
- Apesar de ter-se observado diferenças nas análises de DNA e RNA, observamos que de maneira geral há alta correlação entre o que se observa com base no DNA ou RNA. Isto sugere de que o *turnover* da comunidade microbiana nos solos de manguezais seja relativamente alto;
- Áreas de manguezais distintas em relação à contaminação apresentaram aumento na frequência de grupos distintos, como Epsilonproteobacteria, na área com contaminação por derramamento de óleo e Aquificae nas áreas com menor contaminação;

- Dentre as transformações do nitrogênio e do enxofre, os processos mais abundantemente representados nas análises de DNA e RNA foram a fixação biológica de nitrogênio, a desnitrificação, a redução dissimulatória e a oxidação enxofre. Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria foram as classes mais frequentemente relacionadas com as sequências afiliadas aos processos de fixação biológica de N_2 , desnitrificação e redução do enxofre, enquanto que Betaproteobacteria Gammaproteobacteria e Epsilonproteobacteria parecem ser as mais relacionadas aos processos de oxidação do enxofre.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C.; JURGENS, G.; DE MARCO, P.; SAANO, A.; BORDALO, A. Crenarchaeota and Euryarchaeota in temperate estuarine sediments. **Journal of Applied Microbiology**, London, v. 90, p. 713–718, 2001.
- ANDREOTE, F.D.; JIMENEZ, D.J.; CHAVES, D.; DIAS, A.C.F.; LUVIZOTTO, D.M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELLA, C.C.; BAENA, S.; LOPEZ, M.V.; TAKETANI, R.G.; MELO, I.S. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, p. 1-12, 2012.
- ARRIVABENE, H.P.; SOUZA, I.; CÓ, W.L.O.; RODELLA, R.A.; WUNDERLIN, D.A.; MILANEZ, C.R. Functional traits of selected mangrove species in Brazil as biological indicators of different environmental conditions. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 476/477 p. 496–504, 2014.
- BADIAL, P.R.; OLIVEIRA FILHO, J.P.; CUNHA, P.H.J.; CAGNINI, D.Q.; ARAÚJO JR., J.P.; WINAND, N.J.; BORGES, A.S. Identification, characterization and expression analysis of hepcidin gene in sheep. **Research in Veterinary Science**, London, v. 90, p. 443-450, 2011.
- BARKER, E.M.A.T. Wetlands in the natural environment: how do wetlands work? In: _____. (Ed.). **The wetlands handbook**. Oxford: Science, 2009. p. 155-170
- BARTOSSEK, R.; SPANG, A.; WEIDLER, G.; LANZEN, A.; SCHLEPER, C. Metagenomic analysis of ammonia oxidizing archaea affiliated with the soil group. **Frontier in Microbiology**, Lausanne, v. 3, p. 1-14, 2012.
- BEAZLEY, M.J.; MARTINEZ, R.J.; RAJAN, S.; POWELL, J.; PICENO, Y.M.; TOM, L.M.; ANDERSEN, G.L.; HAZEN, T.C.; NOSTRAND, J.V.N.; ZHOU, J.; MORTAZAVI, B.; SOBECKY, P.A. Microbial community analysis of a coastal salt marsh affected by the deepwater horizon oil spill. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, p. 1-13, 2012.
- BEHERA, B.C.; MISHRA, R.R.; THATOI, H.N. Sulfur oxidizing bacteria in mangrove ecosystem: a review. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 13, p. 2897-2907, 2014
- BOLHUIS, H.L.F.; STAL, L.J. Coastal microbial mat diversity along a natural salinity gradient. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, p. 1-13, 2013.
- BROOKER, R.W.; CALLAWAY, R.M.; CAVIERES, L.A.; ZAAL KIKVIDZE, Z.; LORTIE, C.J.; RICHARD MICHALET, R.; FRANCISCO, I.; PUGNAIRE, F.I.; VALIENTE-BANUET, A.; WHITHAM, T.G. Don't diss integration: a comment on Ricklefs's disintegrating communities: **The American Naturalist**, Chicago, v. 174, p. 919-927, 2009.
- BOHANNAN, J.M.; RODRIGUES, J.L.M.; MIRZA, B.S.; POTISAP, C.; NÜSSLEIN, C.B. Amazon rainforest microorganisms to land use change in the response. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 80, p. 281-291, 2014.

CAIN, J.A.; SOILS, N.; CORDWELL, S.J. Beyond gene expression: the impact of protein post-translational modifications in bacteria. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 97, p. 265-286. 2014.

CARVALHAIS, L.C.; DENNIS, P.G.; TYSON, G.W.; SCHENK, P.M. Application of metatranscriptomics to soil environments. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 91, p. 246-251, 2012.

CHAPLEUR, O.; BIZE, A.; THIBAUT SERAIN, T.; LAURENT MAZÉAS, L.; BOUCHEZ, T. Co-inoculating ruminal content neither provides active hydrolytic microbes nor improves methanization of ¹³C-cellulose in batch digesters. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 87, p. 616–62, 2014.

CHEN, C.Y.A.; EZZEDDINE, N.; SHYU, A.B. Messenger RNA half-life measurements in mammalian cells. **Methods in Enzymology**, New York, v. 448, p. 335-357, 2008.

COLLAVINO, M.M.; TRIPP, H.J.; FRANK, I.E.; VIDOZ, M.L.; CALDEROLI, P.A.; DONATO, M.; ZEHR, J.P.; MARIO AGUILAR, M.O. nifH pyrosequencing reveals the potential for location-specific soil chemistry to influence N₂-fixing community dynamics. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 16, p. 1-13, 2014.

DAVID, L.K. **Processes in microbial ecology**. Oxford: Oxford University Press, 2012. 328 p.

DAMON, C.; LEHEMBRE, F.; OGER-DESFEUX, C.; LUIS, P.; RANGER, J.; FRAISSINET-TACHET, L.; MARMEISSE, L. Metatranscriptomics reveals the diversity of genes expressed by eukaryotes in forest soils. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, p. 1-11, 2012.

DEANGELIS, K.M.; GLADDEN, G.M.; ALLGAIER, M.; D'HAESELEER, P.; FORTNEY, J.L.; REDDY, A.; HUGENHOLTZ, P.; SINGER, S.W.; GHEYNST, J.S.V.; SILVER, W.L.; SIMMONS, B.A.; HAZEN, T.C. Metagenomes of tropical soil-derived anaerobic switchgrass-adapted consortia with and without iron. **Bioenergy Research**, New York, v.3, p 146-158, 2010.

DEKAS, A.E.D.; PORETSKY, R.S.; ORPHAN, V.J. Deep-sea archaea fix and share nitrogen in methane-consuming microbial consortia. **Science**, Washington, v. 326, p. 422-426, 2009.

DIAS, A.C.F.; ANDREOTE, F.D.; RIGONATO, J.; FIORE, M.F.; MELO, I.S.; ARAÚJO, W.L. The bacterial diversity in Brazilian non-disturbed mangrove sediment. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 98, p. 541-551, 2010.

DIAS, A.C.F.; ANDREOTE, F.D.; DINI-ANDREOTE, F.; LACAVA, P.T.; SÁ, A.L.B.; MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. **World Journal Microbiology Biothechnology**, London, v. 25, p. 1305-1311, 2011.

DIAS, A.C.F.; SILVA, M.C.P.; COTTA, S.R.; DINI-ANDREOTE, B.F.; SOARES JR., C.F.L.; SALLES, J.F.S.; AZEVEDO, J.L.; JAN ELSAS, J.D.V.C.; ANDREOTE, F.D. Abundance and genetic diversity of nifH gene sequences in anthropogenically affected Brazilian mangrove sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, p. 7960-7967, 2012.

DIAS, C.D.F.; TAKETANI, R.G.; ANDREOTE, F.D.; LUVIZOTTO, D.M.; SILVA, J.L.; NASCIMENTO, R.S.; MELO, I.S. de. Interspecific variation of the bacterial community structure in the phyllosphere of the three major plant components of mangrove forests. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, p. 653-660, 2012.

DINI-ANDREOTE, F.; ANDREOTE, F.D.; ARAUJO, W.; TREVORS, J.; VAN ELSAS, J. Bacterial genomes: habitat specificity and uncharted organisms. **Microbial Ecology**, New York, v. 64, p. 1-7, 2012.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature**, London, v. 2, p. 621-631, 2004.

ELLEGAARD, M.; GIANG, T.N.N.; ANDERSEN, T.J.; MICHELSEN, A.; LAM, N.N.; HAI, D.N.; KRISTENSEN, E.; WECKSTRÖM, K.; HOANG S. T.P.; LUND-HANSEN, L.C. Temporal changes in physical, chemical and biological sediment parameters in a tropical estuary after mangrove deforestation. **Estuarine, Coastal and Shelf Science, Amsterdam**, v. 142, n. 7, p. 32-42, 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272771414000547>. Acesso em: 15/07/2014.

ERIK, R.; HAWLEY, E.R.; HAILAN, P.; SCOTT, N.M.; Malfatt, S.I.; PAGAN, I.; HUNTEMANN, M.; CHEN, A.; RIOT, J.D.; FOSTER, B.; COPELAND, A.; JANSSON, J.; PATI, A.; TRINGE, A.; GILBERT, J.A.; LORENSON, T.D.; HESS, M.H. Metagenomic analysis of microbial consortium from natural crude oil that seeps into the marine ecosystem offshore Southern California. **Standards in Genomic Sciences**, Washington, v. 7 p. 382-398, 2013.

FASANELLA, C.C.; DIAS, A.C.F.; JANAINA RIGONATO, J.; FIORE, M.F.; MELO, I.S.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ELSAS, J.D.V.; ANDREOTE, F.D. The selection exerted by oil contamination on mangrove fungal communities. **Water Air Soil Pollution**, Amsterdam, v. 223, p. 4233–4243, 2012.

FAWAZ, M.N. **Revealing the ecological role of gemmatimonadetes through cultivation and molecular analysis of agricultural soils**. 2013. 133 p. Thesis (Master's in Environmental and Soil Sciences) - University of Tennessee, Knoxville, 2013.

FERREIRA, T.O.; VIDAL-TORRADO, P.; OTERO, X.L.O.; MACÍAS, F. Are mangrove forest substrates sediments or soils? A case study in Southeastern Brazil. **Catena**, Amsterdam, v. 70, p. 79–91, 2007.

FLORES-MIRELES, A.L.; WINANS, S.C.; HOLGUIN, G.; Denitrifying bacteria associated with mangrove roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 7308–7321, 2007.

GABY, J.C.; BUCKLEY, D.H. A comprehensive aligned nifH gene database: a multipurpose tool for studies of nitrogen-fixing bacteria. **Database, Oxford Expresss**, Oxford, v. 2014, p.1-8, 2014.

GOMES, N.C.M.; BORGES, L.B.; PARANHO, R.; PINTO, F.N.; MENDOÇA-HAEGLER, L.C.S. Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forest. **FEMS Microbial Ecology**, Weinheim, v. 66, p. 96-109, 2008.

GREEN, S.J.; PRAKASH, O.; GIHRING, T.M.; AKOB, D.M.; JASROTIA, P.; JARDINE, P.M.; WATSON, D.B.; BROWN, S.D.; PALUMBO, A.V.; KOSTKA, J.E. Denitrifying bacteria isolated from terrestrial subsurface sediments exposed to mixed-waste contamination. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, p. 3244–3254, 2010.

GUPTA, R.S.; BHANDARI, V. Phylogeny and molecular signatures for the phylum Thermotogae and its subgroups. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 100, p. 1-3, 2011.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**, Valencia, v. 4, p. 1-9, 2001.

HAN, I.; CONGEEVARAM, S.; DONG-WON, K.; BYOUNG-TAEK, O.; PARK, J. Bacterial community analysis of swine manure treated with autothermal thermophilic aerobic digestion. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 89, p. 835-842, 2011.

HAWLEY, E.R.; PIAO, H.; SCOT, N.M.; Malfatti, S.; PAGANI, J.; HUNTEMANN, M.; AMY CHEN, A.; RIO, T.G.; FOSTER, B.; COPELAND, A.; JANSSON, J.; PATI, A.; TRINGE, S.; GILBERT, J.A.; LORENSON, T.D.; SHESS, M. Metagenomic analysis of microbial consortium from natural crude oil that seeps into the marine ecosystem offshore Southern California. **Standards in Genomic Sciences**, Washington, v. 9, p. 635-650, 2013.

HAYATSU, M.; TAGO, K.; SAITO, M. Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. **Soil Science and Plant Nutrition**, London, v. 54, p. 33–45, 2008.

HE, S.M.; IVANOVA, N.; KIRTON, E.; ALLGAIER, M.; BERGIN, C.; SCHEFFRAHN, R.H.; KYRPIDES, N.C.; WARNECKE, F.; TRINGE, S.G.; HUGENHOLTZ, P. Comparative metagenomic and metatranscriptomic analysis of hindgut paunch microbiota in wood- and dung-feeding higher termites. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, p. 1-18, 2013.

HESS, M.; SCZYRBA, A.; TAE-WAN, K.; CHOKHAWALA, H.; SCHROTH, G.; S.; CLARK, D.S.; ZHANG, T.; MACKIE, R.I.; PENNACCHIO, L.A.; TRINGE¹, S.G.;

VISEL, A.; WOYKE, T.; WANG, Z.; RUBIN, E.M.;. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. **Science**, Washington, v. 28, p. 463-467, 2011.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediments microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 33, p. 265-278, 2001.

HOLGUIN, G.; GONZALEZ-ZAMORANO, P.; DE-BASHAN, L.E.; MENDOZA, R.; AMADOR, E.; BASHAN, Y. Mangrove health in an arid environment encroached by urban development: a case study. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 363, p. 260–274, 2006.

HOLLIBAUGH, J.T.; GIFFORD, S.; SHARMA, S.; BANO, N.; MORAN, M.A. Metatranscriptomic analysis of ammonia-oxidizing organisms in an estuarine bacterioplankton assemblage. **ISME Journal**, Wageningen, v. 5, p. 866-878, 2011.

HUG, L.A.; CASTELLE, C.J.; WRIGHTON, K.C. THOMAS, B.C.; SHARON, I.; FRISCHKORN, K.R.; WILLIAMS, K.H.; TRINGE, S.G.; BANFIELD, J.F. Community genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the Chloroflexi phylum and indicate roles in sediment carbon cycling. **BioMed Central**, New York, v. 1, p. 1-17, 2013.

JANG, H.; KIM, Y.; CASTILLO, C.S.D.; NHO, S.; CHA, I.; PARK, S.; HA, M.; HIKIMA, J.; HONG, J.; AOKI, T.; JUNG, T. RNA-seq-based metatranscriptomic and microscopic investigation reveals novel metalloproteases of *Neobodo* sp. as potential virulence factors for soft tunic syndrome in *Halocynthia roretzi*: **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, p. 1-18, 2012.

JACOBS, J.A.; LEHR, J.H.; TESTA, S.M. The sulfur cycle: acid drainage and beyond. **Earth and Planetary Science Letters**, Amsterdam, v. 396, p. 14–21, 2014.

JIANG, N.F.; YEE, T.; HONG-WEI, Z.; YU, W.; HUA-FANG, S.; YAN, H.; JIN-YA, W.; YUN-XIA. Illumina tags and marine sediments by using millions of diversity in freshwater, intertidal wetland, comparison of the levels of bacterial. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, p. 8264–8271, 2012.

JI-QUAN, S.; LIAN, X.; ZHAO, Z.; LI, Y.; YUE-QIN, T.; XIAO-LEI, W. Diverse bacteria isolated from microtherm oil-production water. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 105, p. 401-411, 2014.

JOYE, S.B.; TESKE, A.P.; KOSTKA, J.; E. Microbial Dynamics Following the Macondo Oil Well Blowout across Gulf of Mexico Environments. **Oxford**, v. 64, p. 366 – 377, 2014.

KATO, S.; NAKAMURA, K.; TOK, T.; JUN-ICHIRO, I.; TSUNOGAI, U.; HIROTA, A.; OHKUMA, M.; YAMAGISHI, A. Iron-based microbial ecosystem on and below the seafloor: a case study of hydrothermal fields of the Southern Mariana Trough. **Frontier in Microbiology**, Lausanne, v. 3, p. 1-14, 2012.

- KANEHISA, M.; SUSUMU GOTO, S.G.; NAKAYA, A. The KEGG databases at GenomeNet. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, p. 42-46, 2002.
- KRAUSS, K.W.; MCKEE, K.L.; LOVELOCK, C.E.; DONALD, R.; CAHOON, D.R.; SAINTILAN, N.; RUTH REEF, R.; CHEN, L. How mangrove forests adjust to rising sea level. **New Phytologist**, Boston, v. 202 p. 19–34, 2014.
- KRYACHKO, Y.; DONG, X.; SENSEN, C.W.; GERRIT VOORDOUW, G. Compositions of microbial communities associated with oil and water in a mesothermic oil field. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 101, p. 493–506, 2012.
- KOZUBAL, M.A.; MACUR, RE; Z.J.BEAM, J.P.; MALFATT, S.A.; TRINGE, S.G.T.; KOCAR, B.D.; BORCH, T.; INSKEEP, W.P. Microbial iron cycling in acidic geothermal springs of Yellowstone National Park: integrating molecular surveys, geochemical processes, and isolation of novel Fe-active microorganisms. **Frontier in Microbiology**, Lausanne, v. 3, p. 1–16, 2012.
- LEIS, B.; ANGELOV, A.; LIEBL, D.W. Screening and expression of genes from metagenomes. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v. 83, p. 1-68, 2013.
- LELIE, D.; TAGHAV, S.; SEAN, M.; citar todos os autores. The metagenome of an anaerobic microbial community decomposing poplar wood chips. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, p. 1-20, 2012.
- LIMA, N.G.B.; GALVANI, E.G. Mangrove microclimate: a case study from Southeastern Brazil. **Earth Interactions**, Boston, v. 17, p. 2-16, 2013.
- LIU, Y.; BEER, L.L.; WHINTIMAN, .B. Sulfur metabolism in archaea reveals novel process. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 14, p. 2632-2012, 2012.
- LI, M.; CAO, H.; HONG, Y.; JI-DONG G. Spatial distribution and abundances of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in mangrove sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Berlin, v. 89, p. 1243–1254, 2011.
- LOVELL, C.R.; BAGWELL, C.E.; CZÁKÓ, M.; MÁRTO, L.; PICENO, Y.M.; RINGELBERG, D.B. Stability of a rhizosphere microbial community exposed to natural and manipulated environmental variability. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 38, p. 69-76, 2001.
- LV, X.; YU, J.; FU, Y.; BIN, M.; QU, F.; KAI NING, K.; WU, H. Meta-analysis of the bacterial and archaeal diversity observed in wetland soils. **Scientific World Journal**, New York, v. 2014, p. 1-12, 2014.
- MAITI, S.K.; CHOWDHURY, A. Effects of anthropogenic pollution on mangrove biodiversity: a review. **Journal of Environmental Protection**, Berkeley, v. 4, p. 1428-1434, 2013.

MCALLISTER, S.M.; DAVIS, R.E.; MCBETH, J.M.; TEBO, B.M.; EMERSON, D.; MOYE, C.L. Biodiversity and emerging biogeography of the Neutrophilic Iron-oxidizing Zetaproteobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, p. 5445-547, 2011.

MCBETH, J.M.; FLEMING, M.J.; EMERSON, D. The transition from freshwater to marine iron-oxidizing bacterial lineages along a salinity gradient on the Sheepscot River, Maine, USA. **Environmental Microbiology Reports**, Oxford, v. 5, p. 453–463, 2013.

MENDES, L.W.; TAKETANI, R.G.; NAVARRETE, A.A.; TSAI, S.M. Shifts in phylogenetic diversity of archaeal communities in mangrove sediments at different sites and depths in southeastern Brazil. **Research in Microbiology**, Paris, v. 163, p. 366-377, 2012.

MENDES, R.M.; KRUIJT, I.; DE BRUIJN, E.; DEKKERS, M.; VAN DER VOORT, J.H.M.; SCHNEIDER, Y.M.; PICENO, T.Z.; DESANTIS, G.L.; ANDERSEN, P.A.H.M.; BAKKER, P.A.; ; RAAIJMAKERS, J.M. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, Washington, v. 332, p. 1097-1100, 2011.

MEYER, B.; KUEVER, J. Molecular analysis of the diversity of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing procaryotes in the environment, using *aprA* as functional marker gene. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 33, p. 7664-7679, 2007.

MEYER, F.; PAARMANN, D.; D'SOUZA, M.; OLSON, R.; GLASS, E.M.; KUBAL, M.; PACZIAN, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS, R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R.A. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, London, v. 9, p. 386-395, 2008.

MORI, K.; KEN-ICHIRO, S.; URABE, T.; SUGIHARA, M.; TANAKA, K.; HAMADA, M.; HANADA, S.; *Thiopropfundum hispidum* sp. nov., an obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing gammaproteobacterium isolated from the hydrothermal field on Suiyo Seamount, and proposal of Thioalkalspiraceae fam. nov. in the order Chromatiales. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiol.** London, v.61, p. 2412-2418, 2011.

MURÍNOVÁ, S.; DERCOVÁ, K. Response mechanisms of bacterial degraders to environmental contaminants on the level of cell walls and cytoplasmic membrane. **International Journal of Microbiology**, Cairo, v. 2014, p. 1-16, 2014.

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

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. Trad. de A.A. Simões e W.R.N. Lori. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 250 p. total de páginas

NIFTRIK, L.V.; JETTEN, M.S.M. Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: unique microorganisms with exceptional properties. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 76, p. 585–596, 2012.

OFFRE, P.; SPANG, A.; SCHLEPER, C. Archaea in biogeochemical cycles. **The Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 67, p. 437–457, 2013.

OP DEN CAMP, H.J.M.; JETTEN, M.S.M.; STROUS, M. Anammox. In: BOTHE, H.; FERGUSON, S.J.; NEWTON, W.E. (Ed.). **Biology of the nitrogen cycle**. Oxford: Elsevier B.V., 2007. chap. 16, p. 244–282.

OP DEN CAMP, H.J.M.; ISLAM, T.; STOTT, M.B.; HARHANGI, H.R.; HYNES, A.; SCHOUTEN, S.; JETTEN, M.S.M.; BIRKELAND, N.K.; POL, A.; DUNFIELD, P.F. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic Verrucomicrobia. **Environmental Microbiology Reports**, Oxford, v. 11, p. 293–306, 2009.

OTTE, S.; KUENEN, J.G.; NIELSEN, L.P.; PAERL, H.W.; ZOPFI, J.; SCHULZ, H.N.; TESKE, A.; STROTMANN, B.; GALLARDO, V.A.; JORGENSEN, B.B. Nitrogen, carbon, and sulfur metabolism in natural thioploca samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 148–3157, 1999.

OVERBEEK, R.; BEGLEY, T.; BUTLER, R.M.V.; CHOUDHURI, J.V.; HAN-YU, C.; MATTHEW COHOON, M.; CRECY-LAGARD, V.; NARYTTZA DIAZ, N.; DISZ, T.; ROBERT EDWARDS, R.; FONSTEIN, M.D.; FRANK, D.; GERDES, S.M.; GLASS, E.M.; GOESMANN, A.; HANSON, A.; DIRK IWATA-REUYL, D.; JENSEN, R.; JAMSHIDI, N.J.; KRAUSE, L.; KUBAL, M.; LARSEN, N.; LINKE, B.; MCHARDY, A.C.; MEYER, F.; EUWEGER, H.; GARY OLSEN, G.; OLSON, R.; OSTERMAN, A.; PORTNOY, V.; PUSCH, G.D.; RODIONOV, D.A.; STEINER, C.R.J.; STEVENS, R.; THIELE, I.; VASSIEV, O.; YE, Y.; ZAGNITKO, O.; VONSTEIN, V. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. 5691–5702, 2005.

PARKS, D.H.; TYSON, G.W.; HUGENHOLTZ, P.; BEIKO, R.G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics Advance Access**, Oxford, v. 44, p. 1–2, 2012.

PETT-RIDGE, J.; FIRESTONE, M.K. Redox fluctuation structures microbial communities in wet tropical soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 6998–7007, 2005.

POEHLEIN, A.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL R. First insights into the genome of the Gram-negative, endospore-forming organism *Sporomusa ovata* strain H1 DSM 2662. **Genome Announcements**, Washington, v. 1, p. 1–2, 2013.

POWELL, S.; SZKLARCZYK, D.; BORK, P. EggNOG v3.0: orthologous groups covering 1133 Organisms at 41 different taxonomic ranges. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, p. 284–289, 2012.

PROSSER, J.I.; BOHANNAN, B.J.M.; CURTIS, T.P.; ELLIS, R.J.; FIRESTONE, M.K.; FRECKLETON, R.P.; GREEN, J.L.; GREEN, L.E.; KILLHAM, K.; LENNON, J.J.; OSBORN, A.M.; SOLAN, M.; VAN DER GAST, C.J.; YOUNG, J.P.W. The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 384-392, 2007.

PRIHA, O.; NYSSÖNEN, M.; BOMBERG, M.; LAITILA, A.; SIMELL, J.; KAPANEN, A.; JUVONEN, R. Oil fields for monitoring sulfate-reducing bacteria in high-performance liquid chromatography application of denaturing. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, p. 5186–5196, 2014.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J.L.; STAPLES, C.R.; BLANKENSHIP R.E. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 21, p. 541–554, 2004.

REED, D.; ALGAR, C.K.; HUBER, J.A.; DICK, G.J. Gene-centric approach to integrating environmental genomics and biogeochemical models. **PNAS Early**, Washington, v. 111, p. 1-12, 2014.

REDDY, A.P.; SIMMONS, C.W.; D'HAESELEER, P.; KHUDYAKOV, J.; BURD, H.; Discovery of microorganisms and enzymes involved in high-solids decomposition of rice straw using metagenomic analyses. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, p. 1-15, 2013.

RINKE, C.; SCHWIENTEK, P.; SCZYRBA, A.; IVANOVA, N.N.; ANDERSON, I.J.; JAN-FANG, C.; DARLING, A.; MALFATTI, S.; SWAN, B.K.; GIES, E.A.; DODSWORTH, J.A.; , B.P.; TSIAMIS, G.; SIEVERT, S.M.; WEN-TSO L.; EISEN, J.A.; HALLAM, S.J.; KYRPIDES, N.C.; STEPANAUSKAS, R.; RUBIN, E.M.; HUGENHOLTZ, P.; WOYKE, T. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. **Nature**, London, v. 499, p. 431–437, 2013.

ROSS OVERBEEK, R.; BEGLEY, T.; VONSTEIN, V. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 Genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. 5691-5702, 2005.

RUBIN-BLUM, M.; ANTLER, G.; TSADOK, R.; SHEMESH, E.; AUSTIN, J.J.A.; COLEMAN, D.F.; GOODMAN-TCHERNOV, B.N.; BEN-AVRAHAM, Z.; TCHERNOV, D. First evidence for the presence of iron oxidizing zetaproteobacteria at the levantine continental margins. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, p. 1-10, 2014.

RUI, J.; PENG, J.; LU, Y. Succession of bacterial populations during plant residue decomposition in rice field soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 4879-4886, 2009.

RYAN, A.; LESNIEWSKI, R.A.; JAIN, S.; ANANTHARAMAN, K.; SCHLOSS, P.; DICK, G.J. The metatranscriptome of a deep-sea hydrothermal plume is dominated by water column methanotrophs and lithotrophs. **The ISME Journal**, Wageningen, v. 6, p. 2257–2268, 2012.

SANTOS, P.C.S.; FANG, Z.; MASON, S.W.; SETUBAL, J.C.; RAY DIXON, R. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. **BMC Bioinformatics**, London, v. 13, p. 1-12, 2012.

SCHERR, K.E.; LUNDAA, T.; VIVIANA KLOSE, V.; BOCHMANN, G.; LOIBNER, A.P. Changes in bacterial communities from anaerobic digesters during petroleum hydrocarbon degradation. **J. of Biotechnology**, Amsterdam, v. 157, p. 564-472, 2012.

SEVERIN, I.; CONFURIUS-GUNS, V.; STAL, L.J. Effect of salinity on nitrogenase activity and composition of the active diazotrophic community in intertidal microbial mats. **Arch Microbiology**, Berlin, v. 194, p. 483–491, 2012.

SHERRY, A.; GRAY, N.D.; DITCHFIELD, A.K.; AITKEN, C.M.; JONES, D.M.; RÖLING, W.F.M.; ALLMANN, C.; LARTER, S.R.; BOWLER, B.F.J.; HEAD, I.M. Anaerobic biodegradation of crude oil under sulphate-reducing conditions leads to only modest enrichment of recognized sulphate-reducing taxa. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Manchester, v. 81, p. 105-113, 2013.

SHUHEI YABE, S.; AIBA, Y.; SAKAI, Y.; HAZAKA, M.; YOKO, A. *Thermosporothrix hazakensis* gen. nov., sp. nov., isolated from compost, description of *Thermosporotrichaceae* fam. nov. within the class *Ktedonobacteria* Cavaletti et al. 2007 and emended description of the class *Ktedonobacteria*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 60, p. 1794–1801, 2010.

SINGH, M.; SAREEN, D. Novel LanT associated antibiotic clusters identified by genome database mining. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, p. 1-17, 2014.

SONTHIPHAND, P.; HALL, M.W.; NEUFELD, J.D. Biogeography of anaerobic ammonia-oxidizing (anammox) bacteria. **Frontier in Microbiology**, Lausanne, v. 5, p. 1-14, 2014.

SPIECK, E.; WENZEL, S.T.; EBERHARD BOCK, E.; LUDWIG, W. Characterization of a new marine nitrite oxidizing bacterium, *Nitrospina watsonii* sp. nov., a member of the newly proposed phylum “Nitrospinae”. **Systematic. Applied Microbiology**, Berlin, v. 37, p. 170–176, 2014.

SRINIVASAN, G.P.; SIKKANTHAR, A.; ELAMARAN, A.; DELMA, A.R.; SUBRAMANIYAN, K.; SOMASUNDARAM, S.T. Biodegradation of carcinogenic textile azo dyes using bacterial isolates of mangrove sediment. **Journal of Coastal Life Medicine**, Hainan Province, v. 2, p. 154-162, 2014.

SUMMERS, D.P.; BASA, R.C.B.; KHARE, B.; RODONI, D. Abiotic nitrogen fixation on terrestrial planets: reduction of N_2 to Ammonia by FeS. **Astrobiology**, San Francisco, v. 12, p. 110-114, 2012.

TAKETANI, R.G.; SANTOS, H.F. dos; VAN ELSAS, J.D.; ROSADO, A.S. Characterization of the effect of a simulated hydrocarbon spill on diazotrophs in mangrove sediment mesocosm. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 96, p. 343–354, 2009.

TAKETANI, R.G.; YOSHIURA, C.A.; DIAS, A.C.F.; ANDREOTE, F.D.; TSAI, S.M. Diversity and identification of methanogenic archaea and sulphate-reducing bacteria in sediments from a pristine tropical mangrove. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 97, p. 401–411, 2010.

TAKASAKI, K.; MIURA, T.; KANNO, M.; TAMAKI, H.; HANADA, S.; KAMAGATA, Y.; KIMURA, N. Discovery of glycoside hydrolase enzymes in an avicel-adapted forest soil fungal community by a metatranscriptomic approach: **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, p. 1-16, 2013.

TAN, B.; FOGHT, J. Draft Genome Sequences of Campylobacteriales (Epsilonproteobacteria) Obtained from Methanogenic Oil Sands Tailings Pond Metagenomes. **Genome Announcements**, Washington, v. 2 p. 1-2, 2014.

TAKETANI, R.G.A.; LIMA, E.; CONCEIÇÃO, J.; TEIXEIRA, W.; TIEDJE, J.; TSAI, S. Bacterial community composition of anthropogenic biochar and Amazonian anthrosols assessed by 16S rRNA gene 454 pyrosequencing. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 104, p. 233-242, 2013.

TATUSOV, R.L.; FEDOROVA, N.D.; JACKSON, J.D.; JACOBS, A.R.; KIRYUTIN, B.; KOONIN, E.V.; KRYLOV, D.M.; AZUMDER, R.; MEKHEDOV, S.L.; NIKOLSKAYA, A.N.; RAO, B.S.; SMIRNOV, S.S.; SVERDLO, A.V.; VASUDEVAN, S.; WOLF, Y.I.; YIN, J.J.; NATALE, D.A. The COG database: an updated version includes eukaryotes. **BMC Bioinformatics**, London, v. 4, p. 1-14, 2003.

THOMPSON, C.E.; BEYS-DA-SILVA, W.O.; SANTI, L.; BERGER, M.; VAINSTEIN, M.H.; RÃES, J.A.G.; VASCONCELOS, A.T.R. A potential source for cellulolytic enzyme discovery and environmental aspects revealed through metagenomics of Brazilian mangroves. **AMB Express**, Andrimont, v. 3, p. 1-18, 2013.

TOSTEVIN, R.; TURCHYN, A.V.; FARQUHAR, J.; JOHNSTON, D.T.; ELDRIDGE, D.L.; BISHOP, J.K.B.; MCILVIN, M. Multiple sulfur isotope constraints on the modern sulfur cycle. **Earth and Planetary Science Letters**, Amsterdam, v. 396, p. 14–21, 2014.

THURESLOREN, P. LUDIN, D.; PLANTHAN, J.; POOLE, A.M.; BRITT-MARIE, S.; SJOLING, S. A metagenomics transect into the deepest point of the Baltic Sea reveals clear stratification of microbial functions capacities. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, p. 1-11, 2013.

TVEIT, A.; URICH, T.; SVENNING, M.M. Meta transcriptomic analysis of Arctic peat soil microbiota. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 80, n. 18, p. 5761-5772, 2014.

URICH, T.; LANZE, A.; QI, J.; HUSON, D.H.; SCHLEPER, C.; SCHUSTER, S.C. Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the meta-transcriptome. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, p. 1-18, 2013.

UROZ, S.; IOANNIDIS, P.; LENGELLE.; CE´BRON, A.; MORIN, E.; BUE´E, M.; MARTIN, F. Functional assays and metagenomic analyses reveals differences

between the microbial communities inhabiting the soil horizons of a Norway Spruce plantation. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, p 1-13, 2013.

VALENTÍN, L.; NOUSIAINEN, A.; MIKKONEN, A. Emerging Organic Contaminants in Sludges In: VICENT, T. **Introduction to organic contaminants in soil: concepts and risk**. Berlin: Springer, 2012. p. 1-29, (Chemistry, 24).

VANZOMEREN, C.M.; WHITE, J.R.; DELAUNE, R.D. Ammonification and denitrification rates in coastal Louisiana bayou sediment and marsh soil: Implications for Mississippi river diversion management. **Ecological Engineering**, Oxford, v. 54, p. 77– 81, 2013.

VARON-LOPEZ, M; DIAS, A.C.F.; FASANELLA, C.C.; DURRER, A.; MELO, I. S.; KURAMAE, E.E.; ANDREOTE, F.D. Sulphur-oxidizing and sulphate-reducing communities in Brazilian mangrove sediments. **Environmental Microbiology**. Oxford, v. 16, p. 845–855, 2014.

VIDEIRA, S.S.; OLIVEIRA, D.M.; MORAIS, R.F.; BORGES, W.L.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant and Soil**, Berlin, v. 356, p. 51-66, 2012.

VOSENBERG, J.V.; WOEBKEN, D.; MAALCKE, W.J.; WESSELS H.G.C.T.; DUTILH, B.E.; KARTAL, B.; SEN-MEGENS, E.M.J.; ROESELERS, G.; YAN, J.; SPETH, D.; GLOERICH, J.; GEERTS, W.; BIEZEN, E.V.D.; PLUK, W.; KEES-JAN, F.; RUSS, L.; LAM, P.; . Malfatti S.A.; TRINGE, S.G.; HAAIJER, S.C.M.; OP DEN CAMP, M.; STUNNENBERG, H.G.; AMANN, R.; KUYPERS, M.M.M.; JETTEN, M.S.M. The metagenome of the marine anammox bacterium '*Candidatus scalindua profunda*' illustrates the versatility of this globally important nitrogen cycle. **Environmental Microbiology**. Oxford, v. 15, p. 1275-1289, 2013.

WILKE, A.; HARRISON, T.; WILKENING, J.; FIELD, D.; GLASS, E.M.; KYRPIDES, N.; MAVROMMATIS, K.; MEYER, F. The M5nr: a novel non-redundant database containing protein sequences and annotations from multiple sources and associated tools. **BMC Bioinformatics**, London, v. 13, p. 1-5, 2012.

WONGWILAIWALIN, S.; RATTANACHOMSRI, U.; LAOTHANACHAREON, T.; EURWILAICHITR, L.; IGARASHI, Y.; CHAMPREDA Comparative metagenomic analysis of microcosm structures and lignocellulolytic enzyme systems of symbiotic biomass-degrading consortia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 97, p. 8941-8954, 2013.

WRIGHT, J.J.; MEWIS, K; HANSON, N.H.; KONWAR1, K.M.; MAAS, K.R.; HALLAM, S.J. Genomic properties of marine group A bacteria indicate a role in the marine sulfur cycle. **The ISME Journal**, Wageningen, v. 8, p. 455–468, 2014.

WU, J.; GAO, W.; JOHNSON, R.H.; ZHANG, W.; MELDRUM, D.R. Integrated metagenomic and metatranscriptomic analyses of microbial communities in the

meso- and bathypelagic realm of North Pacific Ocean. **Marine Drugs**, Basel, v. 11, p. 3777-3801, 2013.

XIAO_TAO, J.; XIN, P.; GUAN-HUD, W.; HUA-FANG, S.; YU, W.; HONG-WEI, Z.; FUNG-YEE, N.T. Illumina sequencing of 16S rRNA tag revealed spatial variations of bacterial communities in a mangrove wetland. **Microbial Ecology**, Oxford, v. 66, p. 96-104, 2013.

XIONG, J.; YE, X.; WANG, K.; CHEN, H.; HU, C.; ZHU, J.; ZHANG, D. Biogeography of the sedimental bacterial community responds to nitrogen pollution gradient in the East China Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v. 80, p. 1-8, 2013.

YOU, Y.; WANG, J.; HUANG, X.; TANG, Z.; LIU, S.; SUN, O.J. Relating microbial community structure to functioning in forest soil organic carbon transformation and turnover: **Ecology and Evolution**, Oxford, v. 4, p. 633-647, 2014.

YUTIN, N.; GALPERIN, M.Y. A genomic update on clostridial phylogeny: gram-negative spore-formers and other misplaced clostridia. **Environ. Microbiol.**, Oxford, v. 15, p. 2631–2641, 2013.

ZEHR, J.P.; WYMAN, V.M.; DUGUAY, M.L.; CAPONE, D.G. Modification of the Fe protein of nitrogenase in natural-populations of *Trichodesmium-thiebautii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v. 59, p. 669-676, 1993.

ZELEKE, J.; SHENG, Q.; JIAN-GONG, W.; MING-YAO, H.; JI-HUA, F.W.; ZHE-XUE, Q. Effects of *Spartina alterniflora* invasion on the communities of methanogens and sulfate-reducing bacteria in estuarine marsh sediments. **Frontier in Microbiology**, Lausanne, v. 4, p. 1-13, 2013.

ZHAO-MING, G.; XUN XU, X.; LING-WEI, R. Enrichment and characterization of an anaerobic cellulolytic microbial consortium SQD-1.1 from mangrove soil **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v. 98, p. 465–474, 2014.

ZHUO, J.; HE, Q.; HEMME, C.L.; MUKHOPADHYAY, A.; HILLESLAND, K.; ZHOU, A.; HE, Q.; VAN NOSTRAND, J.D.; WALL, J.D.; ARKIN, A.P. How sulphate-reducing microorganisms cope with stress: lessons from systems biology. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 9, p. 452-466, 2011.