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

Caracterização genômica e metabólica de Planctomycetes isolados de solos de
manguezais brasileiros

Juliana Eschholz de Araujo

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2018

Juliana Eschholz de Araujo
Bacharel em Biomedicina

**Caracterização genômica e metabólica de Planctomycetes isolados de solos de
manguezais brasileiros**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

Prof. Dr. **FERNANDO DINI ANDREOTE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2018

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

Araujo, Juliana Eschholz de

Caracterização genômica e metabólica de Planctomycetes isolados de solos de manguezais brasileiros / Juliana Eschholz de Araujo. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

146 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Cultivo 2. Degradação de hidrocarbonetos de petróleo 3. Técnicas independentes de cultivo I. Título

Dedido este trabalho aos meus pais por toda a dedicação e abdicação que tiveram por mim em todos os anos de minha vida, são eles: Maria Célia Eschholz de Araujo e Gilson Diniz de Araujo com todo carinho;

E em especial com todo meu amor a minha irmã Fernanda Eschholz de Araujo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda força nos momentos difíceis e por nunca ter me abandonado;

Aos meus pais pelo apoio, incentivo e amor;

A minha irmã Fernanda por tudo de mais lindo nessa vida, só tenho que agradecer por ela simplesmente existir;

A minha família Eschholz e Araujo pelo apoio, em especial *in memoriam* de Ricardo, Rogério, Ilze, Anélia e João;

As agências de fomento CAPES e Cnpq pelo apoio financeiro nesses anos de trabalho, sejam em congressos ou na vivência no exterior;

Ao orientador e amigo Prof. Dr. Fernando Andreote por anos de ensinamentos, dedicação e acima de tudo, amizade e apoio nos momentos difíceis;

Ao técnico da EMBRAPA e Meio Ambiente de Jaguariúna, João, pelo precioso auxílio nas coletas de campo, de extrema importância nesse trabalho;

Aos técnicos de laboratório Denise, Fernando e Sônia por todo o suporte no laboratório;

Ao Dr. Rodrigo Taketani pela paciência e pelos ensinamentos valiosos de bioinformática;

A Dra. Michele de Cássia pela ajuda sempre bem-vinda, trocas de experiências, ensinamentos e amizade;

A Dra. Valéria Maia de Oliveira pela contribuição na tese;

A Dra. Danice (Metal) por me ensinar o princípio no laboratório, amizade e companheirismo;

A amiga Cristiane Cipolla pela amizade e pelo carinho comigo;

Aos amigos de trabalho: Alessandra, Armando, Ademir, Ana Luisa, Bruna Arruda, Catia, Danizinha, Kelly, Luana, Simone, Polé, Diogo, Pedro, Joelma, Dig, Mylenne, Julia, Yasmin, Thiago, Maryeimy, Dorotéia, Caio, Felipe

Aos professores Dr. Jan Dirk van Elsas e profa. Dra. Joana Falcão da Universidade de Groningen por terem me recebido tão bem e pelos imensos ensinamentos nos 6 meses de Sandwiche;

Aos amigos de Groningen Maju e Fran pelo apoio e enorme amizade gerada nos 6 meses de uma super experiência;

Ao Adjie Pratama pela parceria nos trabalhos no RUG;

A Casa do Seu Heleno e em especial as meninas com quem convivi: Layanne, Michele, Jéssica, Letícia, Nats, Amanda Nudes, Bablopes, Ana Lúgia e Laís;

Ao grupo Fica Zica por tantas risadas;

A querida Maria Fernanda Almeida Prado, por tanta amizade, risadas e conselhos;

A Família Dias por me receberem sempre de braços abertos e em especial a Aline pela amizade nos momentos que precisei enquanto estive na Holanda, pelas orações da querida Dona Glória e pelo carinho e companhia de Ademi Dias e amizade das cunhadas Gabriele e Amanda.

*“Mas eu sei que um dia a gente aprende,
Se você tiver alguém em quem confiar,
Confie em si mesmo,
Quem acredita sempre alcança”.*

Renato Russo

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 MANGUEZAIS – CARACTERÍSTICAS E MICROBIOTA	13
2.2 CARACTERÍSTICAS DOS MANGUEZAIS AVALIADOS NESTE ESTUDO	15
2.3 CARACTERÍSTICAS DO FILO PLANCTOMYCETES	16
2.4 ISOLAMENTO E CULTIVO DE <i>PLANCTOMYCETES</i>	20
2.5 PERFIL METABÓLICO DE BACTÉRIAS PERTENCENTES AO FILO PLANCTOMYCETES	21
2.6 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E SEQUENCIAMENTO DE GENOMAS DE PLANCTOMYCETES.....	22
2.7 O PAPEL DOS PLANCTOMYCETES NAS VIAS DE DEGRADAÇÃO DE POLUENTES E NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	24
2.8 MICROBIOLOGIA MOLECULAR: ACESSO A BIODIVERSIDADE MICROBIANA NÃO CULTIVADA	25
2.9 DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DERIVADOS DO PETRÓLEO	27
REFERÊNCIAS	28
3 DIVERSIDADE TAXONÔMICA E FUNCIONAL DE PLANCTOMYCETES EM SOLOS DE MANGUEZAIS.....	39
RESUMO.....	39
ABSTRACT	39
3.1 INTRODUÇÃO	40
3.2.1 LOCAL DE COLETA	42
3.2.2 AMOSTRAGEM.....	42
3.2.3 EXTRAÇÃO DE DNA.....	42
3.2.4 PIROSEQUENCIAMENTO DO GENE 16S DNAR PARA BACTÉRIAS	43
3.2.5 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S DNAR	43
3.2.6 SEQUENCIAMENTO DO DNA DO SOLO VIA ILLUMINA HiSeq 2000	44
3.2.7 PROCESSAMENTO DAS SEQUENCIAS OBTIDAS POR ILLUMINA HiSeq 2000	45
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.3.1 COMPARAÇÃO DAS COMUNIDADES DE DE PLANCTOMYCETES	45
3.3.2 PREDIÇÃO METAGENÔMICA DA COMUNIDADE DE PLANCTOMYCETES A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS DO GENE RIBOSSOMAL 16S.....	51
3.3.3 OCORRÊNCIA DE SEQUENCIAS GÊNICAS RELACIONADAS A BIODEGRADAÇÃO DE XENOBIÓTICOS EM DADOS METAGENÔMICOS.....	60
3.4 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63
4 CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS PERTENCENTES AO FILO PLANCTOMYCETES OBTIDOS DE SOLOS DE MANGUEZAIS.....	71
RESUMO.....	71
ABSTRACT	71
4.1 INTRODUÇÃO	72
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	73
4.2.1 PREPARO DAS AMOSTRAS DE SOLO DE MANGUEZAIS	73
4.2.2 PREPARO DO MEIO DE CULTIVO ESPECÍFICO PARA PLANCTOMYCETES.....	73
4.2.3 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS DE PLANCTOMYCETES	74
4.2.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS ISOLADOS DE PLANCTOMYCETES.....	74
4.2.5 ANÁLISE DE PERFIL GENÔMICO DOS ISOLADOS POR BOX-PCR	74
4.2.6 SEQUENCIAMENTO DE GENOMAS POR MEIO DA METODOLOGIA DE ION TORRENT.....	75
4.2.7 TRATAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E MONTAGEM DOS <i>CONTIGS</i>	75

4.2.8	ANOTAÇÃO E AFILIAÇÃO FILOGENÉTICA	76
4.2.9	ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS POR MICROSCOPIA	76
4.2.10	PERFIL METABÓLICO DOS ISOLADOS DESCRITOS	76
4.2.11	TOLERÂNCIA DOS ISOLADOS A SALINIDADE	76
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4.3.1	ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS AFILIADAS AO GRUPO DE PLANCTOMYCETES	77
4.3.2	FILOGENIA DE BACTÉRIAS AFILIADAS A PLANCTOMYCETES.....	78
4.3.3	ANÁLISE DE PERFIS GENOTÍPICOS DOS ISOLADOS DETERMINADOS POR BOX-PCR	84
4.3.4	GENÔMICA DOS ISOLADOS <i>RHODOPIRELLULA</i> SP. MGVS E <i>RHODOPIRELLULA BALTICA</i> BR-MGV	85
4.3.5	MORFOLOGIA CELULAR DOS ISOLADOS ESTUDADOS	87
4.3.6	PERFIL METABÓLICO DOS ISOLADOS EM ESTUDO.....	88
4.3.7	TOLERÂNCIA DOS ISOLADOS A SALINIDADE	91
4.4	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	93
	APÊNDICES	98
5	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE PLANCTOMYCETES NA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS.....	101
	RESUMO	101
	ABSTRACT	101
5.1	INTRODUÇÃO	102
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	104
5.2.1	TRIAGEM DO DESENVOLVIMENTO MICROBIANO EM MEIOS COM HIDROCARBONETOS.....	104
5.2.2	ANÁLISES MOLECULARES DOS ISOLADOS POSITIVOS NO TESTE DE DEGRADAÇÃO	104
5.2.3	ANÁLISES FILOGENÉTICAS	104
5.2.4	SEQUENCIAMENTO DE GENOMAS POR MEIO DA METODOLOGIA ILLUMINA MiSEQ	105
5.2.5	TRATAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E MONTAGEM DOS <i>CONTIGS</i>	105
5.2.6	ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS GENES CODIFICADORES DAS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NAS VIAS DE DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS.....	106
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
5.3.1	PLANCTOMYCETES TOLERANTES A HIDROCARBONETOS	106
5.3.2	AFILIAÇÃO FILOGENÉTICA E TAXONÔMICA DOS PLANCTOMYCETES CAPAZES DE TOLERAR HIDROCARBONETOS.....	108
5.3.3	PROPRIEDADES GENÔMICAS DOS ISOLADOS ESTUDADOS.....	111
5.3.4	ANOTAÇÃO DE FUNÇÕES RELACIONADAS A DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS PELA PLATAFORMA RAST.....	118
5.3.5	BUSCA GENÔMICA POR ENZIMAS PARTICIPANTES DAS VIAS DE DEGRADAÇÃO DE HPA.....	120
5.3.6	ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS GENES CODIFICADORES DE PROTEÍNAS DO ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS.....	124
5.3.7	GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO SECUNDÁRIO.....	128
5.4	CONCLUSÃO	136
	REFERÊNCIAS	136
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	145

RESUMO

Caracterização genômica e metabólica de *Planctomycetes* isolados de solos de manguezais brasileiros

Os *Planctomycetes* são bactérias que possuem características peculiares, ainda pouco conhecidas. São bactérias de difícil cultivo, sendo descritas em diversos ambientes, mas frequentemente isoladas de ambientes marinhos, principalmente em associações com algas. Aqui apresentamos um amplo estudo deste grupo em solos de manguezais, e reportamos de maneira inovadora o isolamento dessas bactérias. A comparação das comunidades de *Planctomycetes* em manguezais com diferentes históricos de contaminação permitiu fazer inferências sobre a resposta da comunidade ao ambiente. A análise de sequências pertencentes a este filo, obtidas a partir de amostras dos manguezais – tanto sequências do gene 16S DNAr ou sequências metagenômicas – permitiu inferir sobre a diversidade e as funções destes grupos nos solos dos manguezais estudados. Destacam-se dentre estas o aumento da biodiversidade deste grupo em áreas contaminadas, e as evidências de sua participação na degradação de xenobióticos (demonstrada por predição metagenômica baseada em biblioteca de 16S rDNA, e análise de sequências metagenômicas). Com estes resultados, foram encontrados em dados metagenômicos, a ocorrência de genes envolvidos na biodegradação de compostos intermediários centrais das vias de degradação. Adicionalmente, mesmo com a dificuldade no cultivo de membros desse grupo, foram obtidos 43 isolados afiliados filogeneticamente principalmente às espécies *Blastopirellula marina*, *Rhodopirellula baltica* e *Planctomycetes* sp. e *Pirellula*. Foram selecionados dois isolados (*Rhodopirellula* sp. MGV e *Rhodopirellula baltica* BR-MGV) para estudos genômicos e metabólicos (via análise de consumo de diferentes fontes de carbono-Biolog). Além disso, foi realizado teste de degradação de hidrocarbonetos com os 43 isolados aferindo as respostas ao contato com contaminantes como hexadecano, naftaleno, fenantreno e fenol. Cinco isolados mostraram a capacidade em degradar três diferentes hidrocarbonetos exceto fenantreno. Estes isolados (*Blastopirellula cremea* Hex-1 MGV, *Blastopirellula marina* Nap-Phe MGV, *Blastopirellula cremea* Hex-2 MGV, *Blastopirellula cremea* Hex PRIS-MGV e *Blastopirellula marina* Nap PRIS-MGV) foram enviados a uma análise genômica e suas anotações indicaram a presença de genes envolvidos em vias de degradação de hidrocarbonetos corroborando com o teste realizado em laboratório de degradação dos hidrocarbonetos. Além disso, foi observada através das anotações dos genomas desses microrganismos a ocorrência de síntese de metabólitos secundários, sendo os principais terpenos, bacteriocinas e resorcinol.

Palavras-chave: Cultivo; Degradação de hidrocarbonetos de petróleo; Técnicas independentes de cultivo

ABSTRACT

Genomic and metabolic characterization of Planctomycetes isolates from Brazilian mangrove soils

Planctomycetes are bacteria with peculiar characteristics and still little known. They are bacteria of difficult cultivation, being described in diverse environments, but often isolated from marine environments, mainly in associations with algae. Here we present an extensive study of this group in mangrove soils and report in an innovative way the isolation of these bacteria. The comparison of the communities of Planctomycetes in mangroves with different contamination histories allowed to make inferences about the response of the community to the environment. The analysis of sequences from this phylum, obtained from samples of the mangroves - both sequences of the 16S DNA gene or metagenomic sequences - allowed to infer about the diversity and the functions of these groups in the mangrove soils studied. The highlights are the increase of this group's biodiversity in contaminated areas, and evidence of its participation in the degradation of xenobiotics (demonstrated by 16S rDNA library-based metagenomic prediction and metagenomic sequence analysis). With these results, the occurrence of genes involved in the biodegradation of central intermediates of the degradation pathways was found in metagenomic data. In addition, even with the difficulty in the cultivation of members of this group, 43 isolates belonging to this phylum were obtained phylogenetically, mainly the species *Blastopirellula marina*, *Rhodopirellula baltica* and *Planctomycetes* sp. and *Pirellula*. Two isolates (*Rhodopirellula* sp. MG1 and *Rhodopirellula baltica* BR-MG1) were selected for genomic and metabolic studies (via consumption analysis of different sources of carbon-Biolog). Furthermore, a hydrocarbon degradation test was performed with this library of 43 isolates, assessing the responses to contact with contaminants such as hexadecane, naphthalene, phenanthrene and phenol. Five isolates showed the ability to degrade three different hydrocarbons except phenanthrene. These isolates (*Blastopirellula cremea* Hex-1 MG1, *Blastopirellula marina* Nap-Phe MG1, *Blastopirellula cremea* Hex-2 MG1, *Blastopirellula cremea* Hex PRIS-MG1 and *Blastopirellula marina* Nap PRIS-MG1) were sent to a genomic analysis and their notes indicated the presence of genes involved in hydrocarbon degradation pathways, corroborating with the laboratory test for hydrocarbon degradation. In addition, the synthesis of secondary metabolites was evaluated through the annotations of the genomes of these microorganisms, being the main terpenes, bacteriocins and resorcinol.

Keywords: Cultivation; Degradation of petroleum hydrocarbons; Independent cultivation techniques

1. INTRODUÇÃO

Os manguezais são caracterizados por uma alta diversidade de organismos, que se desenvolvem em solos que possuem características únicas, como alta salinidade e temperatura predominância da anaerobiose, dando origem a elevados níveis de matéria orgânica, associados a baixa disponibilidade de nutrientes, o que resulta na grande importância da atividade microbiana na ciclagem de nutrientes nesse ambiente.

Uma das possibilidades de se obter um melhor entendimento sobre o papel microbiano neste ambiente reside na estratégia de combinar a exploração de métodos independentes de cultivo com o isolamento e a caracterização de isolados de um grupo microbiano de interesse. As bactérias afiliadas ao filo Planctomycetes são alvo desta proposta por apresentarem características que necessitam de maiores estudos nos manguezais, como por exemplo, participação na degradação de matéria orgânica, degradação de xenobióticos, e consequente ciclagem de nutrientes. Tendo em vista que os manguezais em estudo apresentam distintos históricos de preservação, sendo que alguns sofreram há anos atrás com um derramamento de petróleo, sugere-se que estas bactérias sejam capazes de atuar na degradação dos contaminantes.

Estudos *in silico* sobre a taxonomia e funcionalidade podem mostrar a estruturação diferencial destas comunidades em manguezais com diferentes históricos de conservação, além de fornecer previsões da funcionalidade microbiana neste ambiente. De forma acoplada, os métodos de cultivo e caracterização de isolados (mesmo de difícil cultivo como os Planctomycetes), complementam a análise de sequências de DNA, suprimindo mais informações sobre o metabolismo destes organismos e sua capacidade em degradar contaminantes ambientais.

Outra oportunidade bastante interessante da estratégia de cultivo microbiano, é a possibilidade da obtenção de sequências de genomas microbianos, as quais fornecem o embasamento genético para os fenótipos observados nos cultivos. A genômica de organismos de manguezais, e de grupos pertencentes ao filo Planctomycetes, são pouco exploradas quando comparadas a outros sistemas, o que faz desta possibilidade bastante promissora dentro do presente estudo.

Esta tese de doutorado engloba todas estas frentes de trabalho, passando por análises *in silico*, como a análise de sequências do gene 16S DNAr das áreas de manguezais, enfatizando as sequências provindas de Planctomycetes, onde foi revelada a capacidade

dessas bactérias de participarem de alguma forma na degradação de contaminantes (xenobióticos). Além destas, foram realizadas análises de microbiologia clássica, baseadas no isolamento de bactérias do filo Planctomycetes a partir de amostras de solos dos manguezais com diferentes graus de contaminação. Essas bactérias por muito tempo foram consideradas de difícil cultivo e foram aqui cultivadas pela primeira vez a partir de manguezais. Com o sucesso no isolamento, foram desenvolvidas análises profundas dessas bactérias sobre sua funcionalidade dentro desse ecossistema. Com isso, os isolados foram analisados morfolologicamente e geneticamente, inicialmente com dois representantes desse grupo de bactérias (*Rhodopirellula* sp. MGV e *Rhodopirellula baltica* BR-MGV), nos quais foram encontrados genes que participam do Metabolismo de Compostos Aromáticos. A partir dessa descoberta até então não apresentada em literatura, essa associação de Planctomycetes com a degradação de compostos de hidrocarbonetos foi avaliada por meio de testes de degradação de hidrocarbonetos utilizados como fonte de energia. Com o sucesso na degradação de Fenol, Hexadecano e Naftaleno, outros genomas foram sequenciados, buscando um melhor entendimento sobre o papel do grupo microbiano alvo de estudo no ecossistema de manguezal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Manguezais – características e microbiota

Os ecossistemas de manguezais ocupam uma grande proporção da linha litorânea nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (60-70%) (HOLGUIN et al., 2001; THATOI et al., 2013). É um ecossistema costeiro localizado em regiões de interface entre os ambientes terrestres e marinhos; uma área úmida característica de zonas tropicais e subtropicais. Os solos dos manguezais são lodosos, apresentam alta salinidade, predominância de anaerobiose e são ricos em matéria orgânica (FELLER; SITNIK, 1996; KATHIRESAN; BINGHAM, 2001; ANDREOTE et al., 2012), com potencial redox que varia de -200 a + 150 mV. Estas condições únicas tornam este ambiente um *hotspot* de diversidade microbiana (ANDREOTE et al., 2012).

A vegetação dos manguezais na costa brasileira é predominantemente composta pelas espécies *Laguncularia racemosa* (mangue branco), *Avicennia schaueriana* (mangue preto) e *Rhizophora mangle* (mangue vermelho). Devido às características ambientais inerentes a este ecossistema, esta vegetação possui adaptações morfológicas e fisiológicas bem desenvolvidas, tais como resistência às alterações de salinidade, variações de maré, ventos fortes e sedimentos com diferentes concentrações de oxigênio (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 1990).

Apesar de visualmente, a parte biológica dos solos de manguezais ser caracterizada pela presença de caranguejos, a biodiversidade dos solos de manguezais se apresenta principalmente na forma de comunidades microbianas associadas as plantas e aos solos de manguezais, onde desempenham importantes processos neste ambiente, como por exemplo, toda a ciclagem de nutrientes, formando a base da cadeia alimentar da flora e da fauna dos manguezais. Devido ao cenário de contaminação ambiental que afeta as áreas de manguezais (ZHOU et al., 2008; BRITO et al., 2006), pode-se ainda prever que estes organismos tenham papel fundamental da degradação destes contaminantes, e no potencial de resistência e resiliência do ambiente manguezal. É possível formular a hipótese de que na ausência ou redução da microbiota, haverá prejuízo nas atividades comerciais e ecológicas, possivelmente, resultando na destruição de ecossistemas de manguezais (HOLGUIN et al., 2001; PARALES; HADDOCK, 2004; VARON-LOPEZ et al., 2014).

Dias et al. (2010; 2011) mostraram que organismos pertencentes aos domínios Bacteria e Archaea estão presentes em abundância em solos do manguezal, onde parecem ter importante função na ciclagem de nutrientes e outros processos relacionados à manutenção da

capacidade produtiva desse ecossistema. Os primeiros trabalhos a descreverem a microbiota de manguezais utilizaram a estratégia de clonagem de genes ribossomais, nomeando como bactérias abundantes neste ambiente aquelas pertencentes aos filos Proteobacteria, Chloroflexi, Fusobacteria, Chlamydiae/Verrucomicrobia e Planctomycetes (LIANG et al., 2007). Utilizando técnicas dependentes de cultivo e na busca de microrganismos com potencial biotecnológico, bactérias afiliadas as ordens *Vibrionales*, *Actinomycetales* e *Bacillales* provenientes dos solos de manguezais foram caracterizados quanto a sua capacidade de produzir diversas enzimas como amilases, esterases, proteases e lipases (DIAS et al., 2009). Também é conhecida neste ambiente a produção de enzimas relacionadas a degradação da celulose, como as endoglucanases e exoglucanases, produzidas principalmente por isolados bacterianos, representados pelos gêneros *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas* e *Bacillus* (SOARES et al., 2013). Além disso, microrganismos encontrados em ecossistemas de manguezais são conhecidos por produzirem antibióticos e por possuírem genes que conferem tolerância a salinidade, o que confere a estes organismos uma grande potencialidade de utilização biotecnológica (CASTRO et al., 2014).

Os estudos da microbiota de maneira independente de cultivo permitem comparar a estrutura e a dinâmica das comunidades microbianas, seja esta taxonômica, ou funcional, onde são estudados genes relacionados a funções específicas ou participantes das etapas dos ciclos biogeoquímicos. Alguns trabalhos têm descrito a composição de comunidades microbianas na rizosfera de plantas tipicamente encontradas nos manguezais (CLEARY et al., 2012; SÁ et al., 2014), identificando alterações nestas comunidades devido a contaminação dos manguezais, sejam estas promovidas pela proximidade com centros urbanos (GOMES et al., 2008), ou pela contaminação deste ambiente com petróleo (SANTOS et al., 2011). Andreote et al. (2012) fez uma descrição geral, baseada em metagenômica, dos grupos microbianos e suas funções em quatro áreas de manguezais, caracterizadas por um gradiente de contaminação ambiental.

No entanto, estes dados precisam ainda ser combinados com estudos que utilizem bactérias cultivadas, permitindo uma melhor compreensão funcional e metabólica da microbiota dos manguezais, bem como fornecendo suporte a inferências sobre as alterações que estes microrganismos apresentam devido a fatores oriundos do histórico do ambiente estudado, como a diferencial contaminação de diferentes áreas de manguezais.

2.2 Características dos manguezais avaliados neste estudo

O litoral do Estado de São Paulo possui 622 quilômetros de extensão e apresenta quatro subunidades geográficas bem individualizadas: Litoral Norte, Baixada Santista, Complexo Estuarino-Lagunar Iguape-Cananéia e Vale de Ribeira (CUNHA-LIGNON et al, 2009b). O presente trabalho foi conduzido em quatro áreas de manguezais, sendo 3 localizadas na Baixada Santista (Bertioga) - consideradas áreas contaminadas (2 por petróleo e uma pela proximidade com a cidade) - e uma área em Cananéia, considerada pristina.

A região da Baixada Santista (Bertioga) é reconhecida pela contaminação por organoclorados e hidrocarbonetos, além de outros poluentes. De maneira geral, a baixada santista é uma região de grande interesse econômico, onde se encontra o maior polo petroquímico e de fertilizantes do país, um importante centro mineral-metalúrgico e um dos maiores centros portuários do mundo (LIMA, 2012).

Um evento de contaminação de grandes proporções ocorreu em 14 de outubro de 1983, quando o rompimento de um trecho do tronco do oleoduto da PETROBRÁS (Petróleo Brasileiro S.A.), que liga o Terminal Marítimo Almirante Barroso (TEBAR) à Refinaria Presidente Bernardes de Cubatão, provocou a liberação de 3.000.000 de litros de petróleo que desceram pelo Rio Iiri até atingir o Canal de Bertioga, espalhando-se por cerca de 60 quilômetros e causando um desastre ambiental na área de manguezal ali presente (LIMA, 2012; COIMBRA, 2006).

O manguezal contaminado por derramamento de petróleo apresenta-se subdividido em duas áreas: a área próxima ao mar, que sofreu um baixo impacto causado por derramamento de petróleo devido a um córrego que corta o manguezal (BrMgv01) (atuando como dreno da contaminação); e as áreas de centro de manguezal e próxima ao continente (BrMgv02), que concentraram o contaminante, sendo estas as mais afetadas, tanto na sua composição da fauna (caranguejos) como da flora (ausência de plantas de *R. mangle*).

A terceira área estudada em Bertioga é composta por todo o manguezal que se situa aproximadamente 5 km do manguezal contaminado, mas não apresenta tal contaminação (BrMgv03), sendo observado neste manguezal apenas um efeito da contaminação antropogênica (Figura 2.1). Estes manguezais apresentam água de inundação composta por uma mistura entre água do mar e do Rio Iiri (ANDREOTE et al., 2012).

Figura 2.1: Localização geográfica dos manguezais avaliados, situados em Bertiooga e Cananéia (Adaptado Andreote et al., 2012).

O manguezal de Cananéia localiza-se no Sul do Estado de São Paulo, entre as latitudes 24°40'S e 25°20'S (BrMgv04). Devido à riqueza de seu ecossistema, esta região é protegida pelo Governo do Estado, que criou o Parque Estadual da Ilha do Cardoso em 1962, considerado Patrimônio Mundial pela UNESCO desde 1999. Sua população é formada por caiçaras que vivem da pesca e da cultura de subsistência (LIMA, 2012).

A comparação destes diferentes manguezais dá origem a um gradiente de contaminação de grande interesse para a avaliação da resposta das comunidades bacterianas aos eventos de contaminação. Surge ainda, a possibilidade de nomear organismos capazes de sobreviver em áreas contaminadas, possivelmente atuando como atenuadores da contaminação, o que os elegeria como candidatos a biorremediadores.

2.3 Características do filo Planctomycetes

Os Planctomycetes são alocados taxonomicamente num superfilo chamado PCV (Planctomycetes, Chlamydiae, Verrucomicrobia), que engloba também um candidato de difícil isolamento (*Candidatus* Poribacteria) e o filo candidato OP3 (IZUMI et al., 2013). Este superfilo tem sido frequentemente sugerido como originado ao longo da separação evolutiva

entre os domínios Eukarya e Bacteria (FUERST; SAGULENKO, 2011; FORTERRE, 2011; IZUMI et al., 2013). Essas bactérias possuem características fenotípicas distintas das demais, apresentam proteínas em suas paredes celulares, compartimentalização das células por meio de membranas internas e perfil lipídico semelhante ao de eucariotos. Podem ainda sintetizar esteróis e realizar endocitose, com a capacidade de absorção de genes e proteínas homólogas de membranas protéicas de eucariotos, que são essenciais para o transporte na membrana (LONHIENNE et al., 2010).

Há décadas pensava-se que os Planctomycetes eram desprovidos de peptideoglicano em suas paredes, devido à enorme resistência a antibióticos. Porém diversas análises de bioinformática, bioquímica e microscopia mostraram recentemente a existência de peptideoglicano em suas paredes (JESKE, et al., 2015). A comparação de genomas mostrou a ocorrência de genes essenciais para a síntese de peptideoglicano, e proteínas beta-lactamases, pertencentes a classes moleculares de A-D. Estas observações levaram a conclusão que não seria a falta de peptideoglicano a responsável pela resistência aos antibióticos, mas sim a presença destas enzimas que degradam os antibióticos. Na análise bioquímica foram encontrados açúcares e componentes peptídicos de peptideoglicano (JESKE, et al., 2015).

A maioria dos Planctomycetes se reproduz por brotamento, com exceção do gênero marinho *Phycisphaera*, que se reproduz por fissão binária (FUERST; SAGULENKO, 2011). Além disso, organismos do gênero *Bythopirellula*, que tem como representante a espécie *Bythopirellula goksoyri*, encontrada no oceano Ártico, possui reprodução por gemulação (STORESUND E OVREAS, 2013). Alguns representantes desse grupo como *Bythopirellula goksoyri* (STORESUND E OVREAS, 2013) e *Planctomicrobium piriforme* (KULICHEVSKAYA et al., 2015) apresentam diferentes motilidade conforme as fases da vida, os quais na fase adulta como células-mãe são imóveis e fixas, enquanto que na fase de células-filha são móveis devido a presença de flagelos, estas bactérias não empregam a proteína de divisão bacteriana universal FtsZ (TEKNIEPE et al., 1981, PILHOFER et al., 2008).

Taxonomicamente, o filo Planctomycetes se divide em duas classes, Planctomycetacia e Phycisphaerae, que hospedam uma ordem cada, Planctomycetales e Phycisphaerales, respectivamente. Ao todo, cerca de uma centena de genomas de Planctomycetes sequenciados estão disponíveis hoje, incluindo 38 sequências de representantes cultiváveis e duas vezes a quantidade de não cultivados. Os Planctomycetes cultivados com nomes validamente publicados compreendem 2 classes, 3 ordens, 5 famílias, 25 gêneros e 29 espécies (ELCHENINOV et al., 2017). Entre os principais gêneros: *Pirellula*,

Gemmata, *Planctomyces*, *Isosphaera*, *Blastopirellula*, *Rhodopirellula*, *Schlesneria*, *Singulisphaera*, *Aquisphaera*, *Zavarzinella*, *Telmatocola*, *Thermogutta*, *Bythopirellula*, *Rubripirellula*, *Roseimaritima* *Planctomicrobium*, e cinco gêneros não cultivados. Todos estes gêneros não cultivados englobam um grupo de bactérias com capacidade de realizar a oxidação anaeróbica do amônio (*anammox*): *Brocadia*, *Kuenenia*, *Scalindua*, *Anammoxoglobus* e *Jettenia*. Já a ordem *Phycisphaerales* possui apenas três gêneros descritos: *Phycisphaera* e *Algispheera* (SCHLESNER et al., 2004; WARD et al., 2006; KULICHEVSKAYA et al., 2007, 2008, 2009, 2012a, 2012b; KRIEG et al., 2008; FUKUNAGA et al., 2009; BONDOSO et al., 2011, 2014; ROH et al., 2013; LEE et al., 2013, STORESUND; OVREAS, 2013; YOON et al., 2015; SLOBODKINA et al., 2015), e a espécie recentemente descrita *Tepidisphaera mucosa*, representante de uma nova família, *Tepidisphaeraceae* fam. nov., e uma nova ordem, *Tepidisphaerales* ord. nov (KOVALEVA et al., 2015).

Em 2004 o gênero *Pirellula* foi dividido em 3 distintos gêneros: *Pirellula*, *Blastopirellula* e *Rhodopirellula* (WINKELMANN; HARDER, 2009). O gênero *Rhodopirellula* é composto por apenas uma espécie, *Rhodopirellula baltica*. Apesar do recente isolamento e cultivo do membro deste grupo, esses microrganismos são considerados os menos representados em coleções de culturas microbianas (WINKELMANN; HARDER, 2009).

Um novo gênero pertencente à família *Phycisphaerae* foi isolado de uma alga marinha (*Cladophora* sp.), sendo que essa nova linhagem compartilha 89,2% de similaridade genética com *Phycisphaera mikurensis*, único grupo membro da família *Phycisphaerae* anteriormente descrito. Esta nova linhagem recebeu o nome de *Algispheera agarilytica* e suas células apresentam como principais características: coloração gram-negativa, mobilidade, morfologia esférica, com colônias rosa-avermelhada e metabolismo estritamente aeróbico (YOON; JANG e KASSAI, 2014).

A maioria dos gêneros pertencentes a Planctomycetes foi isolada de ambientes marinhos e aquáticos. No entanto, a detecção destes organismos por metodologias independentes de cultivo mostra sua ampla disseminação nos mais diferentes ambientes. Por exemplo, estudos baseados na amplificação de fragmentos específicos do genoma por PCR (reação em cadeia da polimerase) mostraram a presença de organismos deste filo associados ao sangue de dois pacientes imunodeprimidos, em tratamento para leucemia mieloblástica aguda por quimioterapia (DRANCOURT, et al., 2014). Este estudo liga Planctomycetes a quadros clínicos, sendo direta a relação entre a quantidade de DNA destes organismos com a

severidade dos sintomas como febre, neutropenia, pneumonia e diarreia. Seu tropismo com os pulmões seria congruente devido à proximidade filogenética de Planctomycetes com Chlamydia, que é conhecidamente capaz de causar pneumonia (DRANCOURT, et al., 2014).

Segundo BOEDEKER et al. (2017), Planctomycetes possuem uma arquitetura celular gram-negativa. As células mostram uma notável tendência para invaginações maciças da membrana citoplasmática. Estruturas crateriformes são encontradas em locais de contato entre o interior e o exterior da membrana, as quais não estão envolvidas com a absorção de grandes moléculas (BOEDEKER et al., 2017). Esses estudos mostraram que a membrana mais interna (citoplasmática) dos Planctomycetes é a membrana mais energizada com maior presença de ATPase. Assim, a membrana externa seria uma membrana típica de Gram-negativos, identificadas através de proteínas típicas de envelope de Gram-negativos.

O gênero *Gemmata* exibe uma das estruturas internas mais incomuns entre as bactérias: seu DNA de nucleóide é cercado por um envelope consistindo de duas membranas fechadas, formando uma organela de corpo nuclear que, por sua vez, encontra-se dentro do pirelulosoma cheio de ribossomos delimitado por única membrana intracitoplasmática (MIC) (FUERST & SAGULENKO, 2010), ou seja, essas bactérias são compartimentadas em um nucleóide contendo DNA, um citoplasma contendo ribossomos (riboplasma) e um citoplasma livre de ribossomos (parifoplasma). *Gemmata* spp. são encontrados principalmente em ambientes aquáticos e de solo, mas também foram encontrados nas redes de água hospitalar nas proximidades dos pacientes, nos animais, na pele humana, na microbiota intestinal e no sangue de pacientes com leucemia aplástica (AGHNATIOS & DRANCOURT, 2016).

Em conjunto, as características incomuns de Planctomycetes sugerem que essas bactérias podem possuir uma forma de endocitose (LONHIENNE et al., 2010). Fuerst & Sagulenko (2011) chamaram de pirelulosoma (por ter sido descrito no gênero *Pirellula*) a região interna que contém ribossomos e nucleóides, que são envolvidos pela membrana intracitoplasmática (MIC). As células desses organismos contêm lipídeos específicos em suas membranas, como lipídeos palmítico, oleico e palmitoléico, que são típicos de eucariotos (FLORES, CATITA E LAGE, 2014).

A fixação do nitrogênio na superfície do oceano impacta o clima global ao regular a produtividade microbiana primária e o sequestro de carbono através de bombas biológicas. Cianobactérias por muito tempo representavam os principais fornecedores de nitrogênio biodisponível neste habitat. No entanto, levantamentos moleculares recentes do gene da *nitrogenase reductase* revelaram a existência de raras populações de microrganismos associados à cianobactérias. Desses, descreveram-se bactérias diazotróficas heterotróficas que

fornece informações preliminares genômicas em oceanos de superfícies nitrogenadas. Desses representantes de bactérias diazotróficas heterotróficas está o primeiro relato de populações de Planctomycetes. Com dois representantes de seu grupo em seu estudo, formando uma nova espécie comparada a *Algisphaera agarilytica* com 88% de identidade, sendo identificada como *Candidatus Azoplanctomyces absconditus* (DELMONT et al., 2017).

2.4 Isolamento e cultivo de *Planctomycetes*

Os grupos taxonômicos pertencentes ao filo Planctomycetes foram considerados como bactérias não cultivadas por décadas (FUERST, 1995). No entanto, após a descrição inicial de um isolado pertencente a este filo, abriu-se caminho para o cultivo de um grande número de bactérias desse grupo, obtidas a partir de uma variedade de habitats aquáticos (LAGE; BONDOSO, 2011; FUERST, 1995; BENGTSSON; OVREAS, 2010; IZUMI et al., 2013; STORESUND; OVREAS, 2013).

Nos últimos 10 anos, o número de espécies novas de Planctomycetes praticamente triplicou. Assim com estudos mais aprofundados nesse filo, novas classes, ordens e gêneros foram descritos. Isso se deve aos estudos também relacionados ao cultivo dessas bactérias, como aumento de nutrientes, suplementos e antibióticos (WINKELMANN; HARDER, 2009; BONDOSO et al., 2011; LAGE, BONDOSO; 2011; LAGE, BONDOSO & VIANA, 2012). Embora os Planctomycetes normalmente se apresentem em baixa abundância no ambiente, eles foram observados em uma ampla variedade de habitats terrestres e aquáticos, o que reflete sua adaptação a diferentes estilos de vida em diversos ambientes (LAGE, 2013; BONDOSO et al., 2014). Os membros desse grupo podem ser encontrados na água do mar, em água hipersalina, salobra, água fresca e doce, e em muitos ambientes terrestres, incluindo solos e ambientes ácidos (LAGE, 2013). Também podem ser encontrados em associações com vários organismos eucarióticos como camarões, esponjas e corais, florações de microalga, macroalgas, invertebrados, líquens, e também em rizosfera de várias plantas (LAGE, 2013; BONDOSO et al., 2014). Foi relatada também a presença de Planctomycetes em ambientes extremos, tais como áreas hipersalinas, acidófilas, habitats e águas glaciais (BONDOSO et al., 2014).

Novos gêneros de Planctomycetes foram isolados de biofilmes das macroalgas *Laminaria* sp., *Ulva* sp., e *Fucus spitalis*, representados por *Rubripirellula obstinata*, *Roseimaritima ulvae*, *Mariniblastus fucicola*, respectivamente, indicando adaptação destes organismos a vida complexa em biofilmes, ou expostas a condições de estresse, o que inclui

flutuação de salinidade, exposição a radiação UV, variação de temperatura e poluição antropogênica (FARIA et al., 2017).

Os meios de cultivo usados para o isolamento e a multiplicação destas bactérias são os meios de cultura M13 e M14 (LAGE; BONDOSO E VIANA, 2012) (ANEXO A). Estes meios de cultivo são sempre acrescentados de uma solução de vitaminas (ANEXO A), solução de metais 44 (ANEXO A) e solução de sais – *Hunter's basal salts* (ANEXO A) (LAGE, BONDOSO E VIANA, 2012). De forma complementar, a utilização de diversos antibióticos (como Estreptomicina e Ampicilina) e fungicida Benomyl (Benlate) dá aos meios de cultivo a seletividade necessária para os longos períodos de incubação até o surgimento das colônias de Planctomycetes (aproximadamente 50 dias).

2.5 Perfil metabólico de bactérias pertencentes ao filo Planctomycetes

A maioria das bactérias desse filo apresenta grande versatilidade metabólica podendo utilizar diversas fontes de carbono. A maior parte dos Planctomycetes são considerados mesófilos, quimioheterotróficos e possuem parede celular gram-negativa, com característica halotolerante (BUCKLEY et al., 2006; LAGE; BONDOSO; LOBO-DA-CUNHA, 2013).

A partir do sequenciamento completo do genoma de um isolado identificado como *Rhodopirellula baltica*, foram obtidas informações sobre o metabolismo dos Planctomycetes, como a alta resistência a antibióticos e metais pesados, a capacidade de metabolizar diversos materiais orgânicos presentes no ambiente e a produção de diversos metabólitos secundários, como pigmentos e carotenóides (PAPARODITIS et al., 2014). Segundo GUO et al., (2014) e GADE et al., (2005), as células de *Rhodopirellula baltica* são capazes de se multiplicar utilizando diferentes fontes de C, como glicose, ribose, N-acetilglucosamina, xilose, maltose, lactose, melibiose, rafinose, frutose, galactose, amido, sacarose e manose. Algumas espécies afiliadas a Planctomycetes apresentam ainda genes fotossintetizantes, relacionados a fixação do carbono. Aplicando a técnica de proteômica em *Rhodopirellula baltica*, quase todas as vias metabólicas de 20 aminoácidos foram detectadas. Notavelmente, quase todos os genes para a síntese dos sete aminoácidos essenciais para humanos foram encontrados. Foi inferido que essas espécies provavelmente são capazes de sintetizar esses aminoácidos, nomeadamente, valina, leucina, fenilalanina, tirosina, lisina, triptofano e isoleucina (GUO et al., 2014). Essas bactérias também possuem um grupo completo de enzimas catabólicas, o que pode explicar sua grande diversidade na utilização de diversos carboidratos como fonte de energia e ATP (PAPARODITIS et al., 2014).

A espécie *Rhodopirellula baltica* apresenta as vias normais de metabolismo descrita para bactérias heterotróficas como glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa, porém não possuem o desvio glioxilato e a via Entner-Doudoroff, mas apresenta o ciclo pentose-fosfato (GLÖCKNER et al., 2013). Além disso, *Rhodopirellula baltica* e *Planctomycetes limnophilus* têm sido descritos como sendo capazes de realizar a fermentação de carboidratos. Esta capacidade pode explicar a razão de se encontrar Planctomycetes em ambientes marinhos e de água doce e habitats terrestres com baixa disponibilidade de oxigênio (GLÖCKNER et al., 2013).

Recentemente foi descoberta a capacidade das espécies *G. obscuriglobus* e de *G. massiliana* como oportunistas hospedeiros bem equipados para sobreviver em ambientes ricos em metais, traços de zinco, cobre, cobalto, cádmio, mercúrio e arsênico, como os que estão no trato digestivo de vários hospedeiros, inclusive o humano. Foi também descrito que espécies *Gemmata* não possuem uma via de metabolismo de ferro clássica (AGHNATIOS & DRANCOURT, 2016).

Segundo Aghnatos & Drancourt (2016), um estudo realizado por GAO et al., (2014) realizado em esponjas marinhas revelou que o tecido esponjoso doente continha até 18,7% das sequências de Planctomycetes, representando um dos filos predominantes, enquanto que sua presença raramente foi detectada em uma esponja saudável. Esta observação sugeriu que Planctomycetes pode desempenhar um papel na digestão induzida da matriz extracelular da esponja, por atividade de sulfatases, uma vez que esta matriz que é composta por polissacarídeos sulfatados.

2.6 Caracterização genética e sequenciamento de genomas de Planctomycetes

Apesar do recente sucesso no isolamento de novos membros de Planctomycetes, este grupo ainda continua a ser um dos menos representados em coleções de culturas microbianas, sendo ainda muito utilizados em seu estudo métodos independentes de cultivo, como a análise do gene 16S rRNA, sequenciamento de genes específicos e FISH (Hibridização fluorescente in situ) (PIZZETTI et al., 2011).

O primeiro representante deste grupo a ter seu genoma sequenciado foi o organismo marinho *Rhodopirellula baltica* (7.15Mb) (GLÖCKNER et al., 2003; LOMBARDOT et al., 2005; TEELING et al., 2004; JENKINS; KEDAR; FUERST, 2002). Também dentro deste filo, foi descrito um dos maiores genomas encontrados em bactérias, na espécie *Gemmata obscuriglobus*, com 9.0Mb (BUTLER; FUERST, 2004).

Os projetos de sequenciamento de genoma relacionados à bactérias do filo Planctomycetes atualmente estão listados no site Genomes Online Database (*Genome Gold*) (<http://www.genomesonline.org>), com 226 genomas em curso servindo assim como base de estudos que ampliarão consideravelmente nosso conhecimento sobre a organização genômica de Planctomycetes (WAGNER; HORN, 2006).

Numa análise comparativa de 11 genomas de Planctomycetes, GUO et al., (2014) mostraram que espécies de Planctomycetes apresentam diversas variações genômicas, além de compartilharem um grupo de genes em comum. Os autores descrevem que ocorre uma diminuição no número de genes organizados em *operons* com o aumento do tamanho do genoma, ligando este aumento no tamanho do genoma a adaptabilidade ambiental dos isolados analisados. No trabalho de GUO et al., (2014) é também demonstrada a ocorrência de indícios de que recombinação homóloga e a transferência horizontal de genes tenham um importante papel na evolução desses genomas, com a possível presença de ilhas genômicas em 5 dos 11 genomas de Planctomycetes avaliados. Estas ilhas são descritas como originadas de *Actinobacteria*, *Bacillus*, *Nitrospira*, *Bacteroides*, *Chloroflexi* e *Gammaproteobacteria*.

Segundo Glöckner et al. (2003), por meio do sequenciamento completo de *Pirellula* sp. estirpe 1 (agora conhecida como *Rhodopirellula* sp.), foi descrita a ocorrência de 110 genes que codificam proteínas sulfatases, de semelhança significativa com as encontradas em procariotos e eucariotos. O fato dos genes de sulfatase de *Rhodopirellula* sp. ultrapassarem em número todos os outros genomas de procariotos, nos levam a perceber mais uma característica desses organismos que mostra sua aproximação dos organismos eucariotos. Como ambientes marinhos são caracterizados por níveis elevados de sulfato inorgânico, como no caso os manguezais, essas bactérias podem usar suas sulfatases para acessar de forma mais eficaz energia de compostos ligadas a enxofre orgânico. Estes dados sugerem que sulfatase são metabolicamente importantes para *Rhodopirellula* e podem desempenhar um importante papel na degradação de glicopolímeros sulfatados. Um estudo de genomas de Planctomycetes encontrados em algas vermelhas *Porphyra umbilicalis* permitiu identificar diversas famílias de genes que codificam sulfatases, transportadores de drogas e hidrolases. Ficou também demonstrada a existência de transferência horizontal de genes (THG) entre espécies de Planctomycetes e destes com outros filos bacterianos. Assim a transferência horizontal de genes que codificam a degradação de polissacarídeos pode refletir na adaptação de macroalgas, além de genes nos genomas de Planctomycetes potencialmente envolvidos na adaptação ao estresse ambiental. As evidências de THG entre Planctomycetes, Bacterioidetes e Proteobacteria enfatizam as associações íntimas entre esses grupos de bactérias quando

associadas a macroalgas (KIM et al., 2016), abrindo questionamentos sobre a ocorrência de processos similares em outros ambientes.

Estudos genômicos de novos isolados *Rubripirellula obstinata*, *Roseimaritima ulvae* e *Mariniblastus fucicola* mostraram a presença de grandes proteínas >6000 aminoácidos, associadas a respostas de condições de estresse ou relacionadas ao citocromo. A análise destas proteínas enormes nos genomas dos três Planctomycetes sugere sua localização na parede celular ou ação extracelular, seus papéis potenciais na adesão e formação de biofilmes e sua ação contra agentes de estresse no biofilme (FARIA et al., 2017).

2.7 O papel dos Planctomycetes nas vias de degradação de poluentes e na produção de compostos bioativos

Planctomycetes são bactérias promissoras em produzir compostos bioativos devido às suas particularidades. Em primeiro lugar, essas bactérias possuem grandes genomas (GLÖCKNER et al., 2003; JESKE et al., 2013; JESKE et al., 2017). Aspectos filogenéticos mostram que bactérias com tamanhos de genomas grandes, tem potencial de produção de metabólitos secundários como antibióticos, por exemplo. Em segundo lugar, a biologia celular dos Planctomycetes é particular, sendo similar a células eucarióticas em alguns aspectos (FUERST e SAGULENKO, 2011; JESKE et al., 2017). Outros traços como o seu ciclo de vida após a divisão celular, os torna únicos entre as bactérias. As análises de genomas de Planctomycetes isolados de biofilmes associados a macroalgas revelaram-se a presença de genes de vias de metabólitos secundários. O *screening* de 13 genomas mostrou um alto número de agrupamentos gênicos para síntese de bioativos como antifúngicos (43%) e antibacterianos (54%) com atividade contra *C. albicans* e *B. subtilis*, respectivamente. A bioatividade foi observada em estirpes de *Rhodopirellula lusitana*, *R. rubra*, *R. baltica*, *Roseimaritima ulvae* e *Planctomycetes brasiliensis*. O estudo mostrou a presença dos genes PKS-I (*polyketide synthase*) e NRPS (*nonribosomal peptide synthetase*), dois agrupamentos de genes comumente associados com a produção de compostos bioativos (GRAÇA, CALISTO & LAGE, 2016).

Estudos com as espécies de *Gemmata* mostraram, por meio da análise dos genomas de *G. obscuriglobus* e *G. massiliana*, a ocorrência de genes implicados na resistência ao cádmio, zinco, arsênio, cobre, mercúrio e cobalto codificam para fatores sigma da função extracitoplásmica (ECFs), incluindo um grande número de ECFs não classificados. ECFs desempenham um papel importante na adaptação bacteriana às condições ambientais

estressantes, e possivelmente podem atuar na produção de metabólitos secundários com ação antimicrobiana (AGHNATIOS & DRANCOURT, 2016).

Há uma descrição da resistência de Planctomycetes à contaminantes ambientais, no qual isolados afiliados ao filo Planctomycetes foram avaliados segundo a toxicidade de diferentes poluentes de águas como por exemplo fenol, metais pesados (arsênico, cádmio, cromo, níquel, zinco e cobre), compostos de nitrogênio inorgânico (nitrato, nitrito e amônio), fosfatos, detergentes, fenol, hidrazina, fungicidas (como Ridomil® e Previcur N®) e alguns fármacos (diclofenaco, cafeína, acetaminofeno). Com relação aos poluentes testados, observaram-se efeitos mais fortes na presença de Ridomil®, fenol, hidrazina e cobre. Como resultado, estes organismos mostraram-se altamente resistentes à altas doses de compostos de nitrogênio inorgânico (nitrato, nitrito e amônio). Os autores sugerem que esta resistência se deve a especificidades da membrana externa destes organismos. Sugerem ainda que devido a sua sensibilidade a maioria dos contaminantes avaliados, estes organismos podem ser ótimos candidatos a marcadores de qualidade ambiental (FLORES, CATITA E LAGE, 2014).

Segundo JESKE et al., (2017) os Planctomycetes foram suspeitos de produzir antibióticos para a proteção do habitat em resposta ao apego em organismos fototróficos. Recentemente, estes autores demonstramos seu potencial genômico para produzir peptídeos não ribossômicos, policetídeos, bacteriocinas e terpenoides que possam ter atividades antibióticas (JESKE et al., 2013). Neste estudo recente, Jeske et al., (2017) cultivaram Planctomycetes para a produção de compostos antimicrobianos em um meio quimicamente definido e um procedimento para imitar sua interação quimicamente com outros organismos, como, por exemplo, cianobactérias. Foram encontradas evidências de atividade antimicrobiana de Planctomycetes contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

2.8 Microbiologia molecular: acesso a biodiversidade microbiana não cultivada

Este método tem como base a identificação de genes 16S rDNA em DNA genômico, o que proporciona uma alta resolução no estudo da distribuição de novas sequências obtidas em bibliotecas construídas de amostras ambientais (CHOUARI et al., 2003). As metodologias moleculares desenvolvidas nas últimas décadas [extração de ácidos nucleicos, amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento de Ácido Desoxirribonucleico (DNA)] têm sido otimizadas e adaptadas para superar as limitações impostas pela abordagem clássica de estudos de comunidades microbianas, adicionando dados aos obtidos com base no isolamento e cultivo dos microrganismos. A utilização destas metodologias vem permitindo uma mudança drástica na perspectiva da diversidade microbiana no ambiente, auxiliando na

descrição de novos grupos de organismos nunca antes cultivados (HUGENHOLTZ; GOEBEL; PACE, 1998; RAPPÉ; GIOVANNONI, 2003).

A aplicação de técnicas baseadas na detecção e análise da diversidade de ácidos nucleicos [DNA ou RNA (Ácido ribonucleico)] presentes em amostras ambientais é fundamental nos estudos de diversidade microbiana, principalmente por permitir a análise de maneira independente do cultivo microbiano presentes nas amostras, o que exclui todos os problemas e limitações devido à baixa culturabilidade das comunidades bacterianas em meios seletivos. Em bactérias, o gene 16S ribossomal (16S DNAr) é amplamente utilizado, sendo considerado uma importante molécula para o estudo de filogenia e ecologia microbiana (LOUWS; RADEMAKER; BRUIJN, 1999; HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998; PROSSER et al., 2007). No entanto, o estudo focado em genes conservados como exemplo, o 16S DNAr, não fornece dados suficientes sobre a funcionalidade do grupo ou espécie microbiana no ambiente avaliado, mas apenas infere sobre características filogenéticas dos componentes das comunidades microbianas.

Em busca de informações mais relevantes e significativas, pesquisadores passaram a trabalhar com bibliotecas metagenômicas (clones, sequenciamento e inserção de genes em vetores partindo-se de uma amostra composta de um determinado ambiente), sendo esta uma ferramenta muito eficaz (BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000; HUGENHOLTZ; GOEBEL; PACE, 1998; KIM et al., 2006). O uso da estratégia metagenômica permite ainda combinar a busca de genes funcionais com a análise de sequências relacionadas à filogenia, o que pode representar um mecanismo para se estabelecer relações entre filogenia e função microbiana, auxiliando na elucidação do papel ecológico dos componentes da microbiota no ambiente.

A metagenômica revolucionou a microbiologia abrindo caminho para uma avaliação independente de cultivo e exploração de comunidades microbianas presentes em ecossistemas complexos. O uso do sequenciamento em larga escala para técnicas metagenômicas, resultaram na geração de grandes conjuntos de dados de sequências derivadas de vários ambientes, tais como o sedimento, ambiente marinho e corpo humano. As análises desses conjuntos de dados abriram uma janela para a enorme diversidade taxonômica e funcional das comunidades microbianas ambientais. A combinação de análises baseadas em DNA, RNA e proteína de comunidades microbianas presentes em diferentes ambientes é uma maneira de explicar, composições, funções e interações das comunidades e associá-las aos processos ambientais (SIMON; DANIEL, 2011). Vem também sendo mostrado nos manguezais

brasileiros um grande número de dados de sequências metagenômicas, que revelou os potenciais taxonômicos e aspectos das vias metabólicas por Andreote et al. (2012).

2.9 Degradação de hidrocarbonetos derivados do petróleo

Os manguezais, devido a sua posição ao longo da linha costeira, são constantemente expostos à contaminação por petróleo proveniente de derramamentos contínuos e/ou acidentais, sendo considerados os ecossistemas mais sensíveis e vulneráveis aos efeitos destes poluentes. Esses compostos podem causar desequilíbrio em processos essenciais para a manutenção dos manguezais, incluindo modificações nos ciclos biogeoquímicos (LIMA, 2012).

Os hidrocarbonetos classificam-se em cíclicos ou alifáticos/saturados/insaturados (alcanos, alcenos e alcinos), aromáticos (benzênicos e policíclicos) e compostos polares (resinas e asfaltenos) (YENDER et al., 2002). O petróleo é uma mistura complexa desses hidrocarbonetos (aromáticos e alifáticos) e os compostos contêm oxigênio (ácidos carboxílicos, fenóis, éteres, etc), nitrogênio (imidazoles, carbazoles, etc) e enxofre. Hidrocarbonetos são economicamente importantes e preferencialmente consumidos dando origem a ácidos carboxílicos e fenóis, um processo que adiciona novos constituintes ao petróleo (*síntese de novo*). A biodegradação destes compostos pode ocorrer tanto em condições aeróbias como anaeróbias (ANGOLINI et al., 2015).

Diversos compostos aromáticos coexistem como misturas complexas no petróleo. Dentre estas, existem três grupos principais de hidrocarbonetos: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), heterocíclicos e aromáticos simples. HPAs são um grupo de produtos químicos que contêm dois ou mais anéis aromáticos em conjuntos, ou em arranjos lineares angulares. Propriedades físicas e químicas dos HPAs variam com o número de anéis e, por conseguinte, com o seu peso molecular (GUTIERREZ et al., 2014). Segundo suas características moleculares e químicas, estes compostos podem ser classificados em duas classes: I) com baixo peso molecular, possuindo de 2 a 3 anéis benzênicos (naftaleno, bifenilo, acenafteno, fluoreno, dibenzotiofeno, fenantreno e antraceno) e II) os de alto peso molecular, com quatro a seis anéis aromáticos (fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(e)pireno, benzo(a)pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno, dibenzo(g,h,i)pirileno (LIMA, 2012; TAM et al., 2001).

Os hidrocarbonetos aromáticos simples são constituídos por um único anel benzênico e são representados por representantes da classe BTEX –Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno (ANDREONI, et al., 2007; HERMANN et al., 2010).

Uma grande diversidade microbiana está associada à degradação de hidrocarbonetos do petróleo, principalmente espécies bacterianas e fúngicas, sobre as quais existe uma extensa lista de trabalhos e revisões bibliográficas (PEREIRA JR, GOMES E SORIANO, 2009). A capacidade metabólica que certos organismos possuem de transformar ou mineralizar contaminantes orgânicos em formas menos tóxicas, as quais passam a ser integradas aos ciclos biogeoquímicos naturais, é chamada de biodegradação. A biodegradação é o mecanismo primário através do qual o petróleo e outros poluentes de natureza semelhante são eliminados do ambiente (LEAHY E COLWELL, 1990; MIRANDA, 2008).

Planctomycetes é um grupo distinto de bactérias com relevância ecológica e evolutiva. Um recente estudo do genoma de Planctomycetes indica que existe dentro de bactérias afiliadas a este filo uma fonte de moléculas bioativas inovadoras (FLORES, CATITA E LAGE, 2014; JESKE et al., 2015). Porém até o momento, não há relatos de Planctomycetes participando da degradação de hidrocarbonetos de petróleo, sendo o nosso trabalho o primeiro a levantar esta hipótese.

Estas informações mostram a grande versatilidade metabólica e conseguinte importância de organismos afiliados a este filo. No entanto, carece-se de mais estudos que busquem desvendar sua funcionalidade, e a resposta destes organismos aos diferentes contaminantes que chegam até os manguezais. Neste intuito, o presente estudo busca dar informações sobre estes processos, tanto do ponto de vista ecológico, como da aplicabilidade dos conhecimentos sobre os Planctomycetes presentes em solos de manguezais.

REFERÊNCIAS

- AGHNATIOS, R.; DRANCOURT, M. *Gemmata* species: Planctomycetes of medical interest. **Future Microbiology**, p.659-667, 2016.
- ANDREONI, V.; GIANFREDA, L. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.76, p.287-308, 2007.
- ANDREOTE, F.D.; JIMENEZ, D.J.; CHAVES, D.; DIAS, A.C.F.; LUVIZOTTO, D.M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELA, C.C.; LOPEZ, M.V.; BAENA, S.; TAKETANI, R.G.; SOARES, I.M. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **Plos One**, v.7, 2012.

- ANGOLINI, C.F.F.; PILAU, E.J.; LOPES-OLIVEIRA, P.F.; GARCIA, I.N.S.; GOZZO, F.C.; OLIVEIRA, V.M.; MARSAIOLI, A.J. Classification and identification of petroleum microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.26, 2015.
- BENGTSSON, M.M.; OVREAS, L. Planctomycetes dominate biofilms on surfaces of the kelp *Laminaria hiperborea*. **BMC Microbiology**, v.10, p.1-12, 2010.
- BOEDEKER, C.; SCHÜLER, M.; REINTJES, G.; JESKE, O.; VAN TEESELING, M.C.F.; JOGLER, M.; RAST, P.; BORCHERT, D.; DEVOS, D.P.; KUCKLICK, M.; SCHAFFER, M.; KOLTER, R.; VAN NIFTRIK, L.; ENGELMANN, S.; AMANN, R.; ROHDE, M.; ENGELHARDT, H.; JOGLER, C. Determining the bacterial cell biology of Planctomycetes. **Nature Communications**, 2017.
- BONDOSO, J.; ALBUQUERQUE, L.; NOBRE, M.F.; LOBO-DA-CUNHA, A.; COSTA, M.S.; LAGE, O.M. *Aquisphaera giovannonii* gen. nov., sp. nov., a *Planctomycete* isolated from a freshwater aquarium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.61, p.2844-2850, 2011.
- BONDOSO, J.; BALAGUÉ, V.; GASOL, J.M.; LAGE, O.M. Community composition of the *Planctomycetes* associated with different macroalgae. **FEMS Microbiology and Ecology**, v.88, p.445-456, 2014.
- BRITO, E.M.S.; GUYONEAUD, R.; GOÑI-URRIZA, M.; RANCHOU-PEYRUSE, A.; VERBAERE, A.; CRAPEZ, M.A.C.; WASSERMAN, J.C.A.; DURAN, R. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. **Elservier-Research in Microbiology**, v.157, p.752-762, 2006.
- BUCKLEY, D.H.; HUANGYUTITHAM, V.; NELSON, T.A.; RUMBERGER, A.; THIES, J.E. Diversity of *Planctomycetes* in soil in relation to soil history and environmental heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.4522-4531, 2006.
- BULL, A.T.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology**, New York, v.64, p.573-606, 2000.
- BUTLER, M.K.; FUERST, J.A. Comparative analysis of ribonuclease P RNA of the *planctomycetes*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.1333-1344, 2004.

- CASTRO, R.A.; QUECINE, M.C.; LACAVA, P.T.; BATISTA, B.D.; LUVIZOTTO, D.M.; MARCON, J.; FERREIRA, A.; MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. **SpringerPlus**, p.1-9, 2014.
- CHOUARI, R.; PASLIER, D.L.; DAEGELEN, P.; GINESTET, P.; WEISSENBAACH, J.; SGHIR, A. Molecular evidence for novel Planctomycete diversity in a municipal wastewater treatment plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.7354-7363, 2003.
- CLEARY, D.F.R.; SMALLA, K.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; GOMES, N.C.M. Assessment of Variation in Bacterial Composition among Microhabitats in a Mangrove Environment Using DGGE Fingerprints and Barcoded Pyrosequencing. **Plos One**, v.7, p.1-8, 2012.
- COIMBRA, M.A.C. Avaliação dos resultados analíticos de hidrocarbonetos como instrument jurídico em caso de derrames de petróleo. Estudo de caso. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Química e Geológica) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, SP, 108f., 2006.
- CUNHA-LIGNON, M.; MENGHINI, R.P.; SANTOS, L.C.M.; NIEMEYER-DINÓLA, C.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Case studies in the mangrove forests of the state os Sao Paulo (Brazil): application of tools using different spatial and temporal scales. **Journal of Integrated Costal Zone Management**, v.9, p.79-91, 2009b.
- DELMONT, T.O.; QUINCE, C.; SHAIKER, A.; ESEN, Ö.C.; LEE, S.T.M.; LÜCKER, S.; EREN, M. Nitrogen-fixing populations of Planctomycetes and Proteobacteria are abundant in the surface ocean. **bioRxiv The preprint Server for Biology**, 2017.
- 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 of Microbiology and Biotechnology**, v.25, p.1305–1311, 2009.
- DIAS, A.C.F.; ANDREOTE, F.D.; RIGONATO, J.; FIORE, F.M.; MELO, I.S.; ARAÚJO, W.L. The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.9, p.541-551, 2010.
- DIAS, A.C.F.; DINI-ANDREOTE, F.; TAKETANI, R.G.; TSAI, S.M.; AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S.; ANDREOTE, F.D. Archaeal communities in the sediments of three contrasting mangroves. **J. Soils Sediments**, p.1-11, 2011.

- DIAS, A.C.F.; TAKETANI, R.G.; ANDREOTE, F.D.; LUVIZOTTO, D.M.; SILVA, J.L.; NASCIMENTO, R.S.; SOARES, I.M. Interspecific variation of the bacterial community structure in the phyllosphere of the three major plant components of mangrove forests. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, p.653-660, 2012a.
- DIAS, A.C.F.; SILVA, M.C.P.; COTTA, S.R.; DINI-ANDREOTE, F.; SOARES JR, F.L.; SALLES, J.F.; AZEVEDO, J.L.; van ELSAS, J.D.; ANDREOTE, F.D. Abundance and genetic diversity of *nifH* gene sequences in anthropogenically affected Brazilian mangrove sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p.7960-7967, 2012b.
- DRANCOURT, M.; PREBET, T.; AGHNATIOS, R.; EDOUARD, S.; CAYROU, C.; HENRY, M.; BLAISE, D.; RAOULT, D. *Planctomycetes* DNA in febrile aplastic patients with leukemia, rash, diarrhea, and micronodular pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.52, p.3453-3455, 2014.
- ELCHENINOV, A.G.; MENZEL, P.; GUDBERGSDOTTIR, S.R.; SLESAREV, A.L.; KADNIKOV, V.V.; KROGH, A.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E.A.; PENG, X.; KUBLANOV, I.V. Sugar Metabolism of the first Thermophilic Planctomycete *Thermogutta terrifontis*: Comparative Genomic and Transcriptomic Approaches. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p.1-11, 2017.
- FARIA, M.; BORDIN, N.; KIZINA, J.; HARDER, J.; DEVOS, D.; LAGE, O.M. *Planctomycetes* attached to algal surfaces: Insight into their genomes. **Genomics**, 2017.
- FELLER, I.C.; SITNIK, M. **Mangrove ecology**. Washington: Smithsonian Institution, p.129, 1996.
- FLORES, C.; CATITA, J.A.M.; LAGE, O.M. Assessment of Planctomycetes cell viability after pollutants exposure. **Antonie van Leeuwenhoek**, p.399-411, 2014.
- FORTERRE, P. A new fusion hypothesis for the origin of Eukarya: better than previous ones, but probably also wrong. **Research in Microbiology**, v.162, p.77-91, 2011.
- FUERST, J.A. The *Planctomycetes*: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. **Microbiology**, v.141, p.1493-1506, 1995.
- FUERST, J.A.; SAGULENKO, E. Beyond the bacterium: *Planctomycetes* challenge our concepts of microbial structure and function. **Nature Reviews**, v.9, p.403-413, 2011.
- FUKUNAGA, Y.; KURAHASHI, M.; SAKIYAMA, Y.; OHUCHI, M.; YOKOTA, A.; HARAYAMA, S. *Phycisphaera mikurensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a marine alga, and proposal of *Phycisphaeraceae* fam. nov., *Phycisphaerales* ord. nov. and *Phycisphaerae* classis nov. in the phylum *Planctomycetes*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v.55, p.267-275, 2009.

- GADE, D.; STÜHRMANN, T.; REINHARDT, R.; RABUS, R. Growth phase dependent regulation of protein composition in *Rhodospirillum rubrum*. **Environmental Microbiology**, v.7, p.1074–1084, 2005.
- GLÖCKNER, F.O.; KUBE, M.; BAUER, M.; TEELING, H.; LOMBARDOT, T.; LUDWING, W.; GADE, D.; BECK, A.; BORZYM, K.; HEITMANN, K.; RABUS, R.; SCHLESNER, H.; AMANN, R.; REINHARDT, R. Complete genome sequence of the marine *Planctomycete* *Pirellula* sp. Strain 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.100, p. 8298-8303, 2003.
- GOMES, N.C.M.; BORGES, L.R.; PARANHOS, R.; PINTO, F.N.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.S.; SMALLA, K. Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forests. **FEMS Microbiology and Ecology**, v.66, p.96–109, 2008.
- GRAÇA, A.P.; CALISTO, R.; LAGE, O.M. Planctomycetes as novel source of bioactive molecules. **Frontiers of Microbiology**, 2016.
- GUO, M.; ZHOU, Q.; ZHOU, Y.; YANG, L.; LIU, T.; YANG, J.; CHEN, Y.; SU, L.; XU, J.; CHEN, J.; LIU, F.; CHEN, J.; DAI, W.; NI, P.; FANG, C.; YANG, R. Genomic evolution of 11 type strains within family Planctomycetaceae. **Plos one**, v.9, p.1-11, 2014.
- GUTIERREZ, T.; RHODES, G.; MISHAMANDANI, S.; BERRY, D.; WHITMAN, W.B.; NICHOLS, P.D.; SEMPLE, K.T.; AITKEN, D. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation of Phytoplankton-associated *Arenibacter* spp. and description of *Arenibacter algicola* sp. nov., an aromatic hydrocarbon – degrading bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, 2014.
- HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, R.W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, v.35, p.1-21, 1998.
- HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and Fertility of Soils**, v.33, p.265-278, 2001.
- HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.4765-4774, 1998.
- IZUMI, H.; SAGULENKO, E.; WEBB, R.I.; FUERST, J.A. Isolation and diversity of *Planctomycetes* from the sponges *Niphates* sp., seawater, and sediment of Moreton Bay, Australia. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.104, p.533-546, 2013.

- JENKINS, C.; KEDAR, V.; FUERST, J.A. Gene discovery within the *Planctomycete* division of the domain Bacteria using sequence tags from genomic DNA libraries. **Genome Biology**, v.3, p.1-46, 2002.
- JESKE, O.; JOGLER, M.; PETERSEN, J.; SIKORSKI, J.; JOGLER, C. From genome mining to phenotypic microarrays: *Planctomycetes* as source for novel bioactive molecules. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.104, p.551-567, 2013.
- JESKE, O.; SCHÜLER, M.; SCHUMANN, P.; SCHNEIDER, A.; BOEDEKER, C.; JOGLER, M.; BOLLSCHWEILER, D.; ROHDE, M.; MAYER, C.; ENGELHARDT, H.; SPRING, S.; JOGLER, C. Planctomycetes do possess a peptidoglycan cell wall. **Nature Reviews**, 2015.
- JESKE, O.; SCHÜLER, M.; SCHUMANN, P.; SCHNEIDER, A.; BOEDEKER, C.; JOGLER, M.; BOLLSCHWEILER, D.; ROHDE, M.; MAYER, C.; ENGELHARDT, H.; SPRING, S.; JOGLER, C. Planctomycetes do possess a peptidoglycan cell wall. **Nature Communications**, 2015.
- KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B.L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems advances. **Marine Biology**, v.40, p.81-251, 2001.
- KIM, Y.; CHOI, G.; KIM, S.; YOON, G.; KIM, Y.; RYU, Y. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. **Protein Expression Purification**, v.45, p. 315–323, 2006.
- KIM, W.J.; BRAWLEY, S.H.; PROCHNIK, S.; CHOVATIA, M.; GRIMWOOD, J.; JENKINS, J.; LABUTTI, K.; MAVROMATIS, K.; NOLAN, M.; ZANE, M.; SCHMUTZ, J.; STILLER, J.W.; GROSSMAN, A.R. Genome analysis of Planctomycetes inhabiting blades of the Red Alga *Porphyra umbilicalis*. **Plos One**, 2016.
- KOVALEVA, O.L.; MERKEL, A.Y.; NOVIKOV, A.A.; BASLEROV, R.V.; TOSHCHAKOV, S.V.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E.A. *Tepidisphaera mucosa* gen.nov., sp.nov., a moderately thermophilic member of the class *Phycisphaerae* in the phylum Planctomycetes, and proposal of a new family, *Tepidisphaeraceae* fam.nov., and a new order, *Tepidisphaerales* ord.nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.65, p.549-555, 2015.
- KRIEG, N.R.; GARRITY, G.M. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, v. 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes, 925 p.

- KULICHEVSKAYA, I.S.; IVANOVA, A.O.; BELOVA, S.E.; BAULINA, O.L.; BODELIER, P.L.E.; RIJSTRA, W.I.C.; SINNINGHE-DAMSTÈ, J.S.; ZAVARZIN, G.A.; DEDYSH, S.N. *Schlesneria paludicola* gen.nov., sp.nov., the first acidophilic member of the order *Planctomycetales*, from *Sphagnum*-dominated boreal wetlands. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.2680-2687, 2007.
- KULICHEVSKAYA, I.S.; IVANOVA, A.O.; BAULINA, O.L.; BODELIER, P.L.E.; SINNINGHE-DAMSTÈ, J.S.; DEDYSH, S.N. *Singulisphaera acidiphila* gen.nov., sp.nov., a non-filamentous, *Isosphaera*-like planctomycete from acidic northern wetlands. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.1186-1193, 2008.
- KULICHEVSKAYA, I.S.; BAULINA, O.I.; BODELIER, P.L.E.; RIJSTRA, W.I.C.; DAMSTE, J.S.S. DEDYSH, S.N. *Zavarzinella Formosa* gen. nov., sp. nov., a novel stalked, *Gemmata* like *Planctomycete* from a Siberian peat bog. **International Journal for Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, p.357-364, 2009.
- KULICHEVSKAYA, I.S.; SERKEBAEVA, Y.M.; KIM, Y.; RIJSTRA, W.I.C.; SINNINGHE-DAMSTÈ, J.S.; LIESACK, W.; DEDYSH, S.N. *Telmatocola sphagniphila* gen.nov., sp.nov., a novel dendriform planctomycete from northern wetlands. **Frontiers in Microbiology**, v.3, 2012a.
- KULICHEVSKAYA, I.S.; DETKOVA, E.N.; BODELIER, P.L.E.; RIJSTRA, W.I.C.; SINNINGHE-DAMSTÈ, J.S.; DEDYSH, S.N. *Singulisphaera rosea* sp.nov., a planctomycete from acidic *Sphagnum* peat, and emended description of the genus *Singulisphaera*. **International Journal for Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.62, p.118-123, 2012b.
- KULICHEVSKAYA, I.S., IVANOVA, A.O.; DETKOVA, E.N., RIJSTRA, W.I.C., SINNINGHE-DAMSTÈ, J.S., DEDYSH, S.N. *Planctomicrobium piriforme* gen.nov.,sp.nov., a stalked planctomycete from a littoral wetland of a boreal lake. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.65, p.1656-1665, 2015.
- LAGE, O.M.; BONDOSO, J. *Planctomycetes* diversity associated with macroalgae. **FEMS Microbiology and Ecology**, v.78, p.366-375, 2011.
- LAGE, O.M.; BONDOSO, J.; VIANA, F. Isolation and characterization of *Planctomycetes* from the sediments of a fish farm wastewater treatment tank. **Archives of Microbiology**, v.194, p.879-885, 2012.

- LAGE, O.M. Characterization of a *Planctomycete* associated with the marine dinoflagellate *Prorocentrum micans* Her. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.104, p.499-508, 2013.
- LAGE, O.M.; BONDOSO, J.; LOBO-DA-CUNHA, A. Insights into the ultrastructural morphology of novel *Planctomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.104, p.467-476, 2013.
- LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, v.54, p.305-315, 1990.
- LEE, H.W.; ROH, S.W.; SHIN, N.; LEE, J.; WHON, T.W.; JUNG, M.; YUN, J.; KIM, M.; HYUN, D.; KIM, D.; BAE, J. *Blastopirellula cremea* sp.nov, isolated from a dead ark clam. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.63, p.2314-2319, 2013.
- LIANG, J-B.; CHEN, Y-Q.; LAN, C-Y.; TAM, N.F.Y.; ZAN, Q.J.; HUANG, L-N. Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment. **Mar Biology**, v.150, p.739-747, 2007.
- LIMA, D.V.; Análise da diversidade, abundância e estrutura funcional da comunidade microbiana de três manguezais do Estado de São Paulo, Brasil. Tese (Doutorado em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas) - Universidade de São Paulo-SP. p.1-211, 2012.
- LOMBARDOT, T.; BAUER, M.; TEELING, H.; AMANN, R.; GLÖCKNER, F.O. The transcriptional regulator pool of the marine bacterium *Rhodopirellula baltica* SH1 as revealed by whole genome comparisons. **FEMS Microbiology Letters**, v.242, p.137-145, 2005.
- LONHIENNE, T.G.A.; SAGULENKO, E.; WEBB, R.I.; LEE, K-C.; FRANKE, J.; DEVOS, D.P.; NOUWENS, A.; CARROLL, B.J.; FUERST, J.A. Endocytosis-like protein uptake in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*. **Pnas**, v.107, p.12883-12888, 2010.
- LOUWS, F.J.; RADEMAKER, J.L.W.; De BRUIJN, F.J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, v.37, p.81-125, 1999.
- MIRANDA, V.J.M.; Degradação de naftaleno, fenantreno e benzo (a) pireno em solos e sedimentos de ambientes costeiros, oceânicos e antárticos. Dissertação (Mestrado), **Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa, Minas Gerais, 2008.

- PAPARODITIS, P.; VÄSTERMARK, A.; LE, A.J.; FUERST, J.A.; SAIER- JR, M.H. Bioinformatic analyses of integral membrane transport proteins encoded within the genome of the planctomycetes species, *Rhodopirellula baltica*. **Biochimica et Biophysica Acta**, p.193-215, 2014.
- PARALES, R.E.; HADDOCK, D. Biocatalytic degradation of pollutants. **Current Opinion Biotechnology**, v.15, p.374-379, 2004.
- PEREIRA-JR., N.; GOMES, E.B.; SORIANO, A.U. Biodegradação de hidrocarbonetos. **Séries em Biotecnologia**, v.3, Rio de Janeiro, 2009.
- PILHOFER, M.; RAPPL, K.; ECKL, C.; BAUER, A.P.; LUDWING, W.; SCHLEIFER, K-H.; PETRONI, G. Characterization and Evolution of Cell Division and Cell Wall Synthesis Genes in the Bcaterial Phyla *Verrucomicrobia*, *Lentisphaerae*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes* and Phylogenetic Comparison with rRNA Genes. **Journal of Bacteriology**, v.190, p.3192-3202, 2008.
- PIZZETTI, I.; GOBET, A.; FUCHS, B.M.; AMANN, R.; FAZI, S. Abundance and diversity of *Planctomycetes* in a Tyrrhenian coastal system of Central Italy. **Aquatic Microbial Ecology**, v.65, p.129-141, 2011.
- 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. Essay: the role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, p.384-392, 2007.
- RAPPÉ, M.S.; GIOVANNONI, S.J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, v.57, p.369-394, 2003.
- ROH, S.W.; LEE, H.W.; YIM, K.J.; SHIN, N.; LEE, J.; WHON, T.W.; LIM, N.; KIM, D.; BAE, J.W. *Rhodopirellula rosea* sp., nov. a novel bacterium isolated from an Ark Clam *Scarpharca broughtonii*. **Journal of Microbiology**, v.51, p.301-304, 2013.
- SÁ, A.L.B.; DIAS, A.C.F.; QUECINE, M.C.; COTTA, S.R.; FASANELLA, C.C.; ANDREOTE, F.D.; MELO, I.S. Screening of endoglucanase-producing bacteria in the saline rhizosphere of *Rhizophora mangle*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, p.193-197, 2014.
- SANTOS, H.F.; CURY J.C.; CARMOS, F.L.; SANTOS, A.L.; TIEDJE, J.; Van ELSAS, J.D.; ROSADO, A.S.; PEIXOTO, R.S. Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. **PLoS One**, 2011.

- SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; ADAIME, R.R.; CAMARGO, T.M. Variability of mangrove ecosystems along the Brazilian coast. **Springer**, 1990.
- SCHLESNER, H.; RENSMANN, C.; TINDALL, B.J.; GADE, D.; RABUS, R.; PFEIFFER, S.; HIRSCH, P. Taxonomic heterogeneity within the *Planctomycetales* as derived by DNA-DNA hybridization, description of *Rhodopirellula baltica* gen. nov., sp. nov., transfer of *Pirellula marina* to the genus *Blastopirellula* gen. nov. as *Blastopirellula marina* comb. nov. and emended description of the genus *Pirellula*. **International Journal for Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.1567-1580, 2004.
- SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic analyses: past and future trends. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 1153-1161, 2011.
- SLOBODKINA, G.B.; KOVALEVA, O.L.; MIROSHNICHENKO, M.L.; SLOBODKIN, A.I.; KOLGANOVA, T.V.; NOVIKOV, A.A.; VAN HEERDEN, E.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E.A. *Thermogutta terrifontis* gen.nov., sp.nov., and *Thermogutta hypogea* sp.nov., thermophilic anaerobic representatives of the phylum Planctomycetes. **International Journal for Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.65, p.760-765, 2015.
- SOARES, F.L.; DIAS, A.C.F.; FASANELLA, C.C.; TAKETANI, R.G.; LIMA, A.O.S.; MELO, I.S.; ANDREOTE, F.D. Endo- and exoglucanase activities in bacteria from mangrove sediment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, p. 969-976, 2013.
- STORESUND, J.E.; OVREAS, L. Diversity of *Planctomycetes* in iron-hydroxide deposits from the Arctic Mid Ocean Ridge (AMOR) and description of *Bythopirellula goksoyri* gen. nov., sp. nov., a novel *Planctomycete* from deep sea iron-hydroxide deposits. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.104, p.569-584, 2013.
- TAM, N.F.; KE, L.; WANG, X.H.; WONG, Y.S. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of mangroves swamps. **Environmental Pollution**, v.114, p.255-263, 2001.
- TEELING, H.; LOMBARDOT, T.; BAUER, M.; LUDWING, W.; GLÖCKNER, F.O., Evaluation of the phylogenetic position of the *Planctomycete* ‘*Rhodopirellula baltica*’ SH1 by means of concatenated ribosomal protein sequences, DNA-directed RNA polymerase subunit sequences and whole genome trees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.24, p.791-801, 2004.
- TEKNIEPE, B.L., SCHMIDT, J.M.; STARR, M.P. Life cycle of a budding and appendaged bacterium belonging to morphotype IV of the *Blastocaulis* – *Planctomyces* group. **Current Microbiology**, v.5, p.1-6, 1981.

- THATOI, H.; BEHERA, B.C.; MISHRA, R.R.; DUTTA, S.K. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. **Ann Microbiology**, v.63, p.1–19, 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**, 2013.
- WAGNER, M.; HORN, M. The *Planctomycetes*, Verrucomicrobia, Chlamydiae and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. **Current Opinion in Biotechnology**, v.17, p.241-249, 2006.
- WARD, N.; STALEY, J.T.; FUERST, J.A.; GIOVANNONI, S.; SCHLESNER, H.; STACKEBRANDT, E. The order Planctomycetales including the genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata* and *Isosphaera* and the Candidatus genera *Brocadia*, *Kuenenia* and *Scalindua*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The prokaryotes**. 3rd ed. New York: Springer, v. 7, Symbiotic proteobacteria: delta, epsilon subclass, p.757-793, 2006.
- WINKELMANN, N.; HARDER, J. An improved isolation method for attached-living *Planctomycetes* of the genus *Rhodopirellula*. **Journal of Microbiological Methods**, v.77, p.276-284, 2009.
- YENDER, R.; MICHAEL, J.; LORD, C. Managing seafood safety after an oil spill: Secondary Managing seafood safety after an oil spill. **Seattle: National Oceanic and Atmospheric Administration NOAA**, 72p., 2002.
- YOON, J.; JANG, J-H.; KASAI, H. *Algisphaera agarilytica* gen.nov., sp. nov., a novel representative of the class *Phycisphaerae* within the phylum *Planctomycetes* isolated from a marine alga. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.105, p.317-324, 2014.
- YOON, J.; MATSUO, Y.; KASAI, H.; LEE, M.K. Phylogenetic and taxonomic analyses of *Rhodopirellula caenicola* Sp. Nov., a new marine Planctomycetes species isolated from Iron Sand. **Phylogenetics and Evolutionary Biology**, v.3, p. 1-4, 2015.
- ZHOU, H.W.; LUAN, T.G.; ZOU, F.; TAM, N.F.Y. Different bacterial groups for biodegradation of three- and four-ring PAHs isolated from a Hong Kong mangrove sediment. **Journal of Hazardous Materials**, v.152, p.1179-1185, 2008.

3 DIVERSIDADE TAXONÔMICA E FUNCIONAL DE PLANCTOMYCETES EM SOLOS DE MANGUEZAIS

RESUMO

Os Planctomycetes compõem um dos grupos de bactérias com características particulares, e têm sido descritos em diversos habitats, incluindo ambientes contaminados. No presente estudo, este grupo microbiano é alvo de uma caracterização quanto a sua diversidade e funcionalidade, sendo esta realizada em solos de quatro áreas de manguezais, que apresentam um gradiente em seus respectivos estados de preservação. A partir de análises de sequências do gene ribossomal 16S RNAr foi demonstrada uma estruturação diferencial desta comunidade nas quatro áreas, além de uma maior frequência, riqueza e diversidade deste grupo na área de contaminação antropogênica (BrMgv03). Além disso, as predições de perfis metagenômicos demonstraram uma possível atuação desses microrganismos na biodegradação de contaminantes derivados do petróleo, com maiores frequências preditas destes genes nas áreas de contaminação por este poluente (BrMgv01 e BrMgv02). Corroborando a estes resultados, foram encontrados em dados metagenômicos, a ocorrência de genes envolvidos na biodegradação de compostos intermediários centrais das vias de degradação de hidrocarbonetos. Conjuntamente, os resultados aqui apresentados sugerem a responsividade de Planctomycetes a contaminação ambiental, e sugere a participação de membros deste grupo na remoção dos contaminantes derivados do petróleo.

Palavras-chave: Diversidade; Riqueza; Hidrocarbonetos policíclico aromáticos

ABSTRACT

Planctomycetes make up one of the groups of bacteria with particular characteristics, that have been described in several habitats, including contaminated environments. In the present study, this group's diversity and functionality was characterized, in soils of four mangrove areas, which present a gradient in their respective states of preservation. Based on sequence analyzes of the 16S rRNA gene, a differential structuring of this community was demonstrated in the four areas, as well as a greater frequency, richness and diversity of this group in the area of anthropogenic contamination (BrMgv03). In addition, predictions of metagenomic profiles showed a possible participation of these microorganisms in the biodegradation of petroleum contaminants, with higher frequencies of these genes in the areas of contamination by this pollutant (BrMgv01 and BrMgv02). To corroborate these results, the occurrence of genes involved in the biodegradation of central intermediates of the hydrocarbon degradation pathways was found in metagenomic data. Together, the results presented here suggest the responsiveness of Planctomycetes to environmental

contamination, and the participation of members of this group in the removal of contaminants derived from petroleum.

Keywords: Diversity; Abundance; Polycyclic aromatic hydrocarbons

3.1 INTRODUÇÃO

Planctomycetes são bactérias de vida livre que vêm sendo frequentemente encontradas em ambientes marinhos, terrestres, em associações com esponjas, crustáceos e algas (LAGE; BONDOSO, 2011; BENGTSSON; OVREAS, 2010). Em manguezais, estas bactérias são pouco estudadas, principalmente por metodologias independentes de cultivo (GHOSH et al., 2010; ANDREOTE et al., 2012). Dentre as diferentes funções atribuídas a estas bactérias, se destacam aquelas relacionadas a ciclagem de nutrientes nos solos. É dentro deste filo que se alocam os gêneros candidatos a realizarem a oxidação anaeróbica do íon amônio (processo chamado de *annamox*) (STROUS et al., 1999; STROUS et al., 2002; PENTON; DEVOL; TIEDJE, 2006; ZHANG et al., 2007). Há estudos que descrevem a atividade de oxidação anaeróbica do amônio, promovido por membros deste filo em solos de manguezais, indicando a importância dos mesmos nas transformações do nitrogênio nesse ambiente (AMANO et al., 2011; LI; GU, 2013; LI et al., 2011). No entanto, outros processos são também realizados por estas bactérias, muitos ainda para serem descritos e melhor compreendidos, como sua participação na transformação de outros elementos ou na biodegradação de contaminantes ambientais (FLORES; CATITA; LAGE, 2014).

As análises independentes de cultivo constituem um poderoso conjunto de ferramentas que permitem um amplo e fiel estudo de comunidades microbianas dos solos (CHOUARI et al., 2003; HUGENHOLTZ; GOEBEL; PACE, 1998; RAPPÉ; GIOVANNONI, 2003). A geração destes dados, apesar de comumente custosa, gera um conjunto de informações que pode ser analisada de diversas maneiras, e explorada dentro de diferentes hipóteses. Portanto, uma vez disponível, estes conjuntos de dados podem ser reanalisados *in silico*, dando origem a novas perguntas de interesse dentro do ambiente estudado.

Os manguezais constituem a base desta proposta, uma vez que são ambientes que ainda precisam ser melhor estudados, na busca de uma melhor exploração de sua biodiversidade, bem como na geração de tecnologias que visem proteger ou recuperar este ambiente de eventos de contaminação. Os manguezais são descritos como um dos ambientes mais suscetíveis a contaminação ambiental, característica esta que se explica principalmente

pela sua localização, na interface entre o oceano e o continente, acumulando assim os poluentes oriundos de ambos ecossistemas (DIAS et al., 2009; ANDREOTE et al., 2012; TAKETANI et al., 2010b). Dentre estes contaminantes, os materiais que mais chegam aos manguezais são oriundos de contaminação urbana - devido a proximidade destas áreas aos centros urbanos (NOGUEIRA et al., 2015) - e os hidrocarbonetos, gerados principalmente de eventos de contaminação ligados a indústria petroleira (TAKETANI et al., 2010b; SANTOS et al., 2011).

Dentre os componentes do petróleo, as moléculas mais recalcitrantes no ambiente contaminado são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Estes compostos se caracterizam pela baixa solubilidade em água, toxicidade, persistência e potencial de bioacumulação (GUTIERREZ et al., 2014). Alguns HPAs, especialmente os compostos de maior peso molecular, são tóxicos para a maioria dos organismos vivos. Portanto, há um grande interesse no desenvolvimento de estratégias para remover HPAs de locais contaminados (CHADHAIN et al., 2006). Pode-se ainda, elencar dentro dos HPAs, os hidrocarbonetos mais abundantes no petróleo, conhecidos como membros do chamado grupo BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno).

Alguns grupos de bactérias presentes nos solos de manguezais são conhecidos pela sua capacidade de degradar hidrocarbonetos, tais como *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Microbulbifer*, *Sphingomonas*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Dietzia* e *Gordonia* (SANTOS et al., 2011b). Numa visão mais geral, sabe-se que a contaminação dos solos de manguezais pode interferir sobre a comunidade microbiana residente, alterando tanto a estrutura desta comunidade (DIAS et al., 2011; ANDREOTE et al., 2012), como a ocorrência de grupos específicos de genes relacionado a ciclagem de nutrientes neste ambiente (DIAS et al., 2012; VARON-LOPEZ et al., 2014). No entanto, a resposta de comunidades mais específicas, relacionadas a um grupo taxonômico em particular, ainda está para ser descrita para a maioria dos organismos que habitam os solos de manguezais. Esta visão pontual pode aumentar nossa compreensão sobre estes efeitos, e dar suporte ao conhecimento mais detalhado dos diferentes processos biogeoquímicos que ocorrem nos solos de manguezais.

Neste capítulo, o objetivo foi comparar a estrutura da comunidade de Planctomycetes em solos de quatro áreas de manguezais com distintos históricos de preservação. As análises foram baseadas em dados pretéritos do grupo de pesquisa, que compõem um valioso banco de dados, constituído de sequências do gene 16S rDNA, e sequências metagenômicas, todas obtidas por metodologias de sequenciamento de alto rendimento. Estas sequências foram

analisadas e também utilizadas para a predição das funções associadas a este filo bacteriano nos solos deste ambiente.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local de Coleta

O presente trabalho foi desenvolvido em quatro áreas de manguezais, divididos em dois municípios do Estado de São Paulo - Bertioga e Cananéia (Ilha do Cardoso). No município de Bertioga as áreas correspondentes aos dois primeiros manguezais (BrMgv01 e BrMgv02) estão na mesma área, caracterizada pelo presente o impacto do derramamento de petróleo ocorrido em 1983. Estas duas áreas estão separadas por um pequeno córrego, que gera um gradiente na contaminação, ocorrendo esta em menor intensidade na área próxima ao mar (BrMgv01), e em maior intensidade na área próxima ao continente (BrMgv02). A terceira área (BrMgv03) encontra-se próxima a área urbana e sofre apenas efeito da contaminação antropogênica. O quarto manguezal (BrMgv04) está localizado em Cananéia, numa área de preservação ambiental, onde a intervenção humana é minimizada. Para maior descrição dos manguezais, verificar Andreote et al. (2012).

3.2.2 Amostragem

Cada amostra foi constituída de uma quantidade de solo obtida por amostrador de tubo de PVC de 30 cm de profundidade, com 7 cm de diâmetro, que foi introduzido no sedimento dos manguezais e retirado, contendo o material a ser analisado. A composição das amostras foi realizada com duas repetições de cada ponto em cada manguezal. No total, foram obtidas 8 amostras (4 áreas de manguezais x 2 repetições). Esta separação também se sustenta pelos trabalhos anteriores do grupo, e seguiu a denominação utilizada no trabalho de Andreote et al. (2012).

3.2.3 Extração de DNA

Esta etapa foi de maneira similar a descrita anteriormente por Andreote et al. (2015). O DNA foi extraído utilizando o kit Power Soil DNA Isolation (MoBio, EUA), com uma quantidade inicial de 0,25g de sedimento. Após a extração, a integridade e a quantidade dos DNAs obtidos foram verificadas em eletroforese em gel de agarose 1% (w/v).

3.2.4 Pirosequenciamento do gene 16S DNAr para bactérias

Esta etapa foi realizada pela doutora Maryeimy Varon-Lopez em sua tese de Doutorado (VARON-LOPEZ, 2014). Para o pirosequenciamento do gene 16S DNAr de bactérias, foram realizadas reações de amplificação em duas repetições de cada uma das áreas estudadas. A região V4 do gene alvo foi amplificada utilizando-se uma mistura dos *primers* 520F (5'-AYTGGGYDTAAAGNG-3') e 820R (5'TACCRGGGTHCTAATCC-3', 5'-TACCAGAGTATCTAATTC-3', 5'-CTACDSRGGTMTCTAATC-3', 5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3') (RDP's *Pyrosequencing Pipeline*: <http://pyro.cme.msu.edu/pyro/help.jsp>). Esta mistura de *primers* reversos teve o objetivo de amostrar o maior número de grupos bacterianos possível dentro da amostra a ser analisada, como descrito no protocolo do Ribosomal Data Project. Nos *primers* foram adicionadas sequências adaptadoras, conforme o manual do fabricante do equipamento (Roche, EUA).

Adicionalmente, nos *primers* forward foi adicionada uma tag de identidade (BARCODE/MID) composta de 6 a 8 bases, que serviu para identificar a origem de cada uma das sequências obtidas. A PCR de bactérias foi feita para 50 µL e a reação constituiu-se de 5 µL de tampão 10X (Invitrogen), 3,75 µL de 25 mM MgCl₂, 4,0 µL de dNTP 2,5 mM, 0,6 µL de 5 U µL⁻¹ de Taq DNA polimerase recombinante, 0,5 µL de cada um dos quatro *primers* reversos e 1 µL do primer forward (10 pmoles µL⁻¹) e 1 µL de DNA (aprox. 50ng), sendo o volume restante completado com água deionizada estéril. As condições de amplificação foram 3 minutos a 95 °C; 30 ciclos de 45 segundos a 95 °C, 1 minuto e 45 segundos a 57 °C e 1 minuto a 72 °C, e extensão final por 4 minutos a 72 °C. O produto da PCR de cada uma das amostras foi verificado e quantificado em gel de agarose 1%. Posteriormente, os produtos foram enviados para Helixxa (Campinas, São Paulo, Brasil), onde foram purificados (Beads AMPure-Agencourt), quantificados novamente (Picogreen, Invitrogen) e pirosequenciados em equipamento GS FLX Titanium series.

3.2.5 Análise das sequências do gene 16S DNAr

As análises das sequências do gene ribossomal de bactérias foram realizadas utilizando os programas *Quantitative Insights into Microbial Ecology* (QIIME) (CAPORASO et al., 2010) e *Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States* (PICRUST) (LANGILE et al., 2013). Inicialmente, as sequências obtidas foram inseridas no programa QIIME, juntamente com o arquivo de *mapping file*, onde as mesmas foram selecionadas de acordo com a qualidade do sequenciamento, sendo removidas aquelas com um escore de qualidade menor que 25, com tamanho menor que 150 pares de bases ou

contendo com uma ou mais bases ambíguas. As sequências foram então agrupadas por barcode, separando-as por amostra, sendo retirada das mesmas as sequências dos *primers*. As unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foram determinadas a 3% de dissimilaridade. Uma sequência de cada uma das UTOs geradas foi inicialmente utilizada para uma classificação taxonômica comparando-as com as sequências disponíveis no banco de dados RDP. Após isto, a tabela de UTOs foi filtrada para ser composta apenas de UTOs afiliadas ao filo Planctomycetes, o que foi obtido por meio do comando *filter_taxa_from_UTO_table.py*. Esta tabela resultante foi utilizada para a estimativa de valores de alfa diversidade, como os índices de riqueza de Chao e a estimativa da diversidade filogenética de Faith (PD) de cada uma das amostras. Adicionalmente, a distribuição das sequências de cada uma das amostras dentre as UTOs afiliadas a este filo deu suporte a análise de coordenadas principais (PCA), que estima a similaridade entre as amostras, numa análise de beta-diversidade.

A tabela contendo as UTOs afiliadas ao filo Planctomycetes também foi utilizada para a predição do metagenoma composto por estes organismos, obtida por meio do pipeline PICRUSt. Para tanto, a tabela normalizada foi submetida a predição do metagenoma, categorizada por funções, usando o sistema KEGG ao nível 3 para classificação. Os resultados obtidos foram visualizados e comparados estatisticamente no programa *Statistical Analysis of Metagenomic Profiles* (STAMP). Os perfis de funções preditas foram comparados por meio de análise de PCA. A busca por funções que foram preditas em diferentes frequências entre as áreas foi feita em nível 3, sendo selecionadas as que apresentaram valor de *p-value* < 0,05 na opção “Sem correção” no programa STAMP.

Estudos pretéritos de nosso grupo caracterizaram os solos aqui amostrados quanto a ocorrência de contaminantes derivados do petróleo (VARON-LOPEZ, 2013; LIMA, 2012). Baseado nisto, foram também analisadas a ocorrência diferencial de funções relacionadas a degradação de nitrotolueno, tolueno, xileno, etilbenzeno e naftaleno. Dentro desses grupos, destacam-se os componentes que fazem parte do BTEX (Benzeno-Tolueno- Etilbenzeno-Xileno).

3.2.6 Sequenciamento do DNA do solo via Illumina HiSeq 2000

Esta etapa foi realizada pela então aluna de mestrado Luana Lira Cadete durante o desenvolvimento de sua dissertação (CADETE, 2014). Os DNAs contidos nas amostras foram extraídos de forma similar a descrita anteriormente, e o material resultante foi purificado, quantificado no equipamento NanoDrop ND-1000 e submetido ao sequenciamento pela metodologia disponível para o equipamento HiScanSQ® da Illumina. Os procedimentos

de sequenciamento das amostras de DNA foram realizados pelo Laboratório Multiusuários Centralizado de Genômica Funcional aplicada a Agropecuária e Agroenergia (<http://genfis40.esalq.usp.br/multi/>), localizado na “Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz”.

3.2.7 Processamento das sequencias obtidas por Illumina HiSeq 2000

Esta etapa também foi realizada pela Msc. Luana Lira Cadete. As sequências foram trimadas com o objetivo de selecionar as que apresentaram qualidade superior *Phred* (Q score) maior que 20 (apenas um erro a cada 100 pares de bases - acurácia de 99% das bases sequenciadas). Foram descartados *reads* com baixa qualidade, artefatos de sequenciamento e sequências com tamanho menor do que 50 pb. 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 outro pipeline de remoção de artefatos de sequenciamentos e *reads* duplicados.

Com as sequências depositadas na plataforma MG-RAST, foram realizados estudos sobre possíveis funções relacionadas às sequências de Planctomycetes nas amostras das quatro áreas de estudo. Para isto, primeiramente foram selecionadas apenas sequências de Planctomycetes (*Best Hit Classification – All annotation source: M5NR – e-value: 1e-5 - %Identify: 60% - Alignment Length Cutoff: 15*), as quais foram separadas e enviadas para análise em *workbench*. Em seguida, foi realizado o levantamento das funções codificadas por tais sequências de DNA, utilizando-se a ferramenta *Hierarchical Classification – Annotation Source: Subsystems (e-value: 1e-5 - %Identify: 60% - Alignment Length Cutoff: 15)*.

A partir desses dados foram selecionadas funções em nível 1 “Metabolismo de Compostos Aromáticos” e assim gerada uma tabela com informações de *hits* e abundância. A partir desses dados, foram geradas novas funções referentes a Metabolismo de Compostos Aromáticos.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Comparação das comunidades de de Planctomycetes

A análise do gene ribossomal 16S DNAr foi utilizada com base em sequências de bactérias totais (Tabela 1) sendo filtrada sequências somente de representantes do filo

Planctomycetes (Tabela 2) numa quantidade de 889 sequências (144, 225, 327 e 193 das áreas BrMgv01, BrMgv02, BrMgv03 e BrMgv04, respectivamente). Estes números indicaram uma maior ocorrência destes organismos nas áreas dos manguezais BrMgv03 e BrMgv02 do que na área BrMgv01 – apesar da alta variabilidade nos dados de BrMgv04 (Figura 3.1). Esta observação pode sugerir um aumento na frequência destes organismos em áreas contaminadas.

Tabela 3.1- Dados obtidos pela análise do gene 16S DNAr para bactérias totais, com rarificação de 2.400

Área	Nº sequências (Bact. Totais)	OTUs
BrMgv01a	4.313	1.384
BrMgv01b	3.763	1.339
BrMgv02a	5.052	2.028
BrMgv02b	2.423	932
BrMgv03a	5.163	2.245
BrMgv03b	4.787	2.153
BrMgv04a	4.419	1.908
BrMgv04b	2.408	1.192
TOTAL	32.328	13.181

Tabela 3.2- Dados obtidos pela análise do gene 16S DNAr para sequências de Planctomycetes com rarificação de 40.

Área	Nº sequências (Planctomycetes)	OTUs
BrMgv01a	75	54
BrMgv01b	69	50
BrMgv02a	171	109
BrMgv02b	54	36
BrMgv03a	161	121
BrMgv03b	166	120
BrMgv04a	147	109
BrMgv04b	46	28
TOTAL	889	627

Figura 3.1: Frequência de sequências pertencentes a Planctomycetes nas quatro áreas de manguezais estudadas, determinada por meio da análise de sequências do gene ribossomal 16S DNAr e as barras indicam os valores das médias obtidas a partir de duas repetições e as barras indicam o desvio padrão da média.

A análise mais detalhada das sequências pertencentes a este filo obtidas de cada uma destas áreas deu origem aos indicadores de riqueza e diversidade de Planctomycetes. Estes valores seguiram a mesma ordenação encontrada para a frequência destes organismos, com maiores valores na área BrMgv03 (Figura 3.2).

Figura 3.2: Comparação dos Índices de riqueza de ChaoI (a), número de espécies (OTUs) observadas (b) e diversidade filogenética (c) nas comunidades de Planctomycetes descritas nas quatro áreas de manguezais em estudo. As barras indicam os valores das médias obtidas a partir de duas repetições e as barras indicam o desvio padrão da média.

A tendência observada corrobora os dados de Varon-Lopez (2013), que realizou uma análise análoga para o conjunto completo de bactérias destes solos. Esta autora encontrou índices de riqueza e diversidade com maiores valores nas áreas BrMgv03, porém seguida de BrMgv01. Adicionalmente, Rigonato et al. (2012; 2013) verificaram a mesma tendência para a comunidade de cianobactérias, com maiores valores de diversidade nas áreas contaminadas por petróleo. Em conjunto, estes dados sugerem que a diversidade de bactérias pode ser favorecida pela contaminação antropogênica ou pela contaminação por petróleo. Em alguns

trabalhos em manguezais têm sido demonstrados que estes efeitos se dão pelo fato dos contaminantes estimularem a multiplicação de grupos de baixa frequências em áreas pristinas, o que por hora, equilibra o sistema, e pode gerar um ambiente de maior diversidade, possivelmente, transiente. Além disso, Santos et al. (2011b) mostraram que o aumento da riqueza e da diversidade de bactérias em áreas contaminadas são provavelmente relacionadas com o uso dos componentes do contaminante como fonte de obtenção de energia, dando ao ambiente um aumento no número de nichos.

Pode-se ainda, sugerir que o fator de seleção não seja diretamente a contaminação do ambiente, mas sim as alterações promovidas por este evento. Por exemplo, é conhecido que a atividade radicular das plantas de mangue tem papel fundamental na determinação das condições ambientais destes solos – por exemplo alterando o potencial redox. Assim, BrMgv02 pode experimentar menores valores de potencial redox, com conseqüente menor disponibilidade de oxigênio do que os outros locais, já que nesta área a vegetação é menos densa e ausente da espécie *R. mangle* (ver descrição dos manguezais em Andreote et al. 2012). De maneira análoga, a área BrMgv03 apresenta a vegetação mais diversificada, o que pode também levar a uma maior diversidade no grupo de Planctomycetes. Neste caso, a correlação entre a composição da vegetação seria prevalente aos eventos de contaminação na estruturação das comunidades de Planctomycetes. Esta importância da vegetação sobre a diversidade microbiana dos solos foi recentemente demonstrada em solos de Mata atlântica (LIMA-PERIM et al., 2016) e parece ser verdadeira também em outros ecossistemas (WAGAI et al., 2011; SUNDQVIST et al., 2011; GRIGULIS et al., 2013; PRESCOTT & GREYSTON, 2013; PROBER et al., 2015).

Cabe ainda uma discussão sobre a correlação positiva entre a frequência e os valores de diversidade e riqueza destes organismos nos manguezais estudados. Se o padrão fosse oposto, onde uma maior frequência estivesse ligada a uma menor diversidade e riqueza, seria simples inferir em um evento de seleção. Porém, observa-se que o aumento na frequência está ligado a uma diversificação da comunidade. Este efeito pode ser causado pela adaptação em nível de filo, ou seja, uma adaptação de todos os Planctomycetes. Adaptação esta a vegetação mais diversa e aos contaminantes antopogênicos encontrados na área BrMgv03.

Em relação a distinção das comunidades de Planctomycetes, a análise de PCA, baseadas na ocorrência diferencial das UTOs afiliadas a este filo nas áreas estudadas (Figura 3.3), indicou uma diferenciação das comunidades de Planctomycetes entre as áreas contaminadas e a área pristina. Observa-se a separação das amostras de BrMGV04 das demais

logo no primeiro eixo da análise, enquanto que as amostras de Bertioiga (BrMgv01, BrMgv02 e BrMgv03) se distinguem parcialmente apenas, ao longo do segundo eixo.

Figura 3.3: Análise de componentes principais com base na distribuição das UTOs atribuídas aos Plactomycetes nas quatro áreas de manguezais estudadas. Os valores nos eixos indicam a variância dos dados plotada em cada um destes.

Foi também comparada a ocorrência de grupos taxonômicos de Planctomycetes em cada uma das áreas (Figura 3.4). Os gêneros encontrados foram *Planctomycetes*, *Pirellula*, *Gemmata* e *Phycisphaera*. Numa comparação entre as áreas, é possível indicar que a área BrMgv03 apresenta maior diversidade a nível de gêneros com maiores valores para o gênero *Pirellula*, *Planctomycetes* e *Gemmata*. O gênero *Gemmata* é apenas encontrado na área BrMgv03 e BrMgv02. A área BrMgv01 apresentou maiores valores para *Phycisphaera*.

Figura 3.4: Ocorrência de gêneros pertencentes ao filo Planctomycetes nas quatro áreas de manguezais estudadas. Cada barra contém valores das duas repetições analisadas em cada uma das áreas de manguezais.

3.3.2 Predição metagenômica da comunidade de Planctomycetes a partir das sequências do gene ribossomal 16S

Os metagenomas foram preditos a partir das sequências do gene de 16S rRNA com acurácia baseada nos valores de NSTI, obtidos em valores de 0.31 ± 0.05 , 0.31 ± 0.03 , 0.31 ± 0.02 e 0.37 ± 0.04 para as áreas BrMgv01, BrMgv02, BrMgv03, BrMgv04, respectivamente. Estes valores são altos, porém comumente obtidos quando as predições são realizadas a partir de dados de amostras de solos. Esta análise foi realizada uma vez que a abundância de sequências afiliadas a este filo numa análise metagenômica limita nosso acesso a sua informação funcional. Desta forma, com uma predição, podemos posteriormente explorar melhor os dados metagenômicos, de forma a validar as inferências obtidas a partir da predição.

No total, foram encontradas 327 funções atribuídas aos Planctomycetes nos solos de manguezais. O perfil de distribuição de cada uma destas funções nas diferentes áreas foi comparado pela PCA, onde se observa que a área mais distinta é BrMgv04 (Figura 3.5). Isto corrobora os dados taxonômicos, que elege esta área como a mais distinta entre as quatro, e indica as áreas de Bertioiga com maiores similaridades.

Figura 3.5: Análise de componentes principais com base na distribuição das funções atribuídas aos Planctomycetes nas quatro áreas de manguezais estudadas. Os valores nos eixos indicam os valores nos eixos indicam a variância dos dados plotada em cada um destes.

A comparação entre as separações encontradas nas PCAs obtidas com dados taxonômicos e funcionais indicam que há uma diferença na organização taxonômica e funcional das comunidades de Planctomycetes entre as áreas. Esta clusterização das amostras sugere que esta comunidade apresenta comportamento diferencial frente a eventos de contaminação ambiental, o que dá a este grupo uma possibilidade de atuar de forma direta ou indireta na recuperação do ambiente, possivelmente atuando na degradação dos contaminantes. A comparação das PCAs de taxonomia e funcionalidade, sugere que o gráfico de PCA de funcionalidade apresente menor heterogeneidade funcional de Planctomycetes no manguezal pristino (maior redundância funcional), ao passo que não áreas impactadas isso não é observado devido a maior variedade de contaminantes, maior variedade de nichos e fontes de carbono e energia e por fim, uma maior variedade no número de funções.

Além desta comparação entre os perfis funcionais encontrados em cada uma das áreas, a predição dos metagenomas permite uma comparação direta da frequência das diferentes funções em cada uma das áreas estudadas – indicada pela proporção de sequências

preditas. Dentre as 327 funções preditas nos manguezais, 85 mostraram-se com ocorrência diferencial entre as áreas estudadas ($p < 0,05$). Dentre estas, ganhou destaque a predição diferencial para a proporção de genes afiliados a degradação de xenobióticos (Figura 3.6). A proporção de sequências afiliadas a esta função dentro dos metagenomas preditos é maior nas áreas de manguezais localizadas na cidade de Bertioga (BrMgv01, BrMgv02 e BrMgv03), e ocorre em menores proporções na área de Cananéia (BrMgv04). Esta observação relaciona diretamente a ocorrência destas predições com a contaminação ambiental que ocorre de forma diferencial nos manguezais estudados. Nota-se que as áreas contaminadas são preditas com maiores proporções destes genes, enquanto uma menor quantidade de funções e genes relacionados a degradação de xenobióticos é predita na área do manguezal preservado.

Figura 3.6: Proporção da predição de genes relacionados a degradação de xenobióticos pertencentes a Planctomycetes em solos das quatro áreas de manguezais avaliadas.

Numa visão mais detalhada das funções previstas em cada uma das áreas de estudo, pode-se observar a prevalência de funções atribuídas a degradação de hidrocarbonetos aromáticos e policíclicos aromáticos (HPAs), com ênfase nos hidrocarbonetos derivados do petróleo (Figuras 3.7). A ocorrência diferencial de genes relacionados a degradação de HPAs segue a mesma tendência observada para a função geral de degradação de xenobióticos – maiores proporções nas áreas contaminadas e menores valores na área preservada.

Figura 3.7: Diferença na predição da ocorrência de genes relacionados a degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, pertencentes ao filo Planctomycetes, nas diferentes áreas de estudo.

A biodegradação é um importante mecanismo de remoção de poluentes orgânicos a partir de um local contaminado (SEO; KEUM & LI, 2009). A recalcitrância de muitos produtos químicos ocorre principalmente devido à falta de enzimas que possam promover sua decomposição. O petróleo é constituído predominantemente por hidrocarbonetos, que podem chegar a 97% da sua composição, e em menor quantidade, de derivados orgânicos sulfurados,

nitrogenados, oxigenados e organometálicos (SANTOS et al., 2011a; LIMA, 2012). Os HPAs são uma classe de compostos orgânicos hidrofóbicos constituídos por no mínimo dois anéis benzênicos arranjados em formas lineares, angulares ou em grupos (LIMA, 2012; PENG et al., 2008; PEREIRA JR., 2009). Estas características dão a estes compostos uma grande resistência aos processos de degradação, o que pode explicar o fato de genes associados a este processo ocorrem ainda em maior frequência em áreas contaminadas há muito tempo atrás (como por exemplo a área BrMgv02, contaminada há aproximadamente 30 anos). Outra possível explicação para esta ocorrência diferencial pode ser a entrada de contaminantes nestes sistemas, a qual deve ocorrer em maior intensidade nas áreas de Bertioga (área urbana e industrial) do que na área de Cananéia (localizada dentro de uma reserva ambiental). Estudos similares relacionados a contaminação de petróleo em manguezais mostram diferentes hipóteses para a atuação de microrganismos junto a contaminação dessas áreas. Jiménez e colaboradores (2014) mostraram através de metagenômica a ocorrência de genes de α/β hidrolases nas mesmas quatro áreas de manguezais, e também destacaram uma elevada proporção desses genes nas áreas de Bertioga (BrMgv01, BrMgv02 e BrMgv03). Já Taketani e colaboradores (2010b) analisaram a comunidade microbiana de dois manguezais, sendo um destes contaminado por petróleo em 2002. Estes autores induziram a nova contaminação no ambiente, e verificaram a resposta mais rápida a este processo na área previamente com histórico de contaminação, onde o mesmo foi consumido mais rapidamente. Fassanela e colaboradores (2012) encontraram uma maior abundância de fungos em áreas de manguezais com contaminação de petróleo. Santos e colaboradores (2011b) mostraram o efeito na comunidade microbiana de um manguezal conservado depois de uma simulação de contaminação por petróleo. Estes estudos mostram a resposta da comunidade microbiana dos solos de manguezais aos eventos de contaminação, indicando que dentro destas residem diversos grupos microbianos aptos a atuarem na biodegradação dos contaminantes. Resta saber quais os principais e/ou novos grupos, que podem apresentar processos metabólicos particulares, capazes de aumentar a eficiência do processo de biodegradação.

Analisando os dados de ocorrência de Planctomycetes nas diferentes áreas de manguezais (Figura 3.1 e 3.2) e a ocorrência de genes preditos relacionados a degradação de contaminantes (Figuras 3.6 e 3.7), podemos sugerir outros processos que ocorrem de maneira diferencial nestas comunidades nos solos de manguezais. Verifica-se que as tendências não são perfeitas, sendo que áreas com menores valores de frequência, diversidade e riqueza destes organismos (como BrMgv01) podem abrigar maiores valores para a predição de genes

relacionados a degradação de xenobióticos. Isto pode sugerir a seleção com base na funcionalidade destes organismos.

Segundo Santos et al. (2011b) o carbono dos compostos de petróleo causam um desequilíbrio na relação C:N:P, o que pode causar um rápido consumo das fontes N e P, que já são escassas nos manguezais. Assim sendo, essa mudança na diversidade e estrutura microbiana entre as áreas pode também estar relacionada a proporção de nutrientes, o que privilegia determinados grupos biológicos. Estes autores mostraram que concentrações pequenas de contaminação de óleo, aumentam a diversidade e riqueza de certos grupos, por ser uma concentração não tóxica ao microrganismo. Com base nesta explicação, o fato da área BrMgv01 apresentar maiores frequências de genes degradadores de xenobióticos e de compostos policíclicos aromáticos, pode ser relacionado com o fato desta área apresentar uma contaminação menor por petróleo, menos tóxica, sendo assim sobressalente ao estímulo da biodiversidade de microrganismos que carregam estes genes de degradação.

Em relação as funções relacionadas a biodegradação dos contaminantes que ocorrem nas áreas de estudo (VARON-LOPEZ, 2013), foi verificado que o gradiente de contaminação corrobora os dados de predições para os compostos naftaleno (Figura 3.8), enquanto que para os compostos nitrotolueno, tolueno, xileno e etilbenzeno, não há relação direta entre a presença do contaminantes e a proporção de genes preditos para a biodegradação dos mesmos.

Figura 3.8: Diferença na predição da ocorrência de genes relacionados a degradação de nitrotolueno por Planctomycetes nas diferentes áreas de estudo.

Figura 3.9: Diferença na predição da ocorrência de genes relacionados a degradação de tolueno por Planctomycetes nas diferentes áreas de estudo.

Figura 3.10: Diferença na predição da ocorrência de genes relacionados a degradação de xileno por Planctomycetes nas diferentes áreas de estudo.

Figura 3.11: Diferença na predição da ocorrência de genes relacionados a degradação de etilbenzeno por Planctomycetes nas diferentes áreas de estudo.

Figura 3.12: Diferença na predição da ocorrência de genes relacionados a degradação de naftaleno por Planctomycetes nas diferentes áreas de estudo.

Estes compostos entram no ambiente, principalmente através de processos associados com problemas no armazenamento de petróleo e seus derivados, mas também são gerados em processos industriais, como os relacionados ao processamento de madeira, fabricação de pesticidas, detergentes, produtos químicos, tintas e vernizes. Estas substâncias são tóxicas, solúveis e muitas são ainda voláteis, formando assim, um dos principais grupos de contaminantes ambientais de risco à saúde (ANDREONI & GIANFREDA, 2007). Embora muitos mecanismos de biodegradação sejam conhecidos, alguns aspectos precisam ser ainda elucidados, dando maior eficiência aos processos de biorremediação. Os resultados até aqui apresentados, sugerem que bactérias pertencentes ao filo Planctomycetes podem auxiliar neste processo, atuando efetivamente sobre a biodegradação de derivados de petróleo e outros contaminantes ambientais. Podemos observar com os resultados (Figura 3.8; 3.9; 3.10; 3.11 e 3.12), que a área de manguezal com maior contaminação de petróleo (BrMgv02) possui uma maior predição para degradação de tolueno por Planctomycetes (Figura 3.9). Assim como a área BrMgv01 com pouca contaminação por petróleo possui uma maior predição para degradação de Xileno por Planctomycetes (Figura 3.10), por Etilbenzeno (Figura 3.11) e

também Naftaleno (Figura 3.12). E a área pristina, localizada numa área de conservação ambiental (BrMgv04), apresenta uma maior predição para degradação de Nitrotolueno.

Estes resultados devem ser comparados com o estudo conduzido por Flores, Catita e Lage (2014), onde isolados pertencentes a este filo mostraram grande resistência a determinados poluentes ou xenobióticos testados, como fungicida Ridomil®, fenol, hidrazina e cobre, além de elevada resistência a compostos de nitrogênio inorgânico. Apesar de se conhecer o comportamento de isolados deste filo a esta gama de contaminantes, ainda não há dados sobre a capacidade de bactérias desse filo em tolerar ou degradar hidrocarbonetos. Alguns outros estudos reportam a presença de Planctomyces em habitats poluídos (REED et al., 2002; CHOUARI et al., 2003; AKOB et al., 2007; YU et al., 2011; HAN et al., 2012), sugerindo uma possível participação na degradação de hidrocarbonetos e outros poluentes. Isto mostra a necessidade de mais estudos neste sentido, sendo possivelmente as diferenças encontradas entre os estudos, resultante da origem diferencial dos organismos, com a possível ocorrência diferencial de genes relacionados a estes processos em organismos encontrados em locais distintos.

3.3.3 Ocorrência de sequências gênicas relacionadas a biodegradação de xenobióticos em dados metagenômicos

Estas análises foram conduzidas no intuito de, ao menos parcialmente, validar as predições metagenômicas realizadas pelo PICRUSt.

A análise das funções atribuídas às sequências classificadas como pertencentes ao filo Planctomycetes revelaram a ocorrência de genes envolvidos na biodegradação de compostos intermediários das vias centrais de degradação de hidrocarbonetos, como por exemplo, o gentisato (Figura 3.13). As rotas de degradação de hidrocarbonetos, realizadas por diferentes sistemas biológicos, possuem um centro de convergência, representado pela geração de moléculas específicas, dentre as quais se destaca o gentisato. Esta molécula é gerada e consumida ao longo da via periférica de biodegradação aeróbica dos hidrocarbonetos, onde a oxigenase ativa o O₂ que cliva o anel aromático, dando origem aos produtos hidroxilados como catecol, protocatecoato, gentisato (2,5 dihidroxibenzoato), homogentisato (2,5 acetato de dihidroxifenil) (FUCKS, BOLL & HEIDER, 2011).

Dentre as quatro áreas de manguezais estudadas, apenas foram encontrados genes associados a esta função nas áreas de manguezais da cidade de Bertioga, novamente correlacionando a ocorrência destes genes a eventos de contaminação ambiental (Figura 3.13).

Figura 3.13 Frequência de seqüências de genes associados a degradação de gentisato nas quatro áreas de manguezais estudadas. As barras indicam a média de três repetições, enquanto que as barras de erros indicam o desvio padrão da média.

Para que um microrganismo utilize estes compostos como fonte de C e energia para o seu crescimento, é necessário que possua as várias enzimas que transformam as complexas moléculas dos HPAs em intermediários comuns. Várias vias metabólicas de degradação dos HPAs já foram identificadas em diferentes microrganismos, porém as mais estudadas são as do metabolismo aeróbico realizado pelas bactérias, pelos fungos lignolíticos e pelos fungos não-lignolíticos (JACQUES et al., 2007).

Em vista da complexidade e da estabilidade da estrutura química dos HPAs, devido a ressonância dos anéis aromáticos, a maioria dos microrganismos não possui enzimas capazes de combinar as etapas de ativação e degradação completa dos mesmos. Além disso, por constituírem-se unicamente de átomos de carbono e hidrogênio, estes compostos apresentam baixíssima solubilidade em água e forte tendência de sorção as partículas orgânicas e minerais do solo e dos sedimentos, o que reduz sua biodisponibilidade aos microrganismos degradadores e resulta na contaminação ambiental (JACQUES, BENTO & CAMARGO, 2007). Isto indica que a completa biodegradação de tais compostos pode ser efeito da atividade conjunta de diversos grupos microbianos, que atuam em conjunto, dividindo as etapas necessárias para sua completa mineralização. Aqui adicionamos as bactérias pertencentes ao filo Planctomycetes nesta lista, um grupo conhecido por estabelecer interações biológicas com outros organismos (KULICHEVSKAYA, et al., 2007;2008; 2009; BENGTTSSON E OVREAS, 2010; LAGE E BONDOSO, 2011; BONDOSO et al., 2014;

FLORES, CATITA E LAGE, 2014), que podem atuar também desta maneira na degradação de contaminantes ambientais.

3.4 CONCLUSÃO

Neste capítulo podemos concluir que o manguezal antropogênico BrMgv03 seguido pelo manguezal contaminado BrMgv02 apresentam maiores valores de frequência, diversidade de Planctomycetes, sendo esta comunidade bacteriana sendo favorecida pela contaminação antropogênica ou pela contaminação de petróleo. Os gêneros mais abundantes encontrados foram *Pirellula*, *Planctomyces* e *Gemmata* na área BrMgv03, reforçando a maior diversidade de Planctomycetes entre as quatro áreas. Cabe levantar também o fato da área BrMgv03 ser uma área mais diversa quanto a sua vegetação e quanto a comunidade microbiana, com um ambiente bastante favorecido para o desenvolvimento dessas bactérias.

Quanto as funções atribuídas a este grupo microbiano, concluímos que as comunidades apresentam perfis preditos de metagenomas distintos em cada um dos manguezais estudados. As áreas de manguezais com maior contaminação de petróleo (BrMgv02) possui uma maior predição para degradação de tolueno, já a área BrMgv01 com pouca contaminação de petróleo, possui maior predição para degradação de xileno, etilbenzeno e naftaleno e a área pristina (BrMgv04) apresenta maior predição para degradação de nitrotolueno. Resultados já esperados, comparados com os graus de contaminação das diferentes áreas. A área BrMgv01 é uma área com uma diluição da contaminação como consequência da travessia do Rio Iriri, sendo uma área que apresenta menos toxicidade para essas bactérias, com níveis de contaminação que podem ser considerados toleráveis aos Planctomycetes.

Corroborando com a predição, as análises das sequências de metagenômica mostraram para a área BrMgv02 e área BrMgv01, áreas com efeito da contaminação, os intermediários centrais das vias de degradação, sendo os genes salicilato e gentisato.

Vale ressaltar por fim, que a real habilidade destas bactérias em degradar estes contaminantes deve ser comprovada por ensaios mais específicos, preferencialmente executados com isolados bacterianos pertencentes a este grupo, tanto atuando de forma isolada ou em consórcios microbianos, o que será indicado mediando o capítulo 5.

REFERÊNCIAS

- AKOB, D.M.; MILLS, H.J.; KOSTKA, J.E. Metabolically active microbial communities in uranium-contaminated subsurface sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, v.59, p.95-107, 2007.
- AMANO, T.; YOSHINAGA, I.; YAMAGISHI, T.; THUOC, C.V.; THU, P.T.; UEDA, S.; KATO, K.; SAKO, Y.; SUWA, Y. Contribution of Anammox bacteria to benthic nitrogen cycling in a mangrove forest and shrimp ponds, Haiphong, **Microbes Environmental**, v.26, p.1-6, 2011.
- ANDREONI, V.; GIANFREDA, L. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.76, p.287-308, 2007.
- ANDREOTE, F.D.; JIMENEZ, D.J.; CHAVES, D.; DIAS, A.C.F.; LUVIZOTTO, D.M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELA, C.C.; LOPEZ, M.V.; BAENA, S.; TAKETANI, R.G.; SOARES, I.M. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **Plos One**, v.7, 2012.
- BADIAL, P.R.; OLIVEIRA FILHO, J.P.; CUNHA, PH.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**, v.90, p.443-450, 2011.
- BENGTSSON, M.M.; OVREAS, L. Planctomycetes dominate biofilms on surfaces of the kelp *Laminaria hyperborea*. **BMC Microbiology**, v.10, p.1-12, 2010.
- BONDOSO, J.; ALBUQUERQUE, L.; NOBRE, M.F.; LOBO-DA-CUNHA, A.; DA COSTA, M.S.; LAGE, O.M. *Roseimaritima ulvae* gen.nov., sp.nov. and *Rubripirellula obstinata* gen.nov., sp.nov., two novel planctomycetes isolated from the epiphytic community of maroalgae. **Systematic and Applied Microbiology**, p.1-8, 2014.
- CADETE, L.L. Descrição da comunidade microbiana ativa em solos de manguezais por metagenômica e metatranscriptômica. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, São Paulo, 2014.
- CAPORASO, J.G.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; DESANTIS, T.Z.; ANDERSEN, G.L.; KNIGHT, R. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. **Bioinformatics**, v.26, p.266-267, 2010.

- CHADHAIN, S.M.N.; NORMAN, R.S.; PESCE, K.V.; KUKOR, J.J.; ZYLSTRA, G.J. Microbial dioxygenase gene population shifts during polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, 2006.
- CHOUARI, R.; PASLIER, D.L.; DAEGELEN, P.; GINESTET, P.; WEISSENBAACH, J.; SGHIR, A. Molecular evidence for novel *Planctomycete* diversity in a municipal wastewater treatment plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.7354-7363, 2003.
- 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 of Microbiology and Biotechnology**, v.25, p.1305–1311, 2009.
- DIAS, A.C.F.; DINI-ANDREOTE, F.; TAKETANI, R.G.; TSAI, S.M.; AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S.; ANDREOTE, F.D. Archaeal communities in the sediments of three contrasting mangroves. **Journal Soils Sediments**, 2011.
- DIAS, A.C.F.; TAKETANI, R.G.; ANDREOTE, F.D.; LUVIZOTTO, D.M.; SILVA, J.L.; NASCIMENTO, R.S.; SOARES, I.M. Interspecific variation of the bacterial community structure in the phyllosphere of the three major plant components of mangrove forests. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, p.653-660, 2012a.
- DIAS, A.C.F.; SILVA, M.C.P.; COTTA, S.R.; DINI-ANDREOTE, F.; SOARES JR, F.L.; SALLES, J.F.; AZEVEDO, J.L.; van ELSAS, J.D.; ANDREOTE, F.D. Abundance and genetic diversity of *nifH* gene sequences in anthropogenically affected Brazilian mangrove sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p.7960-7967, 2012b.
- FASSANELA, C.C.; DIAS, A.C.F.; RIGONATO, J.; FIORE, M.F.; SOARES JR, F.L.; MELO, I.S.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; van ELSAS, J.D.; ANDREOTE, F.D. The selection exerted by oil contamination on mangrove fungal communities. **Water Soil Air Pollut**, v.223, p.4233-4243, 2012.
- FLORES, C.; CATITA, J.A.M.; LAGE, O.M. Assessment of Planctomycetes cell viability after pollutants exposure. **Antonie van Leeuwenhoek**, p.399-411, 2014.
- FUCHS, G.; BOLL, M.; HEIDER, J. Microbial degradation of aromatic compounds – from one strategy to four. **Nature Reviews**, v.9, p.803-816, 2011.
- GHOSH, A.; DEY, N.; BERA, A.; TIWARI, A.; SATHYANIRANJAN, K.; CHAKRABARTI, K.; CHATTOPADHYAY, D. Culture independent molecular analysis of bacterial communities in the mangrove sediment of Sundarban, India. **Saline Systems**, v.6, 2010.

- GRIGULIS, K.; LAVOREL, S.; KRAINER, U.; LEGAY, N.; BAXENDALE, C.; DUMONT, M.; KASTL, E.; ARNOLDI, C.; BARDGETT, R.D.; POLY, F.; POMMIER, T.; SCHLOTER, M.; TAPPEINER, U.; BAHN, M.; CLÉMET, J.C. Relative contributions of plant traits and soil microbial properties to mountain grassland ecosystem services. **Journal of Ecology**, v.101, p.47-57, 2013.
- GUTIERREZ, T.; RHODES, G.; MISHAMANDANI, S.; BERRY, D.; WHITMAN, W.B.; NICHOLS, P.D.; SEMPLE, K.T. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation of Phytoplankton-associated *Arenibacter* spp. And description of *Arenibacter algicola* sp. nov., na aromatic hydrocarbon-degrading bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, 2014.
- HAN, J.; JUNG, J.; HYUN, S.; PARK, H.; PARK, W. Effects of nutrient input and diesel contamination on soil enzyme activities and microbial communities in antarctic soils. **Journal Microbiology**, v.50, p.916-924, 2012.
- HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 4765-4774, 1998.
- JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O. Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência e Natura**, v.29, p.7-24, 2007.
- JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; ANTONIOLLI, Z.I.; CAMARGO, F.A.O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v.37, p.1192-1201, 2007.
- JIMÉNEZ, D.J.; DINI-ANDREOTE, F.; OTTONI, J.R.; OLIVEIRA, V.M.; VAN ELSAS, J.D.; ANDREOTE, F.D. Compositional profile of α/β hidrolase fold proteins in mangroves soil metagenomes: prevalence of epoxide hydrolases and haloalkane dehalogenases in oil-contaminated sites. **Microbial Biotechnology**, v.8, p.604-613, 2015.
- KULICHEVSKAYA, I.S.; IVANOVA, A.O.; BELOVA, S.E.; BAULINA, O.L.; BODELIER, P.L.E.; RIJPSTRA, W.I.C.; SINNINGHE-DAMSTÈ, J.S.; ZAVARZIN, G.A.; DEDYSH, S.N. *Schlesneria paludicola* gen.nov., sp.nov., the first acidophilic member of the order *Planctomycetales*, from *Sphagnum*-dominated boreal wetlands. **International Journal of Sistematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.2680-2687, 2007.
- KULICHEVSKAYA, I.S.; IVANOVA, A.O.; BAULINA, O.L.; BODELIER, P.L.E.; SINNINGHE-DAMSTÈ, J.S.; DEDYSH, S.N. *Singulisphaera acidiphila* gen.nov., sp.nov., a non-filamentous, *Isosphaera*-like planctomycete from acidic northern wetlands.

- International Journal of Sistematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.1186-1193, 2008.
- KULICHEVSKAYA, I.S.; BAULINA, O.I.; BODELIER, P.L.E.; RIJPSTRA, W.I.C.; DAMSTE, J.S.S. DEDYSH, S.N. *Zavarzinella Formosa* gen. nov., sp. nov., a novel stalked, *Gemmata* like *Planctomycete* from a Siberian peat bog. **International Journal for Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, p.357-364, 2009.
- LAGE, O.M.; BONDOSO, J. *Planctomycetes* diversity associated with macroalgae. **FEMS Microbiology and Ecology**, v.78, p.366-375, 2011.
- LANGILE, M.G.I.; ZANEVELD, J.; CAPORASO, J.G.; McDONALD, D.; KNIGHTS, D.; REYES, J.A.; CLEMENTE, J.C.; BURKEPILE, D.E.; THURBER, R.L.V.; KNIGHT, R.; BEIKO, R.G.; HUTTENHOWER, C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature Biotechnology**, v.31, 2013.
- LI, M. HONG, Y.; CAO, H.; GU, J. Mangrove trees affect the community structure and distribution of anammox bacteria at an anthropogenic-polluted mangrove in the Pearl-River Delta reflected by 16S rRNA and hydrazine oxidoreductase (HZO) encoding gene analyses. **Ecotoxicology**, 2011.
- LI, M.; GU, J. Community structure and transcript responses of anammox bacteria, AOA, and AOB in mangrove sediment microcosms amended with ammonium and nitrite. **Environmental Biotechnology**, 2013.
- LIMA, D.V.; Análise da diversidade, abundância e estrutura funcional da comunidade microbiana de três manguezais do Estado de São Paulo, Brasil. Tese (Doutorado em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas) - Universidade de São Paulo-SP. p.1-211, 2012.
- LIMA-PERIM, J.; ROMAGNOLI, E.M.; DINI-ANDREOTE, F.; DURRER, A.; DIAS, A.C.F.; ANDREOTE, F.D. Linking the composition of bacterial and archaeal communities to characteristics of soil and flora composition in the Atlantic Rainforest. **PlosOne**, 2016.
- 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**, v.9, p.386-395, 2008.

- NOGUEIRA, V.L.R.; ROCHA, L.L.; COLARES, G.B.; ANGELIM, A.L.; NORMANDO, L.R.O.; CANTÃO, M.E.; AGNEZ-LIMA, L.F.; ANDREOTE, F.D.; MELO, V.M.M. Microbiomes and potential metabolic pathways of pritrine and anthropized Brazilian mangroves. **Regional Studies in Marine Science**, p.56-64, 2015.
- PENG, R.H.; XIONG, A.S.; XUE, Y.; FU, X.Y.; GAO, F.; ZHAO, W.; TIAN, Y.S.; YAO, Q.H. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. **FEMS Microbiology Reviews**, v.32, 2008.
- PEREIRA-JR., N.; GOMES, E.B.; SORIANO, A.U. Biodegradação de hidrocarbonetos. **Séries em Biotecnologia**, v.3, Rio de Janeiro, 2009.
- PRESCOTT, C.E.; GRAYSTON, S.J. Tree species influence of microbial communities in litter and soil: Current knowledge and research needs. **Forest Ecology and Management**, v.309, p.19-27, 2013.
- PROBER, S.M.; LEFF, J.W.; BATES, S.T.; BORER, E.T.; FIRN, J.; HARPOLE, W.S.; LIND, E.M.; SEABLOOM, E.W.; ADLER, P.B.; BAKKER, J.D.; CLELAND, E.E.; DECRAPPEO, N.M.; DELORENZE, E.; HAGENAH, N.; HAUTIER, Y.; HOFMOCKEL, S.; KIRKMAN, K.P.; KNOPS, J.M.H.; LA-PIERRE, K.J.; MACDOUGALL, A.S.; MCCULLEY, R.L.; MITCHELL, C.E.; RISCH, A.C.; SCHUETZ, M.; STEVENS, C.J.; WILLIAMS, R.J.; FIERER, N. Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide. **Ecology Letters**, v.18, p.85-95, 2015.
- RAPPÉ, M.S.; GIOVANNONI, S.J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, v.57, p.369-394, 2003.
- REED, D.W.; FUJITA, Y.; DELWICHE, M.E.; BLACKWELDER, D.B.; SHERIDAN, P.P.; UCHIDA, T.; COLWELL, F.S. Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a forearc basin. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, p.3759-3770, 2002.
- RIGONATO, J.; ALVARENGA, D.O.; ANDREOTE, F.D.; DIAS, A.C.F.; MELO, I.S.; KENT, A.; FIORE, M.F. Cyanobacterial diversity in the phyllosphere of a mangrove forest. **FEMS Microbiology Ecology**, v.80, p.312-322, 2012.
- RIGONATO, J.; KENT, A.D.; ALVARENGA, D.O.; ANDREOTE, F.D.; BEIRIGO, R.M.; VIDAL-TORRADO, P.; FIORE, M.F. Drivers of cyanobacterial diversity and community composition in mangrove soils in South-east Brazil. **Environmental Microbiology**, v.15, p.1103-1114, 2013.

- SANTOS, H. F.; CARMO, F.L.; PAES, J.E.S.; ROSADO, A.S.; PEIXOTO, R.S. Bioremediation of mangroves impacted by Petroleum. **Water Air Soil Pollut**, p.329-350, 2011a.
- SANTOS, H.F.; CURY, J.C.; CARMO, F.L.; SANTOS, A.L.; TIEDJE, J.; Van ELSAS, J.D.; ROSADO, A.S.; PEIXOTO, R.S. Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. **Plos One**, v.6, 2011a.
- SANTOS, H.F.; CURY J.C.; CARMOS, F.L.; SANTOS, A.L.; TIEDJE, J.; Van ELSAS, J.D.; ROSADO, A.S.; PEIXOTO, R.S. Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. **PLoS One**, 2011b.
- SEO, J.S.; KEUM, Y.S.; LI, Q.X. Bacterial degradation of aromatic compounds. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, p.278-309, 2009.
- STROUS, M.; FUERST, J.A.; KRAMER, E.H.,M.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.T.; WEBB, R.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. Missing lithotroph identified as new *Planctomycete*. **Nature**, v.400, p.446-449, 1999.
- STROUS, M.; KUENEN, J.G.; FUERST, J.A.; WAGNER, M.; JETTEN, M.S.M. The anammox case – a new experimental manifesto for microbiological eco-physiology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.81, p.693-702, 2002.
- SUNDQVIST, M.K.; GIESLER, R.; WARDLE, D.A. Within-and across-species responses of plant traits and litter decomposition to elevation across contrasting vegetation types subarctic tundra. **PlosOne**, 2011.
- TAKETANI, R.G.; FRANCO, N.O.; ROSADO, A.S.; VAN ELSAS, J.D. Microbial community response to a simulated hydrocarbon spill in mangrove sediments. **The Journal of Microbiology**, v.48, 2010b.
- VARON-LOPEZ, M. Descrição da microbiota relacionada às transformações do enxofre em sedimentos de manguezais. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – **Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ)**, Piracicaba –SP., 2013.

- VASCONCELLOS, S.P.; DELLAGNEZZE, B.M.; WIELAND, A.; KLOCK, J.H.; SANTOS NETO, E.V.; MARSAIOLI, A.J.; OLIVEIRA, V.M.; MICHAELIS, W. The potential for hydrocarbon biodegradation and production of extracellular polymeric substances by aerobic bacteria isolated from a Brazilian petroleum reservoir. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.27, p.1513-1518, 2011.
- WAGAI, R.; KITAYAMA, K.; SATOMURA, T.; FUJINUMA, R.; BALSER, T.; Interactive influences of climate and parent material on soil microbial community structure in Bornean tropical forest ecosystems. **Ecol Res**, v.26, p.627-636, 2011.
- YU, S.; LI, S.; TANG, Y.; WU, X. Succession of bacterial community along with the removal of heavy crude oil pollutants by multiple bioestimulation treatments in the Yellow River Delta, China. **Journal Environmental Science**, v.23, p.1533-1543, 2011.

4 CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS PERTENCENTES AO FILO PLANCTOMYCETES OBTIDOS DE SOLOS DE MANGUEZAIS

RESUMO

Apesar dos avanços nas metodologias de estudo da microbiologia ambiental, muitos aspectos relacionados a funcionalidade microbiana, bem como a sua biodiversidade, ainda requerem a utilização de metodologias de cultivo para sua elucidação. Neste sentido, este trabalho busca uma maior compreensão da biodiversidade genética e metabólica de bactérias afiliadas ao filo Planctomycetes em solos de manguezais. Para isto, uma coleção de culturas composta de 43 isolados foi obtida e caracterizada quanto a morfologia (principalmente colônias de cor rosa, redondas e brilhantes, entre outras de coloração mais clara) e filogenia. A alocação dos isolados dentro do filo *Planctomycetes* indicou a ocorrência predominante dos gêneros *Planctomycetes*, *Rhodopirellula*, *Pirellula* e *Blastopirellula*. Em sequência, dois isolados (*Rhodopirellula* sp. MGV e *Rhodopirellula baltica* BR-MGV) foram caracterizados metabolicamente via análise de consumo de diferentes fontes de carbono (Biolog), e foram submetidos ao sequenciamento do DNA genômico. Acredita-se que estas bactérias estejam realizando funções relacionadas a degradação de hidrocarbonetos, participando principalmente das vias secundárias desse processo. Este estudo constitui um grande avanço no conhecimento destas bactérias, pois constitui o primeiro relato de cultivos de Planctomycetes a partir de solos de manguezais, destacando seus aspectos taxonômicos e funcionais.

Palavras-chave: Isolamento; Filogenia; Taxonomia

ABSTRACT

Despite advances in methodologies for the study of environmental microbiology, many aspects related to microbial functionality, as well as its biodiversity, still require the use of cultivation methodologies for its elucidation. Thus, this work seeks a greater understanding of the genetic and metabolic biodiversity of bacteria affiliated with Planctomycetes phylum in mangrove soils. For this, a collection of cultures composed of 43 isolates was obtained and characterized based on morphology (mainly pink colonies, round and bright, among others of lighter color) and phylogeny. The allocation of the isolates within the Planctomycetes phylum indicated the predominant *Planctomycetes*, *Rhodopirellula*, *Pirellula* e *Blastopirellula*. Then, two isolates (*Rhodopirellula* sp. MGV e *Rhodopirellula baltica* BR-MGV) were metabolically characterized based on the analysis of the consumption of different carbon sources (Biolog), and had their genomic DNA sequenced. The genome annotation indicated that these bacteria had genes related to the degradation of hydrocarbons, participating mainly in the secondary pathways of this process. This study constitutes a great advancement in the knowledge of these bacteria, since it constitutes the first

report of culturing of Planctomycetes from mangrove soils, highlighting its taxonomic and functional aspects.

Keywords: Isolation; Phylogeny; Taxonomy

4.1 INTRODUÇÃO

O filo Planctomycetes é composto por bactérias com características morfológicas, genéticas, metabólicas e fisiológicas peculiares. Este filo se aloca dentro do superfilo monofilético PVC (Planctomycetes, Verrucomicrobia e Clamidia), compostos por grupos de bactérias encontradas em uma infinidade de ecossistemas (FARIA, 2015). As descrições destas bactérias indicam sua ocorrência tanto na forma de vida livre como em associação com outros organismos, como corais, crustáceos, esponjas, microalgas, cianobactérias, macroalgas (LAGE; BONDOSO, 2011).

Quando cultivadas em meio de cultivo, as bactérias afiliadas ao filo Planctomycetes apresentam multiplicação lenta e/ou dependente da interação com outros microrganismos (SLIEKERS et al., 2003). A maioria destas apresenta metabolismo quimioheterotrófico, sendo aeróbicas ou facultativa, capazes de utilizar diferentes fontes de carbono (BUCKLEY et al., 2006).

Recentes trabalhos demonstram a possibilidade de se obter isolados bacterianos pertencentes a este filo CHOUARI et al., (2003); ELSHAHED et al., (2007); LAGE, (2013); LAGE & BONDOSO, (2011); LAGE, BONDOSO & VIANA (2012); KULICHEVSKAYA et al., (2015); YOON et al., (2015). Estes estudos utilizaram meios de cultivo simples como M13 ou M14 enriquecidos com uma solução de sais, metais e complexo B vitamínico, combinados com uma série de antibióticos como Estreptomicina, Ampicilina e Ciclohexamina. Desta forma, mesmo após um grande período de incubação – que pode chegar a 50 dias – as colônias podem ser observadas. Esta metodologia já foi utilizada com sucesso em amostras de água de estação de criação de peixes, superfícies de macroalgas entre outros (LAGE, BONDOSO & VIANA, 2012; LAGE 2013).

Dessa forma, o presente trabalho visou adotar a metodologia de cultivo para promover um melhor conhecimento sobre as comunidades cultivadas de Planctomycetes em solos de manguezais. Para tanto, amostras de solo oriundas das 3 áreas de manguezais estudadas na cidade de Bertioga, juntamente com a área do manguezal da cidade de Cananéia foram utilizados. Uma coleção composta de 43 isolados identificados como pertencentes a este filo foi isolada e dessa coleção foram escolhidos dois representantes para serem estudados quanto à morfologia (através de análise de microscopia eletrônica), quanto ao

metabolismo (através da análise por Biolog, (observando o uso ou não de determinadas fontes de carbono) e quanto á genômica (através de montagem e anotação de seus genomas).

4.2 MATERIAL e MÉTODOS

4.2.1 Preparo das amostras de solo de manguezais

As amostras coletadas para análises foram oriundas do gradiente ambiental de contaminação, já amplamente acessado por nosso grupo de estudo. Foi utilizado um *pool* das áreas de Bertioga BrMGV01, BrMGV02, BrMGV03 (isolados obtidos durante o mestrado da autora desta tese), e também realizada uma nova amostragem, a partir da qual foram obtidos isolados das amostras das áreas BrMGV02 e Cananéia. Para o isolamento bacteriano, a partir de cada uma das amostras, foram separadas quantidades de aproximadamente 500g de solo, utilizadas para o preparo de três sub-amostras (10g cada); sendo a primeira representada pelo solo bruto, a segunda pelo solo lavado com água do mar e peneirado; e a terceira composta pelo solo lavado, peneirado e centrifugado à 5.000 rpm por 30 minutos. Na primeira e segunda preparação, foi inoculado o sedimento diretamente na placa de cultivo, enquanto que na terceira forma de preparo, o sobrenadante foi descartado e solo suspenso em 2mL de PBS 1X esterilizado (NaCl: 8g/ KCl: 0,2g/ Na₂PO₄ anidro: 1,189g/ KH₂PO₄: 0,2g/ água destilada: 1L) (LAGE; BONDOSO e VIANA, 2012).

4.2.2 Preparo do meio de cultivo específico para Planctomycetes

As suspensões oriundas das três preparações foram semeadas em meios de cultura M13 e M14 (LAGE; BONDOSO E VIANA, 2012) (ANEXO A). Estes meios de cultivo foram acrescentados de Solução de Vitaminas (ANEXO A), Solução de metais (Metais 44) e solução de sais (*Hunter's basal salts*) (LAGE; BONDOSO E VIANA, 2012). Os antibióticos usados no cultivo, com o intuito de inibir o desenvolvimento de outros grupos de bactérias e de fungos foram ciclohexamida (20µg/mL); ampicilina (200µg/mL) e estreptomicina (55µg/mL). As placas foram então incubadas a uma temperatura de 20°C, sem presença de luz (LAGE; BONDOSO; VIANA, 2012). O monitoramento do desenvolvimento de colônias foi feito de forma comparativa com os resultados previamente obtidos no mestrado da estudante, com o aparecimento de colônias de coloração rósea após longos períodos de cultivo (Figura 4.1), como 30 a 50 dias após a inoculação das placas.

4.2.3 Identificação taxonômica dos isolados de Planctomycetes

A confirmação da afiliação taxonômica dos isolados obtidos foi realizada por meio da identificação molecular dos mesmos, baseadas no sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S RNAr (ANDREOTE, 2007). Resumidamente, o DNA de cada isolado foi extraído com kit apropriado (Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit), e este foi utilizado para a realização de PCRs, no intuito de amplificar o gene 16S DNAr, com os *primers* 27F (5' GAGAGTTTGATCCTGGCTCA3') (STUDHOLME et al., 1999) e 1378R (5'CGGTGTGTACAACGCCCGGGAACG3') (MARCHESI et al., 1998) - tamanho de fragmento aproximado de 1360 pb. A amplificação foi feita em solução contendo tampão PCR 1X (5 µL), mix de 0,2 mM de cada DNTP (4 µL), 3mM de MgCl₂ (7,5µL), 1U *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen) (0,5 µL), *primers* 27F e 1387R (10pmol) (1µL), 30µL de água MilliQ Ultrapura esterelizada e 1µL de DNA. A reação foi realizada em termociclador sob as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 4 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 63°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 10 minutos. A purificação da PCR foi realizada por meio do Kit de purificação *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* e as amostras foram enviadas para sequenciamento pela metodologia de Sanger, realizado por meio de colaboração junto ao CENA/USP.

4.2.4 Análise filogenética dos isolados de Planctomycetes

As sequências afiliadas à Planctomycetes foram comparadas às sequências de Planctomycetes descritos, obtidas nas bases de dados do GenBank e RDP, a partir do número de acesso citado nos artigos consultados (WOEBKEN et al., 2007; BAE et al., 2010; BORIN et al., 2013). A árvore filogenética foi construída com base no alinhamento realizado pelo ClustalW (THOMPSON, GIBSON & HIGGINS, 2003), posteriormente agrupada pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987). A consistência da estrutura da árvore foi determinada pela análise de *bootstrap*, feita com base em 1000 sub-amostragens na matriz de distância. Sequências distantemente relacionadas à Planctomycetes, como sequências identificadas como *Escherichia coli*, foram utilizadas como grupo externo nesta inferência filogenética.

4.2.5 Análise de perfil genômico dos isolados por BOX-PCR

A variabilidade genética dos isolados obtidos foi realizada por meio da técnica de BOX-PCR. A reação de BOX-PCR foi conduzida para um volume final de 25µL, contendo 1µL de DNA, 0,1µL do *primer* BOX A1R (100pmol) (5' –

CTACGGCAAGGCGACGCTGACG – 3'), 2,5µL DMSO (dimetilsulfóxido), 10µL DNTP (2,5mM), 2,5µL tampão (10X (NH₄)₂SO₄), 0,4µLTaqDNA Polimerase (5.UµL⁻¹) e 5µL de água ultrapura (MilliQ®) esterilizada. A reação de amplificação foi realizada em termociclador programando um ciclo inicial de 95°C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 2 minutos, 92°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto, 65°C por 8 minutos, seguidos de uma extensão final de 65°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram revelados em gel de agarose 2% (p/vol) em tampão TAE 1X (Tris-Acetado-EDTA) por 4h a 50V.

Para análise dos perfis de bandas obtidos, foi utilizado o programa *Bionumerics* (Applied Maths, Bélgica), onde os perfis foram normalizados e comparados por correlação de Pearson, levando em consideração os gradientes das curvas de coloração de cada amostra aplicada num mesmo gel.

4.2.6 Sequenciamento de genomas por meio da metodologia de Ion Torrent

Os DNAs genômicos dos isolados selecionados (*Rhodopirellula* sp. MGv e *Rhodopirellula baltica* BR-MGV) foram sequenciados por meio da plataforma *Ion Torrent PGM platform* (ThermoFisher Scientific). Para tanto, os DNAs previamente extraídos foram fragmentados enzimaticamente e ligados aos adaptadores apropriados usando o *Ion Xpress Plus Fragment Library Kit*, seguindo o protocolo do fabricante. Os fragmentos obtidos foram então ligados às esferas iônicas e amplificados por reação em cadeia da polimerase em emulsão utilizando o *Kit Ion PGM Template OT2 400*. As *beads* enriquecidas foram então sequenciadas num *Ion Torrent* (PGM) usando *chips* 316 e kit de sequenciamento *Ion PGM 400*.

4.2.7 Tratamento das sequências e montagem dos *contigs*

As sequências obtidas foram levadas à análise de qualidade e trimadas usando o programa Galaxy (<https://usegalaxy.org/>), onde foram primeiramente reportadas as suas qualidades iniciais por *FastQC* e em seguida removidas as sequências de iniciadores de sequenciamento e sequências menores que 100 pb usando *Trimmomatic* e *Trim Galore*. Após a seleção de sequências de alta qualidade e tamanho maior do que 100 pb, estas foram unidas em sequências contíguas (*contigs*) utilizando o programa computacional Spades 3.6.1-Linux. Após a montagem foi realizada uma análise da qualidade dessa montagem pelo programa QUAST 2.3 (GUREVICH et al., 2013) e seguido da concatenação das montagens utilizando Cisa 1.3 (LIN & LIAO, 2013).

4.2.8 Anotação e afiliação filogenética

A anotação dos *contigs* gerados foi realizada nos sistemas Patric (<https://www.patricbrc.org/>) e Rast (<http://rast.nmpdr.org/>), seguindo parâmetros iniciais dos programas. A partir da anotação, foi realizado um levantamento dos genes e funções de relevância ambiental, com destaque para as sequências similares as relacionadas ao Metabolismo de Hidrocarbonetos.

As sequências anotadas dos genomas analisados foram depositadas no NCBI, onde a anotação foi novamente validada. O número de acesso dos microrganismos são: *Rhodopirellula* sp. MGV (NPDI000000000) e *Rhodopirellula baltica* BR-MGV (PPHI000000000).

4.2.9 Análise morfológica dos isolados por microscopia

Os isolados cujos genomas foram sequenciados foram também estudados em maior detalhamento quando a suas morfologias. Estes foram cultivados em meios de cultura apropriados (seção 4.2.2) e uma alíquota de 10µL da suspensão final de célula foi tratada com 1µL de DAP (1 µg/ml) (LLOPIS ET AL., 2010) para facilitar a visualização em microscopia. Após este procedimento, as células foram observadas em microscopia no aparelho Olympus BX40 com fluorescência, sob objetiva de 100X e ocular de 10X de aumento.

4.2.10 Perfil metabólico dos isolados descritos

Estes mesmos isolados foram usados para uma inferência metabólica, com base na análise de *BIOLOG Ecoplates Assyas* (Biolog Inc., USA). Com essa análise foi possível observar a capacidade dos isolados utilizarem as 31 diferentes fontes de carbono (C). Para isto, as células bacterianas cultivadas por 48h (fase log) recuperadas por centrifugação durante 30 min a 250 rpm, suspensas em água esterilizada e alíquotas de 150 µL foram adicionadas a cada poço no *Ecoplate* (foram utilizadas três repetições). As placas foram incubadas a 25 °C e o consumo de C foi determinado por análise dos valores de absorbância de cada poço, a 590 nm, em intervalos de 24 horas, em uma incubação total de 168 horas.

4.2.11 Tolerância dos isolados a salinidade

Os isolados avaliados nas análises prévias foram também caracterizados quando a tolerância ao aumento na concentração salina. Esta inferência busca explorar uma possível adaptação destes organismos ao ambiente salino dos manguezais. Para isto, curvas de multiplicação celular dos isolados *Rhodopirellula* sp. MGV e *Rhodopirellula baltica* BR-

MGV foram obtidas em cultivos com o meio de cultura M13 com diferentes concentrações de NaCl (1,15, 2,30 e 4,60%). Estes valores foram selecionados por constituírem metade (1,15%) ou o dobro (4,60%) da concentração de sal utilizada neste meio de cultivo (2,30%). Os cultivos bacterianos foram promovidos sob agitação (150 rpm) a 25°C, e a multiplicação celular foi monitorada a cada 12 horas ao longo de um período total de 120 horas. A quantificação das células foi estimada por valores de absorbância, registrados a 600 nm.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Isolamento e seleção de bactérias afiliadas ao grupo de Planctomycetes

A possibilidade de isolamento de Planctomycetes a partir das amostras de manguezais mostrou-se bastante promissora. Após os procedimentos descritos no item 4.2.2 e incubação das placas por 50 dias, foi observado o surgimento de colônias com características similares às descritas como as afiliadas ao grupo alvo de estudo (colônias com coloração rosa, redondas e brilhantes) (Figura 4.1). No total, 43 isolados foram obtidas com estas características, as quais foram então submetidas a identificação por sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S DNAr.

Figura 4.1: Colônias de Planctomycetes com morfologia e coloração característica de células dos Planctomycetes isolados.

A literatura indica que as características de morfologia e coloração deste grupo de bactérias variam em tons rosados e salmão, com formatos bem arredondados e brilhantes (LAGE, BONDOSO, VIANA, 2012), porém alguns isolados já se mostraram incolor, com células elipsoidais em forma de pêra, em pares ou dispostos em rosetas (KULICHEVSKAYA

et al., 2015). Nossos isolados seguem a morfologia descrita por LAGE, BONDOSO, VIANA (2012) com colônias com coloração bem rosadas e brilhantes.

4.3.2 Filogenia de bactérias afiliadas a Planctomycetes

A afiliação taxonômica dos isolados obtidos foi determinada com base no sequenciamento parcial do gene 16S rDNA. A análise das sequências e a filogenia indicaram que os isolados obtidos, pertencentes ao filo Planctomycetes, se afiliam aos gêneros *Planctomycetes*, *Blastopirellula* e *Pirellula* (Tabela 4.1; Figura 4.2; 4.3).

Tabela 4.1 - Identificação dos isolados afiliados por *Planctomycetes* por meio de comparação das sequências obtidas com as sequências presentes no Genbank (BlastN) *As sequências são divididas em *pool*, no qual representam o isolamento das áreas de Bertioga misturadas e P/a (por área), no qual representam o isolamento dividido por área dos manguezais de Bertioga. (continua)

Isolado	Melhor afiliação (gênero)	Identidade (%)	Pool; P/a*	Tamanho das sequências (pb)	Cobertura das sequências
MSC-1	<i>Pirellula</i> sp.	96%	<i>Pool</i>	1464	97%
MSC -2	<i>Planctomyectes</i> sp.	97%	<i>Pool</i>	1160	97%
MSC -3	<i>Blastopirellula</i> sp.	97%	<i>Pool</i>	1140	96%
MSC -4	<i>Planctomycetes</i> sp.	98%	<i>Pool</i>	1137	97%
MSC -5	<i>Blastopirellula</i> sp.	98%	<i>Pool</i>	1146	97%
MSC -6	<i>Planctomycetes</i> sp.	94%	<i>Pool</i>	1194	94%
MSC -7	<i>Planctomycetes</i> sp.	97%	<i>Pool</i>	1139	97%
MSC -8	<i>Planctomycetes</i> sp.	97%	<i>Pool</i>	1127	98%
MSC -9	<i>Planctomycetes</i> sp.	98%	<i>Pool</i>	1151	97%
MSC -10	<i>Planctomycetes</i> sp.	98%	<i>Pool</i>	1135	95%
MSC -11	<i>Planctomycetes</i> sp.	97%	<i>Pool</i>	1140	98%
MSC -12	<i>Planctomycetes</i> sp.	97%	<i>Pool</i>	1136	94%
MSC -13	<i>Planctomycetes</i> sp.	97%	<i>Pool</i>	1137	97%
MSC -14	<i>Pirellula</i> sp.	97%	<i>Pool</i>	1134	97%
MSC -16	<i>Pirellula</i> sp.	97%	<i>Pool</i>	1144	97%
MSC -17	<i>Pirellula</i> sp.	98%	<i>Pool</i>	1135	97%
MSC -18	<i>Planctomycetes</i> sp.	96%	<i>Pool</i>	1131	95%
MSC -19	<i>Planctomycetes</i> sp.	97%	<i>Pool</i>	1158	96%
MSC -20	<i>Blastopirellula</i> sp.	97%	<i>Pool</i>	1146	95%
MSC -21	<i>Blastopirellula</i> sp.	98%	<i>Pool</i>	1145	97%
MSC -22	<i>Pirellula</i> sp.	97%	<i>Pool</i>	1134	98%
MSC -23	<i>Pirellula</i> sp.	97%	<i>Pool</i>	1138	98%
MSC -24	<i>Planctomycetes</i> sp.	96%	<i>Pool</i>	1131	97%

Tabela 4.1 - Identificação dos isolados afiliados por *Planctomycetes* por meio de comparação das sequências obtidas com as sequências presentes no Genbank (BlastN) *As sequências são divididas em *pool*, no qual representam o isolamento das áreas de Bertioiga misturadas e P/a (por área), no qual representam o isolamento dividido por área dos manguezais de Bertioiga (continuação)

Isolado	Gêneros com afiliação	Identidade (%)	<i>Pool</i> ; <i>P/a</i>	Tamanho das sequências (pb)	Cobertura das sequências
MSC -25	<i>Planctomycetes</i> sp.	97%	<i>Pool</i>	1121	97%
MSC-26	<i>Pirellula</i> sp.	97%	<i>Pool</i>	1125	98%
MSC-27	<i>Blastopirellula</i> sp.	98%	<i>Pool</i>	1140	98%
MSC -28	<i>Pirellula</i> sp	97%	<i>Pool</i>	1135	98%
MSC -29	<i>Pirellula</i> sp.	97%	<i>Pool</i>	1128	99%
MSC -30	<i>Planctomycetes</i> sp.	97%	<i>Pool</i>	1126	98%
BrMgv02.1	<i>Pirellula</i> sp.	99%	<i>P/a</i>	1126	92%
BrMgv02.2	<i>Planctomycetes</i> sp.	97%	<i>P/a</i>	1139	97%
BrMgv02.3	<i>Planctomycetes</i> sp.	97%	<i>P/a</i>	1141	97%
BrMgv02.4	<i>Planctomycetes</i> sp.	98%	<i>P/a</i>	1138	96%
BrMgv02.5	<i>Planctomyecetes</i> sp.	98%	<i>P/a</i>	1133	97%
BrMgv02.6	<i>Planctomycetes</i> sp.	99%	<i>P/a</i>	1149	95%
Cananéia.1	<i>Blastopirellula</i> sp.	98%	<i>P/a</i>	1141	97%
Cananéia.2	<i>Planctomycetes</i> sp.	97%	<i>P/a</i>	1133	97%
Cananéia.3	<i>Blastopirellula</i> sp.	98%	<i>P/a</i>	1125	98%
Cananéia.4	<i>Planctomycetes</i> sp.	95%	<i>P/a</i>	1151	95%
Cananéia.5	<i>Planctomycetes</i> sp.	97%	<i>P/a</i>	1155	95%
Cananéia.6	<i>Blastopirellula</i> sp.	97%	<i>P/a</i>	1126	98%
Cananéia.7	<i>Planctomycetes</i> sp.	97%	<i>P/a</i>	518	96%

Uma vez que os gêneros que mostraram maiores similaridades com os isolados foram *Planctomycetes*, *Blastopirellula* e *Rhodopirellula*, a filogenia dos isolados foi melhor estudada numa árvore filogenética (Figura 4.2; 4.3), onde foram comparadas as sequências obtidas com aquelas já descritas como afiliadas a *Planctomycetes*.

Na organização filogenética, foi possível observar que os isolados obtidos do manguezal 02 (BrMgv02(4-5-6)) se agruparam com *Planctomycetes maris*, isolado

originalmente a partir de água do mar (BAULD & STALEY, 1976). Isolados da área de Bertioga 2 (BRMGV02.1) juntamente com dois genomas publicados e um isolado representante do manguezal pristino Cananéia 07 se agruparam com *Rhodopirellula* sp., descrita inicialmente em comunidades epífitas de várias macroalgas marinhas. Este mesmo clado engloba as sequências das espécies *Rhodopirellula baltica*, *Rhodopirellula lusitana*, *Rhodopirellula rubra*, *Rhodopirellula caenicola* e *Rhodopirellula rosea*. A espécie *Rhodopirellula baltica* engloba sequências de isolados obtidos a partir de estações de tratamento de água (CHOUARI et al., 2003). Já as espécies *Rhodopirellula rosea* foram isolados a partir de uma carcaça de moluscos mortos (*Scapharca broughtonii*) (ROH et al., 2013). *Rhodopirellula rubra* e *Rhodopirellula lusitana* foram isoladas a partir de comunidades epífitas de macroalgas marinhas da Costa Norte de Portugal (BONDOSO et al., 2014). As espécies de *Rhodopirellula caenicola* foram isolados de amostras de areias de ferro de Murohama Beach, Kamaishi, Japão (YOON et al., 2015). Já os isolados MSC.06, MSC20 e Cananéia 04 se agruparam ao gênero *Blastopirellula*. Os isolados oriundos do manguezal pristino Cananéia 01, 03 e 06, alocados num mesmo clado, alocaram-se próximos a *Blastopirellula cremea*. Não houve nenhum agrupamento dos isolados obtidos neste trabalho com o clado que hospeda os grupos de Planctomycetes relacionados ao processo de *anammox*.

O fato de muitos Planctomycetes serem frequentemente isolados a partir de superfície de alga se deve pela grande variedade de fontes de carbono produzidas por estas. A alga *Laminaria hyperborea* hospeda uma grande abundância de Planctomycetes, que constituem até 51% na comunidade bacteriana em seu biofilme (BENGTSSON & OVREAS, 2010). Além disso, uma observação muito importante nos estudos de Planctomycetes associados a macroalgas é a sua capacidade de se adaptar a microambientes criados por macromoléculas liberadas por macroalgas, que incluem polissacarídeos sulfatados (LAGE & BODOSO, 2014). Segundo Glöckner et al. (2003), por meio do sequenciamento completo de *Rhodopirellula* sp., descreve que algumas dessas bactérias alojam em seu genoma 110 genes que codificam proteínas de sulfatases, ligando sua habilidade na obtenção de nutrientes a sua adaptabilidade ambiental.

Algumas espécies de Planctomycetes cultivadas a partir de ambientes aquáticos possuem características contrastantes. *Planctomycetes maris* e *Planctomycetes brasiliensis* necessitam de NaCl para o crescimento. Em contraste, *Planctomycetes limnophilus* são típicos de água doce e não crescem em concentrações de NaCl superior à 1% (w/v). Filogeneticamente, *Planctomyces limnophilus* está mais intimamente relacionado a outros

Planctomycetes de água doce como *Schlesneria paludicola* (KULICHEVSKAYA et al., 2007; 2015).

Um fato adicional que chama a atenção na árvore filogenética obtida é a possível formação de subgrupos contendo apenas isolados obtidos no presente estudo. Os isolados BrMgv2.02 e 03 formam um clado único juntamente com os isolados de pool das amostras do mestrado da aluna (MSC1-2-3-4-5-7-8-9-10-11-12-13-14-15-16-17-18-19-21-22-23-24-25-26-27-28) juntamente com duas amostras do manguezal Cananéia (2 e 5). Este fato pode estar relacionado a adaptação destes organismos a estes ambientes. Se esta possibilidade for considerada, pode-se sugerir que os grupos microbianos apresentam adaptações particulares ao ambiente de manguezal, como é observado para grupos de plantas e alguns animais. Neste estudo, podemos observar tais subgrupos nos ramos que alocam isolados de *Plantomycetes* e *Blastopirelulla* (Figura 4.2), sugerindo que mesmo que pertencentes a este gênero, podem ocorrer nas amostras analisadas, algumas espécies diferenciadas das já descritas. Isto vai de encontro ao que foi comentado anteriormente para a análise de agrupamentos gênicos, e condiz com a literatura que mostra a formação de clusters únicos para outros genes estudados, como aqueles associados a ciclagem de nitrogênio (DIAS et al., 2012b) e enxofre (TAKETANI et al., 2010; VARON-LOPEZ et al., 2013). Certamente, o estudo de sequências genômicas de isolados pertencentes a este filo auxiliará nesta inferência, possivelmente dando suporte a descrição do endemismo de tal ambiente.

Figura 4.2: Árvore filogenética do gene ribossomal 16S rRNA, realizada para sequências afiliadas à Planctomycetes em comparação aos isolados dos diferentes manguezais em estudo. A metodologia utilizada foi baseada em *Neighbor joining* e valores de confiança baseados em 1.000 *bootstrap*. Foi utilizado *Escherichia coli* como *outgroup*.

4.3.3 Análise de perfis genotípicos dos isolados determinados por BOX-PCR

As técnicas de PCR baseados no *fingerprinting* genômicos, como BOX-PCR, aproveitam-se da presença de sequências repetitivas que são intercaladas ao longo de todo o genoma bacteriano (SOARES JÚNIOR, 2011). Conforme descrito por Tação e colaboradores (2005), esta técnica vem sendo muito utilizada quando se trabalha com isolados bacterianos, sendo uma ferramenta adequada para caracterizar gêneros bacterianos diversos, principalmente devido a sua facilidade e rapidez na obtenção dos resultados.

Observando os perfis de BOX-PCR (Figura 4.3) pode-se notar a divergência dos perfis. A seleção dos isolados para análise genômica foi baseada neste resultado, onde dois isolados alocados em diferentes clados foram selecionados. Os escolhidos foram os isolados numerados por 12 e 30 como referência, referentes aos isolados *Rhodopirellula* sp. MGV e *Rhodopirellula baltica* BR-MGV, respectivamente.

Figura 4.3: Perfis de BOX-PCR dos isolados de Planctomycetes. As setas indicam quais isolados foram submetidos ao sequenciamento dos genomas.

Infelizmente, esta escolha deu-se de maneira prévia ao sequenciamento do gene ribossomal dos isolados. Observa-se que a técnica de BOX-PCR não foi eficiente em separar organismos de diferentes gêneros dentro do filo Planctomycetes. Como podemos observar, o compararmos as Figuras 4.2 da seção 4.3.2 e as figuras 4.3 da seção 4.3.2 e 4.4 da seção 4.3.4, após o sequenciamento ou da descrição dos genomas desses isolados, observa-se grande similaridade taxonômica dos mesmos (ambos identificados como pertencentes ao gênero *Rhodopirellula*).

4.3.4 Genômica dos isolados *Rhodopirellula* sp. MGV e *Rhodopirellula baltica* BR-MGV

Os isolados *Rhodopirellula* sp. MGV e *Rhodopirellula baltica* BR-MGV foram submetidos a análises de seus genomas completos. As sequências brutas obtidas do sequenciamento pela plataforma *Ion Torrent* foram de 3.095.467 sequências e 3.207.713 sequências, respectivamente (Tabela 4.2). Estas foram enviadas para o programa Galaxy (site) onde foram trimadas (cortadas) as sequências de baixa qualidade e os iniciadores de sequenciamento. Com isso, respectivamente obtiveram os seguintes tamanhos de 2.997.598 sequências e 3.073.229 sequências. A partir destas sequências foram realizadas as montagens dos genomas resultando em 78 contigs, 55.3% GC, 6.287 CDS e tamanho total de 7.1 Mb (Tabela 4.2) para *Rhodopirellula* sp. MGV e 99 contigs, 55.3% CG, 6.640 CDS e um tamanho total de 7.4 Mb (Tabela 4.2) para *Rhodopirellula baltica* BR-MGV.

Tabela 4.2 - Dados relevantes sobre os genomas sequenciados

	<i>Rhodopirellula</i> sp. MGV	<i>Rhodopirellula baltica</i> BR-MGV
Sequências Brutas	3.095.467	3.207.713
Sequências <i>limpas</i> ''	2.997.598	3.073.229
Número de <i>contigs</i>	78	99
Conteúdo G+C	55.3%	55.3%
Número de CDS	6.287	6.640
Tamanho do genoma	7.1 Mb	7.4Mb

A descrição genômica dos isolados *Rhodopirellula* sp. MGV e *Rhodopirellula baltica* BR-MGV revelou similaridade ao gênero *Rhodopirellula* através de análises do 16s rRNA (Figura 4.4). O primeiro representante deste grupo a ter seu genoma sequenciado foi o organismo marinho *Rhodopirellula baltica* (7.15Mb) (GLÖCKNER et al., 2003; LOMBARDOT et al., 2005; TEELING et al., 2004; JENKINS; KEDAR; FUERST, 2002).

Foram comumente encontrados nos dois genomas estudados na anotação sistemas genéticos codificadores para: 1) catabolismo de compostos aromáticos envolvidos nas vias de Salicilato e Gentisato. O salicilato é um intermediário na degradação do naftaleno, bem como indutor do catabolismo do naftaleno. Este composto também atua como intermediário em uma das vias aeróbicas para metabolismo de fenantreno, induzindo sua degradação por alguns organismos (SINGLETON et al., 2005). Segundo Hopper & Chapman (1970), o caminho do catabolismo para compostos aromáticos mais completamente estudado envolve a síntese de catecóis, em que estes dois grupos hidroxilas são suportados por átomos de carbono adjacentes. Em contraste, há uma via pouco estudada que envolve gentisato (2,5-di-hidrobenzoato). Gentisato é um intermediário na degradação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA), assim como Catecol. Traçando uma correlação dos genes encontrados com a área de estudo, podemos associar essas bactérias com uma possível habilidade para degradar os contaminantes presentes nos manguezais. Esta observação corrobora indicações anteriores, onde se descreve a resistência de Planctomycetes a contaminantes ambientais (FLORES, CATITA e LAGE, 2014). Porém, ainda faltam dados na literatura sobre a relação de Planctomycetes com a degradação de contaminantes, como hidrocarbonetos.

Figura 4.4: Árvore filogenética do gene 16S rRNA, realizada para sequências afiliadas à Planctomycetes depositadas em banco de dados (GenBank) em comparação com os genomas isolados *Rhodopirellula* sp. MGV e *Rhodopirellula baltica* BR-MGV. A metodologia utilizada foi baseada em *Neighbor joining* e valores de confiança baseados em 1.000 *bootstrap*. Foi utilizado *Escherichia coli* como *outgroup*.

4.3.5 Morfologia celular dos isolados estudados

Os dois isolados *Rhodopirellula* sp. MGV (Figura 4.5 a) e *Rhodopirellula baltica* BR-MGV (Figura 4.5 b) foram submetidos a um esfregaço em lâmina com utilização de corante DAPI para a identificação de suas células. O esfregaço mostra para ambos os isolados,

uma morfologia em cocos bem arredondados. Dentro de Planctomycetes, em diferentes morfotipos e em diferentes gêneros bacterianos, a forma celular varia de esférica a oval, elipsoidal ou gota (FUERST, 1995). As células da espécie *Rhodopirellula baltica* SH1^T são em forma de pêra dividem-se de maneira semelhante a um brotamento. As células adultas são não móveis, exibem uma organização de células polares e são conhecidas por se ligarem a superfícies e formar agregados, possibilitadas por uma substância aderente que é secretada a partir do polo celular vegetativo (WEGNER et al., 2013; GADE et al., 2005). Já os representantes do gênero *Planctomicrobium* possuem as células em formação de roseta e não são pigmentadas (KULICHEVSKAYA et al., 2015).

Figura 4.5: Formas de agrupamentos das células de Planctomycetes. **A)** *Rhodopirellula* sp. MGV; **B)** *Rhodopirellula baltica* BR-MGV.

4.3.6 Perfil metabólico dos isolados em estudo

No estudo do perfil metabólico do isolado *Rhodopirellula* sp. MGV foi demonstrada sua capacidade de metabolizar 30 das 31 fontes de carbono avaliadas, com exceção de Tween 80 (Tabela 4.3). Entre as fontes C utilizadas, ácido Y-hidroxi-butírico; Tween 40; N-acetil-D-glucosamine; D-cellobiose e B-methyl-D-glucosidade foram as primordialmente utilizadas, resultando em maiores valores de absorbância.

Já o perfil metabólico do isolado *Rhodopirellula baltica* BR-MGV demonstrou sua capacidade de metabolizar 22 de 31 fontes de carbono s, com exceção de L-arginine, L-asparagine, Tween 40, Tween 80, L-serine, L-threonine, Glycyl-l-glutaminic acid, a-

ketobutiric acid e Putrecine (Tabela 4.3). Entre as fontes de C utilizadas, D-cellobiose, N-acetil-D-glucosamine, B-methyl-D-glucosidade, α -D-lactose e D-xylose resultaram em maiores valores de absorbância.

A maioria das bactérias deste filo apresenta grande versatilidade metabólica, podendo usar diversas fontes de carbono (LAGE, BONDOSO, LOBO-DA-CUNHA, 2013). A maioria dos Planctomycetes são considerados mesofílicos, quimioheterotróficos, e possuem uma parede celular Gram negativa, com característica halotolerante (BUCKLEY et al., 2006; LAGE; BONDOSO; LOBO-DA-CUNHA, 2013).

Tabela 4.3 – Perfil metabólicos dos isolados *Rhodopirellula* sp. MG V e *Rhodopirellula baltica* BR-MGV. Os valores indicam a área calculada para cada absorbância

Fontes de carbono	<i>Rhodopirellula</i> sp. MG V	<i>Rhodopirellula baltica</i> BR-MGV
B-methyl-D-glucosidade	7.429	8.1592
D-galactonic acid	2.069	1.0172
L-arginine	2.2572	0
Pyruvic acid methyl ester	7.384	5.5162
D-xylose	7.0276	6.2878
D-galacturonic acid	5.7994	5.8686
L-asparagine	5.1086	0
Tween 40	10.94	0
i-Erythritol	6.136	4.8742
2-hydroxy benzoic acid	1.6884	1.0522
L-phenylalanine	5.0158	1.5288
Tween 80	0	0
D-mannitol	5.0392	2.4268
4-hydroxy benzoic acid	2.6698	1.2172
L-serine	5.6404	0
α -cyclodextrin	1.1056	3.778
N-acetyl-D-glucosamine	9.4234	8.2066
γ -hydroxybutyric acid	11.1844	3.9992
L-threonine	4.0894	0
Glycogen	5.0158	6.28
D-glucosaminic acid	5.2156	3.5992
Itaconic acid	4.462	1.2396
glycyl-L-glutaminic acid	6.811	0
D-cellobiose	7.5982	10.0738
Glucose-1-phosphate	6.49	4.7074
α -ketobutyric acid	2.4284	0
phenylethylamine	3.6116	2.6922
α -D-Lactose	5.857	7.9624
D,L- α -glycerol phosphate	1.5958	3.0116
D-malic acid	1.0602	5.4068
Putrescine	1.2342	0

Apesar dos isolados *Rhodopirellula* sp. MGV e *Rhodopirellula baltica* BR-MGV apresentarem similaridade taxonômica e na organização dos seus genomas [mesmo número de conteúdo G+C de 55.3%, terem uma pequena diferença no número de CDS e do tamanho de seus genomas (ver Tabela 4.2)], podemos encontrar diferença quanto a sua funcionalidade aferindo ao metabolismo. Ambos utilizam 21 fontes de carbono em comum, e apenas uma fonte de carbono que ambos não utilizam, sendo ela Tween 80. O isolado *Rhodopirellula* sp. MGV utiliza de mais fontes de carbono que o isolado *Rhodopirellula baltica* BR-MGV, sendo elas L-arginine, L-asparagine, Teen 40, L-serine, Glycyl-L-glutaminic acid, a-ketobutyric acid e putrescine. Ou seja, geneticamente e taxonomicamente podemos dizer que essas bactérias são semelhantes, porém funcionalmente, há uma diferença considerável entre elas.

4.3.7 Tolerância dos isolados a salinidade

Considerando a alta salinidade em solos de manguezais, avaliamos o efeito da salinidade na multiplicação dos isolados *Rhodopirellula* sp. MGV (Figura 4.6) e *Rhodopirellula baltica* BR-MGV (Figura 4.7). Os resultados indicaram que os padrões de multiplicação celular dos isolados foram semelhantes entre 1,15 e 2,3% de NaCl, enquanto que no aumento da concentração salina (4,6%) resultou em um atraso no desenvolvimento da cultura do isolado *Rhodopirellula baltica* BR-MGV.

Figura 4.6: Curva de multiplicação celular do isolado *Rhodopirellula* sp. MGV frente à diferentes condições de salinidade.

O isolado *Rhodopirellula baltica* BR-MGV apresentou crescimento semelhante entre as diferentes concentrações salinas obtendo um discreto atraso (fase log) na concentração salina de 4,6%, bem menor que a diferença no atraso do isolado *Rhodopirellula* sp. MGV, podendo-se considerar que as três concentrações salinas tiveram o mesmo perfil.

Figura 4.7: Curva de multiplicação celular do isolado *Rhodopirellula baltica* BR-MGV frente à diferentes condições de salinidade.

A concentração final de bactérias, obtida com 120 h de cultivo, foi semelhante em partes, porém o microrganismo *Rhodopirellula* sp. MGV apresentou uma maior sensibilidade quanto as concentrações salinas com uma diferença na fase log. Já o microrganismo *Rhodopirellula baltica* sp. BR-MGV apresentou uma melhor performance com a concentração salina, apresentando poucas diferenças no crescimento com as diferentes concentrações salinas. Apesar do atraso apresentado por *Rhodopirellula* sp. MGV, podemos considerar ambos halo-dependentes, principalmente por não crescerem na ausência de NaCl.

4.4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste capítulo fornecem o primeiro relato de isolamento de Planctomycetes em manguezais, sendo que os isolados obtidos foram afiliados a *Rhodopirellula*, *Pirellula*, *Blastopirellula* e *Planctomycetes*. Além do forte indício dessas bactérias serem distantes dos Planctomycetes já descritos, devido à presença de clado único composto pela maioria desses isolados. Com a descrição genômica dos dois isolados

Rhodopirellula sp. MGV e *Rhodopirellula baltica* BR-MGV pudemos analisar suas respectivas anotações e a ocorrência de genes envolvidos nas vias de degradação de hidrocarbonetos. Foram encontradas evidências de participação na degradação de HPA, com genes que codificam enzimas transformadoras de moléculas como gentisato e salicilato, que são intermediários principais nas vias de degradação de naftaleno e fenantreno. Os dois isolados possuem semelhanças taxonômicas por serem alocados ao gênero *Rhodopirellula*, o que mostra a ineficácia da metodologia baseada em BOX-PCR para diferenciar isolados pertencentes a Planctomycetes. Além de semelhança morfológica sendo essas bactérias cocos. As diferenças metabólicas, indicadas pela técnica de Biolog, o que nos faz concluir que são microrganismos que estejam realizando processos metabólicos diferentes dentro do mesmo ambiente. Esta análise indicou o microrganismo *Rhodopirellula* sp. MGV com uma maior versatilidade metabólica comparado com o microrganismo *Rhodopirellula baltica* BR-MGV. A semelhança mostrou-se também presente nas análises genéticas, ambos apresentaram-se similares quanto às informações genômicas. E a diferença fisiológica quanto a tolerância salina, o microrganismo *Rhodopirellula baltica* BR-MGV apresentou-se mais adaptado às concentrações salinas, com um tempo de crescimento mais rápido na fase Log que o microrganismo ápido na fase Log que o microrganismo *Rhodopirellula* sp. MGV.

Concluimos que estes microrganismos estão desenvolvendo atividades específicas nesse ecossistema de manguezal até então pouco descritas. Essas atividades podem estar relacionadas a degradação de compostos intermediários (gentisato e salicilato) na rota de degradação de poluentes derivados do petróleo, tornando essas bactérias com características peculiares, importantes na descontaminação destes ambientes.

REFERÊNCIAS

- ANDREOTE, F.D. Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas. Tese (Doutorado), **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba**, São Paulo, 2007.
- BAE, H.; PARK, K.S.; CHUNG, Y.C.; JUNG, J.Y. Distribution of anammox bacteria in domestic WWTPs and their enrichments evaluated by real-time quantitative PCR. **Process Biochemistry**, v.45, p. 323-334, 2010.
- BAULD, J., STALEY, J.T. *Planctomyces maris* sp.nov.: a marine isolate of the *Planctomyces-Blastocaulis* group of budding bacteria. **Journal of Genetic and Microbiology**, v.97, p.45-55, 1976.

- BENGTTSSON, M.M.; OVREAS, L. Planctomycetes dominate biofilms on surfaces of the kelp *Laminaria hyperborea*. **BMC Microbiology**, v.10, p.1-12, 2010.
- BONDOSO, J.; ALBUQUERQUE, L.; NOBRE, M.F.; LOBO-DA-CUNHA, A.; DA COSTA, M.S.; LAGE, O.M. *Roseimaritima ulvae* gen.nov., sp.nov. and *Rubripirellula obstinata* gen.nov.,sp.nov., two novel planctomycetes isolated from the epiphytic community of maroalgae. **Systematic and Applied Microbiology**, p.1-8, 2014.
- BORIN, S.; MAPELLI, F.; ROLLI, E.; SONG, B.; TOBIAS, C.; SCHMID, M.C.; De LANGE, G.J.; SCHOUTEN, S.; JETTEN, M.; DAFFONCHIO, D. Anammox bacterial populations in deep marine hypersaline gradient systems. **Extremophiles**, v.17, p.289-299, 2013.
- BUCKLEY, D.H.; HUANGYUTITHAM, V.; NELSON, T.A.; RUMBERGER, A.; THIES, J.E. Diversity of Planctomycetes in soil in relation to soil history and environmental heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.4522-4531, 2006.
- CHOUARI, R.; PASLIER, D.L.; DAEGELEN, P.; GINESTET, P.; WEISSENBAACH, J.; SGHIR, A. Molecular evidence for novel Planctomycete diversity in a municipal wastewater treatment plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.7354-7363, 2003.
- DIAS, A.C.F.; SILVA, M.C.P.; COTTA, S.R.; DINI-ANDREOTE, F.; SOARES JR, F.L.; SALLES, J.F.; AZEVEDO, J.L.; van ELSAS, J.D.; ANDREOTE, F.D. Abundance and genetic diversity of nifH gene sequences in anthropogenically affected Brazilian mangrove sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p.7960-7967, 2012b.
- ELSHAHEED, M.S.; YOUSSEF, N.H.; LUO, Q.; NAJAR, F.Z.; ROE, B.A.; SISK, T.M.; BÜHRING, S.I.; HINRICHS, K.; KRUMHOLZ, L.R. Phylogenetic and metabolic diversity of Planctomycetes from anaerobic, Sulfide- and Sulfur- Rich Zodletone Spring, Oklahoma. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.4707-4716, 2007.
- FARIA, M.S., Planctomycetes attached to algal surfaces: Insight into their genomes. Dissertação de mestrado (**Faculdade de Ciências da Universidade do Porto**), Porto, Portugal, 2015.
- FLORES, C.; CATITA, J.A.M.; LAGE, O.M. Assessment of Planctomycetes cell viability after pollutants exposure. **Antonie van Leeuwenhoek**, p.399-411, 2014.
- FUERST, J.A. The *Planctomycetes*: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. **Microbiology**, v.141, p. 1493-1506, 1995.

- FUERST, J.A.; GWILLIAM, H.G.; LINDSAY, M.; LICHANSKA, A.; BELCHER, C.; VICKERS, J.E.; HUGENHOLTZ, P. Isolation and molecular identification of planctomycete bacteria from postlarvae of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, 1997.
- GADE, D.; STÜHRMANN, T.; REINHARDT, R.; RABUS, R. Growth phase dependent regulation of protein composition in *Rhodopirellula baltica*. **Environmental Microbiology**, v.7, p.1074–1084, 2005.
- GLÖCKNER, F.O.; KUBE, M.; BAUER, M.; TEELING, H.; LOMBARDOT, T.; LUDWING, W.; GADE, D.; BECK, A.; BORZYM, K.; HEITMANN, K.; RABUS, R.; SCHLESNER, H.; AMANN, R.; REINHARDT, R. Complete genome sequence of the marine Planctomycete *Pirellula* sp. Strain 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.100, p. 8298-8303, 2003.
- GUREVICH, A.; SAVELIEV, V.; VYAHHI, N.; TESLER, N. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v.29, p.1072-1075, 2013.
- HOPPER, D.J.; CHAPMAN, P.J. Gentisic acid and its 3- and 4- Methyl substituted homologues as intermediates in the bacterial degradation of m-Cresol, 3,5-Xylenol, and 2,5-Xylenol. **Biochemistry Journal**, v.122, 1970.
- JENKINS, C.; KEDAR, V.; FUERST, J.A. Gene discovery within the *Planctomycete* division of the domain Bacteria using sequence tags from genomic DNA libraries. **Genome Biology**, v.3, p.1-46, 2002.
- KULICHEVSKAYA, I.S., IVANOVA, A.O.; BELOVA, S.E., BAULINA, O.I., BODELIER, P.L.E., RIJPSTRA, W.I.C., SINNINGHE-DAMSTÉ, J.S., ZAVARZIN, G.A., DEDYSH, S.N. *Schlesneria paludicola* gen.nov., sp.nov., the first acidophilic member of the order *Planctomycetales*, from *Sphagnum*-dominated boreal wetlands. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.2680-2687, 2007.
- KULICHEVSKAYA, I.S., IVANOVA, A.O.; DETKOVA, E.N., RIJPSTRA, W.I.C., SINNINGHE-DAMSTÉ, J.S., DEDYSH, S.N. *Planctomicrobium piriforme* gen.nov., sp.nov., a stalked planctomycete from a littoral wetland of a boreal lake. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.65, p.1656-1665, 2015.
- LAGE, O.M.; BONDOSO, J. Planctomycetes diversity associated with macroalgae. **FEMS Microbiology and Ecology**, v.78, p.366-375, 2011.

- LAGE, O.M.; BONDOSO, J.; VIANA, F. Isolation and characterization of Planctomycetes from the sediments of a fish farm wastewater treatment tank. **Archives of Microbiology**, v.194, p.879-885, 2012.
- LAGE, O.M.; BONDOSO, J.; LOBO-DA-CUNHA, A. Insights into the ultrastructural morphology of novel Planctomycetes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.104, p.467-476, 2013.
- LAGE, O.M. Characterization of a Planctomycete associated with the marine dinoflagellate *Prorocentrum micans* Her. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.104, p.499-508, 2013.
- LAGE, O.M., BONDOSO, J., Planctomycetes and macroalgae, a striking association. **Frontiers of Microbiology**, v.5, 2014.
- LIN, S-H.; LIAO, Y-C. CISA: Contig Integrator for sequence assembly of Bacterial genomes. **Plos One**, 2013.
- LLOPIS, P.M.; JACKSON, A.F.; SLIUSARENKO, O.; SUROVTSEV, I.; HEINRITZ, J.; EMONET, T.; JACOBS-WAGNER, C. Spatial organization of the flow of genetic information in bacteria. **Nature**, v.466, 2010.
- LOMBARDOT, T.; BAUER, M.; TEELING, H.; AMANN, R.; GLÖCKNER, F.O. The transcriptional regulator pool of the marine bacterium *Rhodopirellula baltica* SH1 as revealed by whole genome comparisons. **FEMS Microbiology Letters**, v.242, p.137-145, 2005.
- MARCHESI, J.R.; SATO, T.; WEIGHTMAN, A.J.; MARTIN, T.A.; FRY, J.C.; HIOM, S.J.; DYMOCK, D.; WADE, W.G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.23-33, 1998.
- ROH, S.W.; LEE, H.W.; YIM, K.J.; SHIN, N.; LEE, J.; WHON, T.W.; LIM, N.; KIM, D.; BAE, J.W. *Rhodopirellula rosea* sp., nov. a novel bacterium isolated from an Ark Clam *Scarpharca broughtonii*. **Journal of Microbiology**, v.51, p.301-304, 2013.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p.406-425, 1987.
- SINGLETON, D.R.; POWELL, S. N.; SANGAIAH, R.; GOLD, A.; BALL, L.M.; AITKEN, M.D. Stable-Isotope Probing of Bacteria Capable of Degrading Salicylate, Naphtalene, or Phenantrene in a Bioreactor Treating Contaminated Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.1202-1209, 2005.
- SLIEKERS, A.O.; THIRD, K.; ABMA, W.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. CANON and Anammox in a gas-lift reactor. **FEMS Microbiology Letters**, p.339-344, 2003.

- SOARES-JUNIOR, F.L. Isolamento e Caracterização de bactérias celulolíticas de ambientes extremos. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – **Universidade de Mogi das Cruzes**, 58f., 2011.
- STUDHOLME, D.J.; JACKSON, R.A.; LEAK, D.J. Phylogenetic analysis of transformable strains of thermophilic *Bacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v.172, p.85-90, 1999.
- TACÃO, M.; ALVES, A.; SAAVEDRA, M.J.; CORREIA, A. BOX-PCR is an adequate tool for typing *Aeromonas* spp. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.88, p.171-179, 2005.
- 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**, v.97, p.401-411, 2010.
- TEELING, H.; LOMBARDOT, T.; BAUER, M.; LUDWING, W.; GLÖCKNER, F.O., Evaluation of the phylogenetic position of the *Planctomycete* ‘*Rhodopirellula baltica*’ SH1 by means of concatenated ribosomal protein sequences, DNA-directed RNA polymerase subunit sequences and whole genome trees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.24, p.791-801, 2004.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Multiple sequence Alignment Using ClustalW and ClustalX. **Current protocols in Bioinformatics**, 2003.
- 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**, 2013.
- WEGNER, C-E.; RICHTER-HEITMANN, T.; KLINDWORTH, A.; KLOCKOW, C.; RICHTER, M.; ACHSTETTER, T.; GLÖCKNER, F.O.; HARDER, J. Expression of sulfatases in *Rhodopirellula baltica* and the diversity of sulfatases in the genus *Rhodopirellula*. **Marine Genomics**, v.9, p.51-61, 2013.
- WOEBKEN, D.; TEELING, H.; WECKER, P.; DUMITRIU, A.; KOSTADINOV, I.; DELONG, E.F.; AMANN, R.; GLOCKNER, F.O. Fosmids of novel marine Planctomycetes from the Namibian and Oregon coast upwelling systems and their cross-comparison with Planctomycete genomes. **The ISME Journal**, v.1, p.419-435, 2007.
- YOON, J.; MATSUO, Y.; KASAI, H.; LEE, M.K. Phylogenetic and taxonomic analyses of *Rhodopirellula caenicola* Sp. Nov., a new marine Planctomycetes species isolated from Iron Sand. **Phylogenetics and Evolutionary Biology**, v.3, p.1-4, 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabela 1 - Descrição dos componentes para os meios de cultura utilizados (continua)

Tabela de produtos utilizados no meio de cultura	
M13	M14
0,250g/L Peptona	1,0 g/L Extrato de levedura
0,250g/L Extrato de levedura	1,0 g/L Glucose
0,250g/L Glucose	10 mL solução de vitaminas
10 mL de solução de vitaminas	20 mL Solução de sais – Hunter's salts
20 mL de Solução de sais – Hunter's basal	
5 mL de TRIS-HCl (solução)	5 mL de TRIS-HCl (solução)
Ágar – 15 g/L	Ágar – 15 g/L
Água do mar esterilizada 940 mL	Água do mar esterilizada 940 mL
Antibióticos	
Ampicilina 200µg/mL	Ampicilina 200µg/mL
Estreptomicina 500µg/mL	Estreptomicina 500µg/mL
Ciclohexamida 20 µg/mL	Ciclohexamida 20 µg/mL
Benomyl 1 µL/L	Benomyl 1 µL/L
Vitaminas	Concentração (Solução estoque 500mL)
Cobalamina (Vitamina B12)	0,025g
Biotina	0,500g
Thiamina-HCl.2H ₂ O	1,25g
Ca-Pantothenato (Vitamina B5)	1,25g
Ácido Fólico (Vitamina B9)	0,500g
Riboflavina (Vitamina B2)	1,25g
Nicotinamida	1,25g
Água destilada	500mL
Metais 44	Concentração
Na ₂ EDTA	250 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,095 mg/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	500 mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	39,2 mg/L
MnSO ₄ .H ₂ O	154,0 mg/L
CO(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	24,8 mg/L

Tabela 1 - Descrição dos componentes para o meio de cultura utilizados (continuação)

Tabela de produtos utilizados no meio de cultura	
Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	12,7 mg/L
Hutner's salts	Concentração (Solução estoque 500mL)
Ácido nitrilotriacético	5.000g
MgSO ₄ .7H ₂ O	14.850g
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.675g
(NH ₄) ₆ MoO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	4.625mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	49,5mg
Metais 44	25mL
Água destilada	475 mL

5 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE PLANCTOMYCETES NA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS

RESUMO

O filo Planctomycetes compreende um grupo de bactérias com características peculiares, já descritas como cultivadas a partir de ambientes marinhos, encontradas em associações com esponjas, crustáceos e macroalgas. Os genomas já descritos de bactérias deste grupo possuem tamanho entre 5 e 9 Mb. No presente estudo, foi avaliada uma coleção de isolados de Planctomycetes obtidos de solos de manguezais, com diferentes níveis de contaminação, quanto a capacidade em degradar quatro diferentes hidrocarbonetos (hexadecano, naftaleno, fenol e fenantreno). Cinco isolados (*Blastopirellula cremea* Hex-1 MG, *Blastopirellula marina* Nap-Phe MG, *Blastopirellula cremea* Hex-2 MG, *Blastopirellula cremea* HEX PRIS-MG e *Blastopirellula marina* Nap PRIS-MG) apresentaram capacidade de metabolizar ao menos um desses contaminantes, sendo o genoma destes isolados posteriormente estudados. Os tamanhos dos genomas variaram entre 6.2 Mb e 7.7 Mb, com número de CDs entre 5.340 e 6.428. A anotação destes genomas indicou a presença de genes envolvidos nas vias de degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), como genes promotores da degradação do salicilato e gentisato, além de genes codificadores de monooxigenases e dioxigenases e síntese do citocromo P450. Também foram avaliadas as ocorrências de sistemas de síntese de metabólitos secundários, o que indicou a ocorrência de sistemas de produção de terpenos, bacteriocina, resorcinol, ectoína, compostos possivelmente envolvidos na associação destes organismos com outros. Estes dados comprovam indicações encontradas nos capítulos anteriores desta tese, ligando diretamente organismos deste grupo com o processo de degradação de hidrocarbonetos em solos de manguezais.

Palavras-chave: Xenobióticos; Metabólitos secundários; Genes codificantes de proteínas

ABSTRACT

The Planctomycetes phylum comprises a group of bacteria with peculiar characteristics, already described as cultivated from marine environments, found in associations with sponges, crustaceans and macroalgae. In the present study, a collection of Planctomycetes isolates obtained from mangrove soils with different levels of contamination were evaluated for the ability to degrade four different hydrocarbons (hexadecane, naphthalene, phenol and phenanthrene). Five isolates (*Blastopirellula cremea* Hex-1 MG, *Blastopirellula marina* Nap-Phe MG, *Blastopirellula cremea* Hex-2 MG, *Blastopirellula cremea* HEX PRIS-MG and *Blastopirellula marina* Nap PRIS-MG) were able to metabolize at least one of these contaminants, genome of these isolates subsequently studied. The sizes of the genomes varied between 6.2 Mb and 7.7 Mb, with number of CDs between

5.340 and 6.428. The annotation of these genomes indicated the presence of genes involved in degradation pathways of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), as genes that promote the degradation of salicylate and gentisate, as well as genes encoding monooxygenases and dioxygenases and synthesis of cytochrome P450. The occurrence of secondary metabolites synthesis systems was also evaluated, indicating the occurrence of terpene, bacteriocin, resorcinol and ectoine production systems, compounds possibly involved in the association of these organisms with others. These data confirm the findings found in previous chapters of this thesis, linking directly organisms of this group with the process of hydrocarbon degradation in mangrove soils.

Keywords: Xenobiotics; Secondary metabolites; Genes encoding proteins

5.1 INTRODUÇÃO

Planctomycetes é um filo bacteriano o qual compreende poucas espécies cultiváveis e um largo número de sequências de RNA ribossomal, oriundos de Planctomycetes não cultiváveis (ELCHENINOV et al., 2017). Seus representantes cultiváveis são frequentemente isolados de ecossistemas marinhos, nesses encontrados em associações com macroalgas (IVANOVA et al., 2017; BENGTSSON et al., 2010; BENGTOSSON & OVREAS 2010; BONDOSO et al., 2014; LAGE & BONDOSO, 2014), além de ambientes extremos, como o isolamento da espécie *Thermogutta terrifontis*, obtido de uma fonte termal (ELCHENINOV et al., 2017). Estas bactérias ocorrem muitas vezes associadas à microrganismos fototróficos aquáticos, como diatomáceas e cianobactérias (JESKE et al., 2016). Há também relatos de sua ocorrência em sistemas de águas doces (SCHLESNER, 1994).

Ambientes marinhos são fontes de compostos bioativos, esses compostos são derivados de esponjas e macroalgas associados aos seus microbiomas. Em diversos destes ambientes, grupos pertencentes a Plancomycetes tem sido descritos em alta frequência (VAN NIFTRIK & DEVOS, 2017). Têm sido reportados *clusters* de genes para metabólitos secundários em artigos publicados de Planctomycetes (JESKE et al., 2016).

Ao passo que atuam de forma importante na síntese de compostos bioativos, os ambientes marinhos são vítimas de contaminações, dentre as quais se destacam as promovidas por acidentes de derramamento de petróleo. Durante a exploração, produção, refinamento e transporte de petróleo, diversos acidentes já foram relatados. A biorremediação tem um grande potencial de atuar na restauração dos locais contaminados. O uso de microrganismos naturais é o primeiro mecanismo pelo qual os hidrocarbonetos podem ser eliminados de locais contaminados (MNIF, CHAMKHA & SAYADI, 2009). Um ponto importante para o estudo da biodegradação reside no seu papel no ciclo do carbono e impacto direto na biorremediação

de ecossistemas poluídos. Muitas enzimas envolvidas nas vias de degradação são consideradas os principais catalisadores do processo (SIERRA-GARCÍA & OLIVEIRA, 2013), e a síntese das mesmas é comumente realizada de forma orquestrada por diversos organismos presentes no ambiente contaminado.

Os manguezais são ecossistemas intermareais, encontrados ao longo das costas das regiões tropicais e subtropicais. Eles constituem viveiros importantes para crustáceos e aves (BRITO et al., 2006). Os manguezais, por receberem influência das marés, recebem também contaminação vinda dos oceanos. No entanto, embora os ecossistemas de manguezais tenham sido amplamente estudados, poucos estudos se concentraram na capacidade de biodegradação de derivados de petróleo pela comunidade microbiana residente. A degradação destes produtos é realizada principalmente por microrganismos, sendo esta capacidade alvo de crescente interesse na busca de alternativas para desintoxicar as quantidades crescentes de compostos aromáticos que entram no ambiente (DÍAZ et al., 2001). Segundo Taketani e colaboradores (2010), as comunidades microbianas nos sedimentos de manguezais com diferentes características químicas e históricas, respondem diferentemente à perturbação de um derramamento de hidrocarbonetos. Estes autores demonstraram que a comunidade bacteriana presente no manguezal previamente exposto ao óleo poderia ter sido condicionada pela exposição prévia a hidrocarbonetos nesse sedimento, incluindo a pré-seleção de possíveis populações minoritárias capazes de responder rapidamente à adição de óleo. Taketani e colaboradores (2009) também aferiram a degradação de hidrocarbonetos nos manguezais com diferentes níveis de contaminação, demonstrando que a biodegradação eficiente provavelmente ocorreu. No entanto, o mesocosmo de manguezal poluído revelou uma degradação mais rápida do óleo quando comparado com o mesocosmo intocado.

Neste capítulo, reportamos a habilidade de isolados pertencentes ao filo Planctomycetes em degradar hidrocarbonetos presentes no petróleo. A partir daí, foi realizado um estudo detalhado de cinco genomas dos isolados selecionados, onde foram encontrados genes que codificam proteínas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como monooxigenase, citocromo P450, e dioxigenases. Reportamos também a presença de metabólitos secundários como bacteriocina, terpenos, resorcinol, ectoína que são de grande interesse em biotecnologia e indústria farmacêutica.

5.2 MATERIAL e MÉTODOS

5.2.1 Triagem do desenvolvimento microbiano em meios com hidrocarbonetos

A coleção de isolados apresentada no capítulo 4, foram utilizados a biblioteca de isolados de Planctomycetes para esta avaliação. Estes isolados foram analisados quanto à sua capacidade de tolerância em meios de cultivo com hidrocarbonetos como única fonte de carbono. Essa triagem foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Gomes et al., (2016), validada por Gonzales-Limache (2015). Os isolados foram inicialmente cultivados em meio de cultivo específico para Planctomycetes (LAGE, BONDOSO & VIANA, 2014) e depois transferidos para placas de Elisa de 96 poços, contendo 150 µL de meio de cultivo BH (BUSHNELL & HASS, 1940), contendo os seguintes hidrocarbonetos como única fonte de carbono: Hexadecano (1%) (VASCONCELLOS et al., 2010), Fenol (0,02%) (KAFILZADEN et al., 2010), naftaleno (0,01%) ou fenantreno (0,01%) (ZHOU et al., 2008). Foram adicionadas alíquotas de 10 µL de suspensões celulares dos isolados a serem avaliados (aprox. 10^7 células), sendo utilizado como controle positivo o isolado *Pseudomonas putida* CBMAI 994. Após 48 horas de incubação a 30°C e 15 rpm, a detecção dos isolados positivos para a degradação dos hidrocarbonetos foi realizada pelo método colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)- 2,5- difeniltetrazolium brometo) (JOHNSEN et al., 2002). Este método se baseia na respiração bacteriana (células vivas), sendo o corante sintético amarelo MTT adicionado aos cultivos, o qual em contato com células metabolicamente ativas dá origem a formazano, um composto de coloração violeta. Para esta observação, em cada poço da placa de cultivo foram adicionados 30 µl de MTT 1%, as quais foram incubação por 1 hora a 30 °C.

5.2.2 Análises moleculares dos isolados positivos no teste de degradação

Os isolados que apresentaram capacidade de utilizar os hidrocarbonetos como fonte de carbono foram submetidos à identificação taxonômica e selecionados para a análise genômica. Para isto, foram realizadas Extração de DNA com kit apropriado (*Wizard® Genomic DNA Purification Kit*), e este foi utilizado para a realização de PCRs, no intuito de amplificar o gene ribossomal 16S, seguindo as metodologias realizadas no capítulo 4.

5.2.3 Análises filogenéticas

As sequências afiliadas a Planctomycetes foram comparadas às sequências de Planctomycetes descritos, obtidas nas bases de dados do GenBank e RDP, a partir do número de acesso citado nos artigos consultados (WOEBKEN et al., 2007; BAE et al., 2010; BORIN et al., 2013). A árvore filogenética foi construída com auxílio do programa MEGA 6

(*Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0*) com base no alinhamento realizado pelo ClustalW (THOMPSON, GIBSON & HIGGINS et al., 2002), posteriormente agrupada pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987). A consistência da estrutura da árvore foi determinada pela análise de *bootstrap*, feita com base em 1.000 sub-amostragens na matriz de distância. Sequências distantemente relacionadas à Planctomycetes, como sequências identificadas como *Escherichia coli*, foram utilizadas como *out-group* nesta inferência sobre filogenia.

5.2.4 Sequenciamento de genomas por meio da metodologia Illumina MiSeq

Os isolados afiliados ao grupo Planctomycetes que apresentaram-se positivos quanto a utilização de hidrocarbonetos como fontes de carbono (4.2.1) foram caracterizados genomicamente. Para isto, cultivos destes organismos foram utilizados para extração de DNA, e o material obtido foi submetido a análise genômica por meio da plataforma de sequenciamento *Illumina MiSeq Technology* com o *Kit Mid-output* (2x150) pb. Este serviço foi contratado junto ao Laboratório Multiusuários Centralizado Genômica Funcional Aplicada à Agropecuária e Agroenergia, no CENA-USP, Piracicaba, SP.

5.2.5 Tratamento das sequências e montagem dos *contigs*

As sequências obtidas foram analisadas na plataforma Galaxy (<https://usegalaxy.org/>), onde foram usadas as ferramentas de *Trimmomatic* para cortar as sequências tamanhos menores que 100 pb e a ferramenta *Trim Galore*, quando foram retirados iniciadores de sequenciamentos Illumina (usado parâmetro *default*). Em seguida os *contigs* foram montados utilizando o programa Spades 3.7-Linux com duas montagens com diferentes tamanhos de K-mer, o primeiro 21,33,55,77 e a segunda montagem k-mer: 21,33,55,77,99,127. Após a montagem foi realizada uma verificação da qualidade desta, com o programa Quast 2.3 (GUREVICH et al., 2013). Em seguida, realizada a concatenação das duas montagens de diferentes k-mer utilizando Cisa 1.3 (LIN & LIAO, 2013) afim de aferir o melhor resultado. A anotação dos *contigs* gerados foram realizadas por Patric (<http://www.brc.org/>) e RAST (<http://rast.nmpdr.org/>). As sequências dos genomas foram depositadas no banco de dados online DDBJ/ENA/GenBank.

Para busca refinada de enzimas e genes que participem de alguma via na degradação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram realizadas anotações nos bancos de dados Rast, Patric e NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Após busca dos genes,

as sequências eram comparadas quanto suas funções no banco de dados Pfam (*Protein Families Database*).

Os *contigs* também foram anotados na plataforma de detecção de metabolismos secundários *Anti-Smash bacterial version* para uma rápida identificação, anotação e análise do genoma de *clusters* de genes de biossíntese de metabólitos secundários em genomas bacterianos e fúngicos. Parâmetros utilizados foram os parâmetros do site (default).

5.2.6 Análise filogenética dos genes codificadores das proteínas envolvidas nas vias de degradação de hidrocarbonetos

As sequências dos genes que codificam proteínas envolvidos nas vias de degradação de hidrocarbonetos foram comparadas com as sequências disponíveis em banco de dados utilizando Blastx (NCBI), processadas no Mega 6.0 (*Biodesign Institute*), traduzidas e suas sequências de aminoácidos foram alinhadas usando ClustalW (THOMPSON, GIBSON & HIGGINS et al., 2002). Foi utilizado o método *Neighbor-joining* com 1000 replicatas, utilizando o modelo Jones-Taylor-Thornton (JTT) (OLSEN et al., 1994).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Planctomycetes tolerantes a hidrocarbonetos

Dos 39 isolados submetidos ao teste de tolerância a hidrocarbonetos, 5 mostraram-se capazes de utilizar ao menos um hidrocarboneto dentre hexadecano, naftaleno e fenol (Figura 5.1). O hidrocarboneto fenantreno foi o único no teste que não foi utilizado por nenhum dos isolados avaliados. Já o isolado 23.2 utilizou dois hidrocarbonetos, naftaleno e fenol. Os isolados tolerantes foram selecionados para o estudo de genômica (Tabela 5.1).

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) encontrados no petróleo podem entrar no meio ambiente através de atividades humanas e naturais e são considerados contaminantes ambientais (GOMES et al., 2016; JOHNSEN et al., 2005). Em ambientes naturais, o baixo peso molecular dos HPAs (consistem de 2 a 3 anéis aromáticos) faz com que estes sejam fáceis de degradar, enquanto que compostos com altos pesos moleculares (consistem em 4 ou mais anéis aromáticos) são mais persistentes.

Figura 5.1: Ensaio de tolerância dos isolados de Planctomycetes em quatro diferentes hidrocarbonetos. Os poços da placa com coloração amarela mostram corante MTT sem resultado positivo para respiração celular. Já os poços com coloração violeta mostram a reação do corante MTT adicionado aos cultivos, o qual em contato com células metabolicamente ativas dá origem a formazano, um composto de coloração violeta.

O contaminante hexadecano é um alcano de cadeia longa (16 carbonos) e são praticamente insolúveis em água, se caracterizam por possuir apenas átomos de carbono e hidrogênio em suas moléculas e ter cadeia saturada e são hidrocarbonetos alifáticos (linear)

(BOUCHEZ-NAÏTALI et al., 1999). Segundo NIE e colaboradores (2016), os alcanos são considerados a família mais abundante de hidrocarbonetos em petróleo bruto. Até agora, vários microrganismos como *Alcannivorax*, *Thalassolituus*, *Oleiphilus*, *Oleispira*, *Marinobacter*, *Bacillus*, *Geobacillus*, são reportados como capazes de degradar hidrocarbonetos e HPAs de óleo contaminado. Além disso, *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria onipresente que pode ser isolada de ambientes contaminados por hidrocarbonetos e pode consumir uma ampla gama de alcanos.

O naftaleno, juntamente com o fenantreno, estão alocados no grupo dos HPAs com baixo peso molecular, pois apresentam dois e três anéis benzênicos, respectivamente (ZHOU et al., 2008). O naftaleno é relativamente mais solúvel e menos hidrófobo do que outros HPAs de alto peso molecular, o que aumenta a questão crítica da biodisponibilidade (JING et al., 2014).

O fenol é um composto que possui apenas um anel aromático, porém são extremamente tóxicos e são encontrados em diferentes formas, isolados ou junto de outros elementos (KAFILZADEH et al., 2010). Os fenóis provêm de vários tipos de indústrias, como refinarias de carvão, produtos farmacêuticos de fabricação de fenol, fábricas de papel, tintas, corantes, produtos petroquímicos e têxteis (KUMAR et al., 2005). Muitas bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Geobacter*, bem como algumas espécies de fungos que pertencem a *Aspergillus*, *Trichosporon* ou *Candida* são conhecidos por degradar o fenol (SATCHANSKA et al., 2015). Enquanto algumas algas têm baixa tolerância à toxicidade aguda dos fenóis, outros organismos, como cianobactérias e microalgas eucarióticas (por exemplo, *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Selenastrum capricornutum*, *Tetraselmis marina*, *Ochromonas danica*, *Lyngbya gracilis*, *Nostoc punctiforme*, *Oscillatoria animalis*, *Phormidium foveolamm*) são capazes de biotransformar compostos fenólicos (PRIYADHARSHINI & BAKTHAVATSALAM, 2016).

5.3.2 Afiliação filogenética e taxonômica dos Planctomycetes capazes de tolerar hidrocarbonetos

Os cinco isolados com resultados positivos no teste de tolerância foram submetidos a uma análise filogenética com base no 16S rDNA. Os cinco representantes do filo Planctomycetes se afiliaram ao gênero *Blastopirellula* (Figura 5.2). O gênero *Blastopirellula* possui dois representantes descritos, *Blastopirellula marina* e *Blastopirellula cremea*. A espécie *Blastopirellula marina* que é uma renomeação do gênero *Pirellula marina*, devido à

grande diversidade nos níveis genético e fenotípico encontrados neste grupo de organismos. Os novos isolados foram obtidos de uma diversidade de habitats aquáticos, incluindo água doce, salobra e marinha (SCHLESNER et al., 2004). Já o segundo representante do gênero *Blastopirellula* foi isolado de uma arca de moluscos mortos da espécie *Scapharca broughtonii*, coletado de uma fazenda com arcas de moluscos, na região do litoral do Sul da Coreia, denominado *Blastopirellula cremea*, considerado uma nova espécie devido a diferença nas pigmentações das colônias, condições de crescimento e produção de ácidos a partir de substratos (LEE et al., 2013).

Figura 5.2: Árvore filogenética dos genomas sequenciados comparados com Planctomycetes descritos. Foi realizada pelo método *Neighbor-joining* baseado nas sequências do gene 16S rDNA com consistência da estrutura determinada pela análise de *bootstrap* feita com base em 1.000 sub-amostragens. Foi usado o microrganismo *E. coli* como *outgroup*.

Tabela 5.1 - Descrição dos isolados positivos no teste de tolerância a hidrocarbonetos

Isolado	Área	Hidrocarboneto
21.1	Pool - Bertioga	Hexadecano
23.2	Pool - Bertioga	Naftaleno e Fenol
27.1	Pool - Bertioga	Hexadecano
Cananéia 03	Cananéia	Hexadecano
Cananéia 39	Cananéia	Naftaleno

No estudo realizado, foi possível observar que todos pertencem ao gênero *Blastopirellula*, sendo 3 mais similares a *B. cremea* e 2 próximos de *B. marina*, sendo todas as afiliações suportadas por valores de *bootstrap* de 100%. Os isolados foram nomeados conforme análise de 16S, e conforme a fonte de hidrocarbonetos que degradam conforme Tabela 5.2.

Em ecossistemas marinhos, Planctomycetes são numericamente representados e possuem uma importante funcionalidade na formação microbiana de biofilmes de macro-algas (IVANOVA et al., 2017; BENGTTSSON et al., 2010; BENGTTSSON & OVREAS, 2010; BONDOSO et al., 2014; BONDOSO et al., 2017; LAGE & BONDOSO, 2014). Essas associações entre Planctomycetes e algas são principalmente representadas por membros de linhagem filogeneticamente definidas pelos gêneros *Pirellula*, *Rhodopirellula*, *Blastopirellula*, *Rubripirellula* e *Roseimaritima* (IVANOVA et al., 2017). Algumas dessas bactérias, incluindo *Blastopirellula* e *Rhodopirellula* são mais frequentemente encontrados em ambientes marinhos e representam uma importante parte de uma complexa comunidade microbiana em biofilmes de uma ampla gama de macroalgas (RAVIN et al., 2018).

Tabela 5.2 - Anotação dos genomas no banco de dados DDJ/ENA/GenBank

Isolado	Nomeação	Número de acesso GenBank
21.1	<i>Blastopirellula cremea</i> Hex-1 MGV	QPEV000000000
23.2	<i>Blastopirellula marina</i> Nap-PH MGV	PUHZ000000000
27.1	<i>Blastopirellula cremea</i> Hex-2 MGV	QPEW000000000
Cananéia 03	<i>Blastopirellula cremea</i> Hex Pris-MGV	QPEX000000000
Cananéia 39	<i>Blastopirellula marina</i> Nap Pris-MGV	PUIB000000000

5.3.3 Propriedades genômicas dos isolados estudados

Os genomas sequenciados apresentam as propriedades genômicas relatadas (Tabela 5.3) 7.1 Mb, conteúdo C+G 53.8, número de *contigs* 16 e 6.141 cds para *Blastopirellula cremea* Hex-1 MGv (Figura 5.4); 7.6 Mb, conteúdo C+G 58.6, número de *contigs* 26 e 6.389 cds para *Blastopirellula marina* NAP-PH MGv (Figura 5.5); 6.6 Mb, conteúdo C+G 55.4, número de *contigs* 95 e 5.518 cds para *Blastopirellula cremea* HEX-2 MGv (Figura 5.6); 6.2 Mb, conteúdo C+G 54.0, número de *contigs* 47 e 5.340 cds para *Blastopirellula cremea* HEX PRIS-MGv (Figura 5.7); 7.7 MB, conteúdo C+G 57.0, número de *contigs* 32 e 6.428 cds para *Blastopirellula marina* NAP PRIS-MGv (Figura 5.8). O tamanho do genoma em procariotos possui uma correlação linear com a capacidade de codificar metabólitos secundários (IVANOVA et al., 2017; DONATIO et al., 2007; JESKE et al., 2013). *Rhodopirellula baltica* SH1T foi o primeiro genoma sequenciado pertencente ao filo Planctomycetes (GLOCKNER et al., 2003). Desde então, o sequenciamento de outros genomas de Planctomycetes abriu um vasto leque de possibilidades para entender melhor estas bactérias (FARIA et al., 2017). O acidófilo moderado *Singulisphaera acidiphila* (KULICHEVSKAYA et al., 2008) e o Planctomycetes *Zavarzinella formosa* (KULICHEVSKAYA et al., 2009), semelhante a *Gemmata*, compreendem os maiores genomas (9.76 e 9.86 MB de acordo com NCBI, respectivamente) (GUO et al., 2012), enquanto o genoma de *Phycisphaera mikurensis*, um membro da classe recentemente proposta Phycisphaerae, possui o menor genoma (3.88 MB) (FUKUNAGA et al., 2009; JESKE et al., 2013). O tamanho médio dos genomas de representantes do filo Planctomycetes é de 6.9 Mb, sendo um tamanho consideravelmente grande, aparecem como alvos tentadores para abordagem da descoberta de drogas e metabólitos secundários (JESKE et al., 2013).

Tabela 5.3 - Estatísticas genômicas dos Planctomycetes em estudo

	<i>Blastopirellula cremea Hex-1 MGV</i>	<i>Blastopirellula marina NAP- PH MGV</i>	<i>Blastopirellula cremea Hex-2 MGV</i>	<i>Blastopirellula cremea Hex Pris-MGV</i>	<i>Blastopirellula marina Nap Pris-MGV</i>
Tamanho do genoma (Mb)	7,124,707	7,651,087	6,638,894	6,288,633	7,743,453
Conteúdo CG (%)	53.8	58.6	55.4	54.0	57.0
CDS	6.141	6.389	5.518	5.340	6.428
Número de <i>Contigs</i>	16	26	95	47	32
Número de RNAs	73	86	72	69	85

Na Figura 5.3 podemos observar a diferença na anotação de funções entre os 5 genomas, classificando as funções e subsistemas presentes no servidor Rast. Os subsistemas que apresentaram maiores valores são os grupos de Aminoácidos e Derivados, seguidos do grupo de Carboidratos e Metabolismo Proteico como os três mais relevantes. Os isolados *Blastopirellula cremea Hex-1 MGV*, *Blastopirellula cremea Hex-2 MGV* e *Blastopirellula cremea Hex PRIS-MGV* apresentaram maiores valores para Aminoácidos e Derivados. Já *Blastopirellula marina Nap-Phe MGV* e *Blastopirellula marina Nap PRIS-MGV* apresentaram maiores valores para Metabolismo Proteico.

Figura 5.3: Diferença entre os genomas comparados quanto a funcionalidade de subsistemas presentes no programa Rast.

Como esse filo é considerado versátil e capaz de utilizar diferentes fontes de carbono (GLÖCHNER et al., 2003), a Figura 5.3 corrobora com a afirmação apresentando-se elevadas seqüências para as funções relacionadas aos Carboidratos. Já o foco desse capítulo é o envolvimento dessas bactérias na degradação de hidrocarbonetos derivados do petróleo, e as seqüências relacionadas ao Metabolismo de Compostos Aromáticos apresentam-se baixas, porém são existentes.

Figura 5.4: Genoma circular de *Blastopirellula cremea* HEX-1 MG. O primeiro anel (de fora para dentro) representa o tamanho geral do genoma, seguido dos dois anéis que representam as CDS. O quarto anel em diferentes cores representam os *contigs* e os quinto e sexto anéis representam o Conteúdo C+G *Plot* e *Skew* respectivamente. Desenho realizado pelo programa DNA Plotter (CARVER et al., 2008).

Figura 5.5: Genoma circular de *Blastopirellula marina* NAP-PH MGV. O primeiro anel (de fora para dentro) representa o tamanho geral do genoma, seguido dos dois anéis que representam as CDS. O quarto anel em diferentes cores representam os *contigs* e os quinto e sexto anéis representam o Conteúdo C+G *Plot* e *Skew* respectivamente. Desenho realizado pelo programa DNA Plotter (CARVER et al., 2008).

Figura 5.6: Genoma circular de *Blastopirellula cremea* HEX-2. O primeiro anel (de fora para dentro) representa o tamanho geral do genoma, seguido dos dois anéis que representam as CDS. O quarto anel em diferentes cores representam os *contigs* e os quinto e sexto anéis representam o Conteúdo C+G *Plot* e *Skew* respectivamente. Desenho realizado pelo programa DNA Plotter (CARVER et al., 2008).

Figura 5.7: Genoma circular de *Blastopirellula cremea* HEX PRIS-MGV. O primeiro anel (de fora para dentro) representa o tamanho geral do genoma, seguido dos dois anéis que representam as CDS. O quarto anel em diferentes cores representam os *contigs* e os quinto e sexto anéis representam o Conteúdo C+G *Plot* e *Skew* respectivamente. Desenho realizado pelo programa DNA Plotter (CARVER et al., 2008).

Figura 5.8: Genoma circular de *Blastopirellula marina* NAP PRIS-MGV. O primeiro anel (de fora para dentro) representa o tamanho geral do genoma, seguido dos dois anéis que representam as CDS. O quarto anel em diferentes cores representam os *contigs* e os quinto e sexto anéis representam o Conteúdo C+G *Plot* e *Skew* respectivamente. Desenho realizado pelo programa DNA Plotter (CARVER et al., 2008).

5.3.4 Anotação de funções relacionadas a degradação de hidrocarbonetos pela plataforma Rast

As anotações das sequências dos 5 genomas revelaram genes codificadores de proteínas com funções relacionadas ao Metabolismo de Compostos Aromáticos, abrangendo as vias periféricas e intermediários de catabolismo de compostos aromáticos (Tabela 5.4). Até

o momento não há nenhum relato em artigos publicados sobre a participação de Planctomycetes nessas vias de degradação.

O genoma de *Blastopirellula cremea* HEX-1 MGv apresentou uma ocorrência de funções presentes no programa Rast, um subsistema funcional com um *hit* na via central do catabolismo para degradação de compostos aromáticos de salicilato e gentisato. O representante de *Blastopirellula marina* Nap-Ph MGv apresentou uma Contagem de Recursos do Subsistema do programa Rast, um subsistema funcional com dois *hits* na degradação de gentisato. O genoma *Blastopirellula cremea* Hex-2 MGv apresentou uma Contagem de Recursos do Subsistema do programa Rast, quatro *hits* envolvidos na degradação de gentisato. Já *Blastopirellula cremea* Hex PRIS-MGV e *Blastopirellula marina* Nap PRIS-MGV apresentaram uma Contagem de ocorrência de funções do programa Rast, um subsistema funcional com um *hit* para degradação de éster salicilato e dois *hits* na degradação de gentisato cada.

Tabela 5.4 - Contagem de ocorrência de funções: Metabolismo de Compostos Aromáticos, no programa RAST, apresentando *hits* envolvidos no catabolismo de salicilato e gentisato.

Metabolismo de Compostos Aromáticos	<i>Blastopirellula cremea</i> Hex-1 MGV	<i>Blastopirellula marina</i> Nap- PH MGv	<i>Blastopirellula cremea</i> Hex-2 MGV	<i>Blastopirellula cremea</i> Hex Pris-MGV	<i>Blastopirellula marina</i> Nap Pris-MGV
Degradação de éster salicilato	1 <i>hit</i>	-	-	1 <i>hit</i>	1 <i>hit</i>
Degradação de gentisato	1 <i>hit</i>	2 <i>hits</i>	4 <i>hits</i>	2 <i>hits</i>	2 <i>hits</i>

O salicilato é um intermediário bem conhecido na degradação de naftaleno, fenantreno e antraceno, gerado ao longo da decomposição destes materiais por meio da atividade de degradadores de HPAs. O salicilato é ainda metabolizado, formando catecol ou gentisato, em intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico. A maioria dos degradadores de HPAs Gram-negativos expressam caminhos catabólicos semelhantes. No primeiro passo do catabolismo do naftaleno, uma molécula de oxigênio é introduzida na posição 1,2 do núcleo aromático pela naftaleno-dioxigenase (NDO) para produzir cis-naftaleno dihidrodiol. O cis-naftaleno dihidrodiol é transformado em 1,2-di-hidroxinaftaleno e subsequentes

intermediários, resultando na produção de salicilaldeído, que é então transformado em salicilato por salicilaldeído-desidrogenase. O salicilato é então catabolizado via catecol ou ácido gentísico para intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (LI et al., 2015). No entanto, a organização genética das enzimas catabólicas de HPA é mais diversificada em degradadores Gram-positivos do que nos degradadores Gram-negativos. O naftaleno é principalmente degradado através da via do catecol ou do ácido gentísico (LI et al., 2015). Segundo Grund, Denecke e Eichenlaub (1992) e Zhou e colaboradores (2001), na maioria dos casos, o salicilato derivado de naftaleno é oxidado a catecol porém em alguns casos o salicilato é oxidado a gentisato. Esses dois genes estão envolvidos na degradação de naftaleno. Isto é então convertido pela ação da 1-hidroxilase de salicilato em catecol (1,2-dihidroxibenzeno), que sofre a clivagem de extradiol através da mesma via utilizada para uma ampla gama de outros compostos aromáticos, como tolueno, xileno e o fenol.

Vários genes envolvidos na degradação de HPAs estão envolvidos no modelo de degradação de naftaleno. Similarmente, a degradação de outros HPAs, como antraceno e fenantreno, tem envolvimento de salicilato hidroxilase (SalA) e gentisato 1,2-dioxigenase, com funções vitais no caminho de degradação de HPA (FAROOQUI, 2014).

Pela determinação da utilização dos intermediários (salicilato e gentisato) na degradação de HPA como fontes de carbono, foram previstas que pelo menos três vias catabólicas para degradação de naftaleno: (1) salicilato-catecol, (2) salicilato-gentisato e (3) via de intermediários do ciclo tricarboxílicos (WIDADA et al., 2002).

5.3.5 Busca genômica por enzimas participantes das vias de degradação de HPA

As buscas por genes codificadores de proteínas que participam de alguma via de degradação de hidrocarbonetos mostrou a ocorrência de genes possivelmente envolvidos nos sistemas de degradação em placa (seção 5.3.1). Após os resultados positivos para degradação de hexadecano, naftaleno e fenol, foram realizadas buscas refinadas nos bancos de dados de anotação disponíveis, entre eles Rast, Patric e NCBI. A anotação realizada pela plataforma NCBI foi realizada no momento do depósito das sequências. Esta apresentou os melhores resultados, sendo comparadas na plataforma Pfam. Foram encontradas 5 classes de genes de proteínas codificadoras de proteínas que possuem participação nas vias de degradação dos contaminantes estudados, sendo elas: Citocromo P450 (subgrupo Cypx), monooxigenases (contendo flavina FMO), dioxigenases (intradiol (3,4 protocatecoato dioxigenase), Lig B, extradiol (Vicinal dioxigenase do tipo I) (Tabela 5.5).

Nas vias de degradação de alcanos (nesta estudamos o hexadecano), existem diferentes sistemas enzimáticos são necessários para introduzir oxigênio no substrato e iniciar a biodegradação. Para cadeias curtas, que possuem de 1 a 4 carbonos (metano a butano), esses passos são realizados pelas enzimas metano-monooxigenases, enquanto que para as cadeias médias, de 5 a 16 carbonos (pentano a hexadecano), são oxidados por enzimas integrais de Ferro não-heme ou Citocromo P450 e alcano hidroxilase (AlkB), e para cadeias mais longas, com mais de 17 carbonos, são oxidados por sistemas enzimáticos desconhecidos (van BEILEN & Funhof, 2007; WANG & SHAO, 2013).

Já a via de degradação de hidrocarbonetos aromáticos envolve uma grande variedade de caminhos periféricos que ativam substratos estruturalmente diversos em um número limitado de intermediários comuns. Estes são então clivados e processados por algumas vias centrais do metabolismo da célula. Três superfamílias de enzimas estão envolvidas neste processo: as oxigenases de ferro de Rieske não-heme (RNHO), as monooxigenases de flavoproteína (FPM) e as monooxigenases multicomponentes de 2-ferro solúveis (SDM). O metabolismo adicional é obtido através de intermediários aromáticos di ou tri-hidroxilados. Alternativamente, a ativação é mediada por ligases de CoA, onde os derivados de CoA formados são submetidos a hidroxilação seletiva. No caso de poluentes hidrofóbicos, tais como benzeno, tolueno, naftaleno, bifenilo ou aromáticos policíclicos, a degradação aeróbica é geralmente iniciada pela ativação do anel aromático através de reações de oxigenação catalisadas por enzimas RNHO ou, como descrito intensivamente para a degradação do tolueno, através de membros de Enzimas SDM. Outros intermediários podem ser catalisados por dois tipos de enzimas, *intradiol* e *extradiol dioxigenases*, que representam duas classes de proteínas filogeneticamente não relacionadas, essas enzimas são enzimas chave na degradação de compostos aromáticos. Embora todas as *intradiol dioxigenases* descritas até agora pertençam à mesma superfamília, as *extradiol dioxigenases* incluem pelo menos três membros de diferentes famílias. As *extradiol dioxigenases* de tipo I (por exemplo, catecol-2,3-dioxigenases e 1,2-dioxigenases) pertencem às enzimas de superfamília de quelato de oxigênio vicinal. As *extradiol dioxigenases* de tipo II estão relacionadas com a superfamília de LigB (por exemplo, 4,5-dioxigenases de protocatecoato) e as enzimas de tipo III pertencem à superfamília de cupina (por exemplo, gentisato dioxigenases) (SIERRA-GARCIA & OLIVEIRA, 2013).

Já a via de degradação de fenol, ocorre com um ataque oxidativo inicial que consiste na oxidação direta do anel aromático via ataque de monooxigenases ou dioxigenases ou pela oxidação da cadeia lateral de alquila que é catalisada por monooxigenases. A clivagem do

anel ocorre pela catecol 2,3 dioxigenase após o qual a estrutura é degradada em intermediários do ciclo de Krebs (HENDRICKX et al., 2006).

Podemos observar com a tabela 5.5 que todos os isolados possuem monooxigenases contendo flavina. Segundo Yamamoto e colaboradores (1965), as reações de hidroxilação são realizadas por monooxigenases. Estes autores, descreveram salicilato hidroxilase que catalisa a formação de catecol de salicilato e reduziu o nucleotídeo de piridina na presença de dinucleotídeo de flavina adenina como um cofator específico. Sendo salicilato hidroxilase, uma monooxigenase que requer a presença de flavina.

Tanto *Blastopirellula cremea* Hex-1 quanto *Blastopirellula cremea* Hex PRIS-MGV apresentaram regiões genômicas com similaridade para a síntese de citocromo P450. Segundo van BEILEN & FUNHOFF (2007), estudos bioquímicos apontaram para o envolvimento de duas classes principais de enzimas o primeiro relacionou-se com as onipresentes enzimas do citocromo P450 encontradas no fígado de mamíferos (COON, 2005; BERNHARDT, 2006). Esses outros P450s alceno-hidroxilantes foram encontrados em leveduras e em poucos grupos de bactérias. Este segundo mostrou-se ser uma membrana integral não-heme de ferro II monooxigenase (alkB).

Quatro genomas (exceto *Blastopirellula cremea* Hex-1) apresentaram regiões codificadoras para 3,4 dioxigenase protocatecoato. Segundo BUCHAN e colaboradores (2000), a maioria dos compostos aromáticos é primeiro convertida em um dos vários substratos di- ou tri-hidroxilados, como catecol ou protocatecoato, cujo anel aromático pode ser clivado enzimaticamente. Na via β -cetoadipato uma rota catabólica primariamente codificada cromossomicamente que é amplamente distribuída em bactérias do solo e fungos, catecol e protocatecoato são clivados entre seus dois grupos hidroxila por 1,2-dioxigenase catecol (1,2-CTD) ou 3,4-dioxigenase protocatecoato (3,4-PCD), respectivamente. Esta via ramificada converge, e os produtos de clivagem do anel de catecol ou protocatecoato são convertidos em β -cetoadipato, o metabólito para o qual a via foi nomeada. Dois passos adicionais completam a conversão do β -cetoadipato em intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico.

Os isolados *Blastopirellula cremea* Hex-2 MGV e *Blastopirellula marina* Nap PRIS-MGV apresentam sistemas codificadores de extradiol LigB dioxigenase. Segundo Williams & Sayers (1994), com base no tipo de reação catalisada, as dioxigenases catecólicas de abertura de anel, podem ser classificadas em dois tipos, o tipo intradiol e o tipo extradiol. Foi estabelecido que as dioxigenases do tipo intradiol (catecólicas) têm ferro férrico do tipo não

heme no seu sítio ativo, enquanto que as dioxigenases do tipo extradiol (catecólicas) têm tipicamente ferro ferroso do tipo não heme no seu local ativo.

Já os isolados *Blastopirellula cremea* Hex-1 MGv e *Blastopirellula marina* Nap-Phe MGv apresentaram genes relacionados a produção de compostos atuantes na via vicinal-oxigênio-quelato (VOC).

Tabela 5.5 - Genes codificadores de proteínas presentes nas diferentes vias de degradação de xenobióticos

	<i>Blastopirellula cremea</i> Hex-1 MGV	<i>Blastopirellula marina</i> NAP- PH MGV	<i>Blastopirellula cremea</i> Hex-2 MGV	<i>Blastopirellula cremea</i> Hex Pris- MGV	<i>Blastopirellula marina</i> Nap Pris- MGV
Citocromo P450	X			X	
Monooxygenase contendo flavina (FMO)	X	X	X		X
Dioxigenase- intradiol (3,4 protocatecoato)		X	X	X	X
Dioxigenase- extradiol LigB					X
Dioxigenase 1,2 extradiol (Vicinal dioxigenase)	X	X			
Dioxigenase 2,3 bifenil			X		

Como esperado, encontramos genes codificadores de proteínas relacionadas aos diferentes tipos de degradação realizadas pelos cinco isolados. Os microrganismos *Blastopirellula cremea* Hex-1 e *Blastopirellula cremea* Hex PRIS-MGV, tolerantes a

hexadecano, apresentaram a enzima citocromo P450, que é responsável pela degradação de alcanos com cadeias maiores. Já os microrganismos que foram tolerantes ao naftaleno e ao fenol apresentaram enzimas que participam das vias responsáveis por estas (as monooxigenases e as dioxigenases). O microrganismo *Blastopirellula crenea* Hex-2 MGV que degrada hexadecano não apresentou a enzima citocromo P450, porém está presente as enzimas das famílias de monooxigenases e dioxigenases, sendo que as monooxigenases possuem participação direta na degradação de alcanos, com a introdução de oxigênio numa vasta gama de alcanos de cadeias intermediárias (van BEILEN & FUNHOFF, 2007).

5.3.6 Análise filogenética dos genes codificadores de proteínas do estudo de degradação de hidrocarbonetos

Foram realizadas análises filogenéticas dos genes envolvidos na degradação dos hidrocarbonetos de interesse. Foram pesquisadas as sequências desses genes nas anotações, conforme os resultados obtidos nas seções (4.3.4 e 4.3.5), os genes de interesse foram: monooxigenases flavina dependente (Figura 5.9), dioxigenase intradiol (3,4 protocatecolato) (Figura 5.10), dioxigenase extradiol (LigB, vicina e bifenil) (Figura 5.11) e citocromo P450 (Figura 5.12). As sequências foram comparadas com as sequências de bancos de dados e foram processadas no Mega 6.0 e construídas árvores filogenéticas para cada função.

Figura 5.9: Árvore filogenética de monooxigenases flavina dependente, utilizando sequências de aminoácidos dos genomas em estudo. Suporte *Bootstrap* (>50) representando valores de *Neighbor-joining*, usando um modelo substituto JTT (com 100 replicatas).

Essa filogenia mostra a organização dos genes dos nossos genomas (*Blastopirellula cremea* Hex-1 MGV; *Blastopirellula marina* Nap-Phe MGV; *Blastopirellula cremea* Hex-2 MGV e *Blastopirellula marina* Nap PRIS-MGV) comparados com genes próximos de bactérias modelos para degradação de hidrocarbonetos, *Pseudomonas fluorescens* H14 (DONG et al., 2017), *Pseudomonas oleovorans* (van BEILEN, WUBBOLTS & WITHOLT, 1994) e *Acinetobacter* sp. ADP1 (METZGAR et al., 2004). Podemos observar que nossos genes de monooxigenase não são próximos dos genes dessas bactérias modelos para degradação de hidrocarbonetos.

Figura 5.10: Árvore filogenética de dioxigenases intradiol 3,4-protocatecoato, utilizando seqüências de aminoácidos dos genomas em estudo. Suporte *Bootstrap* (>50) representando valores de *Neighbor-joining*, usando um modelo substituto JTT (com 100 replicatas).

Nessa filogenia observamos a conformação dos genes codificadores de proteínas dos genomas descritos neste estudo (*Blastopirellula cremea* Hex-1 MGV, *Blastopirellula marina* Nap-Phe MGV, *Blastopirellula cremea* Hex-2 MGV, *Blastopirellula cremea* Hex PRIS-MGV e *Blastopirellula marina* Nap PRIS-MGV) com genes de uma maior diversidade de espécies. Novamente o clado pertencente as nossas espécies estão distantes de espécies modelos para degradação de hidrocarbonetos, sendo elas *Pseudomonas fluorescens* H14, *Pseudomonas aeruginosa* DN1 (DONG et al., 2017) e *Pseudomonas putida* F1 (ZYLSTRA & GIBSON, 1989).

a)

b)

Figura 5.11: Árvore filogenética de dioxigenases extradiol a) Vicinal e b) LigB, utilizando sequências de aminoácidos dos genomas em estudo. Suporte *Bootstrap* (>50) representando valores de *Neighbor-joining*, usando um modelo substituto JTT (com 100 replicatas).

Nestas figuras observamos a conformação dos genes para dioxigenase extradiol vicinal (a) dos genomas *Blastopirellula cremea* Hex-1 MGV e *Blastopirellula marina* Nap-Phe MGV e dos genes de dioxigenase extradiol LigB (b) para os genomas *Blastopirellula marina* Hex-2 MGV e *Blastopirellula marina* Nap PRIS-MGV. Também observamos uma variedade de espécies próximas às espécies dos genomas em estudo.

Figura 5.12: Árvore filogenética de citocromo P450 utilizando sequências de aminoácidos dos genomas em estudo. Suporte *Bootstrap* (>50) representando valores de *Neighbor-joining*, usando um modelo substituto JTT (com 100 replicatas).

E por último, esta árvore filogenética do gene citocromo P450 dos genomas de *Blastopirellula cremea* Hex-1 MGV e *Blastopirellula cremea* Hex PRIS-MGV também nos mostra uma distância com as espécies modelos de degradação sendo elas representadas no último clado *Pseudomonas oleovorans* (van BEILEN, WUBBOLTS & WITHOLT, 1994) e *Acinetobacter* sp. ADP1 (METZGAR et al., 2004).

5.3.7 Genes relacionados ao Metabolismo Secundário

A busca de *clusters* de genes que codificam caminhos biossintéticos para metabolismo secundário nos cinco genomas revelaram diversos *clusters* (Tabela 5.6) de *Blastopirellula cremea* HEX-1 MGV (Figura 5.13) apresentou 37 *clusters*, desses representaram Bacteriocinas, Terpenos, PKS – terpeno tipo 1, Ectoína. Já o microrganismo *Blastopirellula marina* Nap-Ph MGV (Figura 5.14) apresentou 50 *clusters*, desses representaram Bacteriocinas, Terpenos, PKS tipo 3, Resorcinol, PKS tipo 1 e Oligossacarídeos. *Blastopirellula cremea* HEX-2 MGV (Figura 5.15) apresentou 28 *clusters* e desses foi encontrado Ectoína, Terpenos, Resorcinol, PKS tipo 1, Bacteriocinas. Já *Blastopirellula cremea* Hex PRIS-MGV (Figura 5.16) apresentou 27 *clusters*, desses foi

encontrado Bacteriocinas, Terpenos, Ectoína, PKS tipo 1. E para finalizar, *Blastopirellula marina* Nap PRIS-MGV (Figura 5.17) apresentou um total de 47 *clusters*, com os principais de interesse sendo Ectoína, PKS tipo 1, Bacteriocinas, Terpenos, Resorcinol.

Tabela 5.6 - Biossíntese de *clusters* de genes de metabólitos secundários. Fonte AntiSmash

	<i>Blastopirellula cremea</i> Hex-1 MGV	<i>Blastopirellula marina</i> NAP- PH MGV	<i>Blastopirellula cremea</i> Hex-2 MGV	<i>Blastopirellula cremea</i> Hex Pris- MGV	<i>Blastopirellula marina</i> Nap Pris- MGV
Terpeno	X	X	X	X	X
Bacteriocinas	X	X	X	X	X
PKS-terpeno I	X	X	X	X	X
PKS-tipo III		X			
Ectoína	X		X	X	X
Resorcinol		X	X		X
Oligossacarídeo		X			

Segundo Ivanova e colaboradores (2017), a habilidade de produzir metabólitos secundários é um “luxo” de bactérias de genomas grandes. Muitos metabólitos secundários oferecem vantagens seletivas aos produtores e só são produzidos sob condições específicas (KHMELENINA et al., 2015). Porém estudos realizados por Jeske et al. (2013) apontam para uma relação previamente postulada de Planctomycetes com algas ou plantas, que secretam compostos que podem servir como desencadeadores de estímulo para a produção de metabólitos secundários em Planctomycetes.

Terpenos são compostos orgânicos que incluem diferentes tipos de antibióticos, hormônios, vitaminas, pigmentos (IVANOVA et al., 2017; YAMADA et al., 2012). A humanidade usou terpenos extraídos de plantas para muitos propósitos, como fragrâncias e sabores, como agentes farmacêuticos e inseticidas (THOLL et al., 2006). Os genomas de Planctomycetes são conhecidos por serem extremamente ricos em *clusters* de genes terpenóides (IVANOVA, et al., 2017; JESKE et al., 2013). Os metabólitos (terpenos modificados) são conhecidos como antibióticos, hormônios, constituintes de sabor ou odor ou pigmentos. Como a maioria dos Planctomycetes formam colônias coloridas de corais, amarelo, rosa ou vermelho, os pigmentos carotenóides provavelmente estarão presentes na maioria, se não em todas as espécies (JESKE et al., 2013). Existem dois tipos básicos de enzimas PKS (*polyketide synthase*), iterativas e modulares, que se distinguem por sua

arquitetura e mecanismo de reação. As PKS modulares de tipo I consistem em polipéptidos multifuncionais relativamente grandes, comumente associados à produção de metabolitos altamente reduzidos, tais como antibióticos macrólidos. Por outro lado, as PKS iterativas consistem em polipéptidos tipo I e de tipo II bacteriano, e cada domínio ativo muitas vezes é usado várias vezes à medida que o produto é montado. As PKS iterativas do tipo II bacteriano estão envolvidas na biossíntese de policétidos aromáticos (ÖMURA et al., 2001). PKS são enzimas multimodulares, o qual produzem numerosas moléculas bioativas pequenas, acil-CoAs são carregados, ativados e condensados por mega-enzimas organizadas em unidades funcionais iterativas que podem ser usados como antimicrobianos, protetores de plantas e nematicida (ARGUELLES-ARIAS et al., 2009; IVANOVA et al., 2017; JESKE et al., 2013). Bacteriocinas são proteínas ou péptidos ribossômicos com atividade bactericida em relação a espécies que são muitas vezes intimamente relacionadas com a bactéria produtora e exibem pesos moleculares variáveis, propriedades bioquímicas, espectros inibitórios e mecanismos de ação, além de seu potencial uso como conservantes naturais (SANSINENEA & ORTIZ, 2011). Resorcinol é um metabólito secundário importante como antimicrobianos e antifúngicos, com importância na indústria farmacêutica usados na produção de antissépticos e desinfetantes, além de corantes (CHUIHUA et al., 2002; BOSAK et al., 2017). O metabólito secundário Ectoína geralmente confere importância antimicrobiana (DEREWACZ et al., 2012) além de proteger contra a desidratação e, portanto, são expressos em condições de alto teor de sal ou alta temperatura, atuam como osmo protetor (CRANEY, AHMED & NODWELL, 2013; KHMELENINA et al., 2015). Oligossacarídeos foram descritos como elicitores, estimulantes de plantas em suas respostas de defesa, como compostos antimicrobianos e antioxidantes. O gênero *Thermogutta terrifontis* caracterizado como o primeiro representante termofílico do filo Planctomycetes apresentou habilidade de crescimento em diferentes carboidratos incluindo oligo e polissacarídeos, como por exemplo, goma de xantana que possui numerosas aplicações biotecnológicas no campo da farmácia, cosméticos, agricultura, comida e indústrias petrolíferas (ELCHENINOV et al., 2017).

Cluster 3. Bacteriocina-cf_sacarideo

■ Genes biossintéticos ■ Genes biossintéticos adicionais ■ Genes relacionados ao transporte ■ Genes reguladores ■ Outros genes

Cluster 8. Terpenos

■ Genes biossintéticos ■ Genes biossintéticos adicionais ■ Genes relacionados ao transporte ■ Genes reguladores ■ Outros genes

Cluster 9. Terpenos

■ Genes biossintéticos ■ Genes biossintéticos adicionais ■ Genes relacionados ao transporte ■ Genes reguladores ■ Outros genes

Cluster 19. T1PKS-Terpenos

■ Genes biossintéticos ■ Genes biossintéticos adicionais ■ Genes relacionados ao transporte ■ Genes reguladores ■ Outros genes

Cluster 27. Ectoína

■ Genes biossintéticos ■ Genes biossintéticos adicionais ■ Genes relacionados ao transporte ■ Genes reguladores ■ Outros genes

Cluster 34. T1PKS-Nrps

■ Genes biossintéticos ■ Genes biossintéticos adicionais ■ Genes relacionados ao transporte ■ Genes reguladores ■ Outros genes

Figura 5.13: *Clusters* de genes de Metabolismo Secundário relatados no genoma de *Blastopirellula cremea* Hex-1 MGv com AntiSmash.

Figura 5.14: *Clusters* de genes de Metabolismo Secundário relatados no genoma de *Blastopirellula marina* Nap-Ph MGv com AntiSmash.

Cluster 1. Bacteriocina-Cf_sacarídeo

■ Genes biossintéticos ■ Genes biossintéticos adicionais ■ Genes relacionados ao transporte ■ Genes reguladores ■ Outros genes

Cluster 12. Terpenos

■ Genes biossintéticos ■ Genes biossintéticos adicionais ■ Genes relacionados ao transporte ■ Genes reguladores ■ Outros genes

Cluster 13. Terpenos

■ Genes biossintéticos ■ Genes biossintéticos adicionais ■ Genes relacionados ao transporte ■ Genes reguladores ■ Outros genes

Cluster 19. Ectoína

■ Genes biossintéticos ■ Genes biossintéticos adicionais ■ Genes relacionados ao transporte ■ Genes reguladores ■ Outros genes

Cluster 19. T1PKS-Terpenos

■ Genes biossintéticos ■ Genes biossintéticos adicionais ■ Genes relacionados ao transporte ■ Genes reguladores ■ Outros genes

Figura 5.16: *Clusters* de genes de Metabolismo Secundário relatados no genoma de *Blastopirellula cremea* Hex PRIS- MGV com AntiSmash.

Figura 5.17: *Clusters* de genes de Metabolismo Secundário relatados no genoma de *Blastopirellula marina* Nap PRIS-MGV com AntiSmash.

5.4 CONCLUSÃO

Dos 39 isolados de Planctomycetes cultivados a partir de solos das áreas de manguezais, apresentaram positivos para pelo menos um dos contaminantes testados sendo eles: hexadecano, naftaleno e fenol. Apenas fenantreno não obteve resultados positivos. Todos os isolados se afiliaram ao gênero *Blastopirellula* e possuem propriedades genômicas similares, com genomas de tamanhos considerados grandes, conteúdo C+G e número de CDS semelhantes.

Funcionalmente, os genomas dos 5 isolados estudados apresentaram genes codificadores de proteínas com funcionalidade relacionadas ao Metabolismo de Compostos Aromáticos, abrangendo as vias periféricas de catabolismo de compostos aromáticos e intermediários do processo (sendo eles gentisato e salicilato). Até o momento, não há nenhum relato em artigos publicados sobre a participação de Planctomycetes nessas vias de degradação. Com uma busca mais refinada, encontramos genes codificadores de proteínas relacionadas aos diferentes tipos de degradação realizados pelos cinco isolados. Os microrganismos *Blastopirellula cremea* Hex-1 e *Blastopirellula cremea* Hex PRIS-MGV tolerantes ao hexadecano apresentaram a enzima citocromo P450. Já os microrganismos que foram tolerantes ao naftaleno e ao fenol apresentaram enzimas que participam das vias responsáveis por estas. O microrganismo *Blastopirellula cremea* Hex-2 MGV que degrada hexadecano não apresentou a enzima citocromo P450, porém está presente as enzimas das famílias de monooxigenases e dioxigenases.

Além de apresentarem estas enzimas, os genomas também apresentaram *clusters* de genes de Metabolismo Secundário, sendo os principais produtores de ectoína, bacteriocina, terpenos, oligossacarídeos e, resorcinol.

REFERÊNCIAS

- ARGUELLES-ARIAS, A.; ONGENA, M.; HALIMI, B.; LARA, Y.; BRANS, A.; JORIS, B.; FICKERS, P. *Bacillus amyloliquefaciens* GAI as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. **Microbial Cell Factories**, 2009.
- BAE, H.; PARK, K.S.; CHUNG, Y.C.; JUNG, J.Y. Distribution of anammox bacteria in domestic WWTPs and their enrichments evaluated by real-time quantitative PCR. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 323-334, 2010.

- BENGTSSON, M.M.; OVREAS, L. Planctomycetes dominate biofilms on surfaces of the kelp *Laminaria hiperborea*. **BMC Microbiology**, v.10, p.1-12, 2010.
- BERNHARDT, R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. **Journal Biotechnology**, v.124, p.128-145, 2006.
- BONDOSO, J.; ALBUQUERQUE, L.; NOBRE, M.F.; LOBO-DA-CUNHA, A.; DA COSTA, M.S.; LAGE, O.M. *Roseimaritima ulvae* gen.nov., sp.nov. and *Rubripirellula obstinata* gen.nov.,sp.nov., two novel planctomycetes isolated from the epiphytic community of maroalgae. **Systematic and Applied Microbiology**, p.1-8, 2014.
- BONDOSO, J.; GODOY-VITORINO, F.; BALAGUÉ, V.; GASOL, J.M.; HARDER, J.; LAGE, O.M. Epiphytic *Planctomycetes* communities associated with three main groups of macroalgae. **FEMS Microbiology Ecology**, 2017.
- BORIN, S.; MAPELLI, F.; ROLLI, E.; SONG, B.; TOBIAS, C.; SCHMID, M.C.; De LANGE, G.J.; SCHOUTEN, S.; JETTEN, M.; DAFFONCHIO, D. Anammox bacterial populations in deep marine hypersaline gradient systems. **Extremophiles**, Tokyo, v. 17, n. 2, p. 289-299, 2013.
- BOSAK, A.; KNEZEVIC, A.; SMILOVIC, I.G.; SINKO, G.; KOVARIK, Z. Resorcinol-, catechol- and saligenin-based bronchodilating β 2-agonists as inhibitors of human cholinesterase activity. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v.32, p.789-797, 2017.
- BOUCHEZ-NAÏTALI, M.; RAKATOZAFY, H.; MARCHAL, R.; LEVEAU, J.Y.; VANDECASTEELE, J.P. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, 1999.
- BRITO, E.M.S.; GUYONEAUD, R.; GOÑI-URRIZA, M.; RANCHOU-PEYRUSE, A.; VERBAERE, A.; CRAPEZ, M.A.C.; WASSERMAN, J.C.A.; DURAN, R. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. **Research in Microbiology**, v.157, p. 752-762, 2006.
- BUCHAN, A.; COLLIER, L.S.; NEIDLE, E.L.; MORAN, M.A. Key aromatic-ring-cleaving enzyme, protocatechuate 3,4-dioxygenase, in the ecologically important marine *Roseobacter* lineage. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.4662-4672, 2000.
- BUSNELL, L.D.; HAAS, H.F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, v. 41, p. 653-673, 1940.

- BUTLER, M.K.; FUERST, J.A. Comparative analysis of ribonuclease P RNA of the *planctomyces*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1333-1344, 2004.
- CARVER, T.; THOMSON, N.; BLEASBY, A.; BERRIMAN, M.; PARKHILL, J. DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. **Bioinformatics**, v.25, p. 119-120, 2009.
- CHUIHUA, K.; XIAOHUA, X.; FEI, H.; XIONGHUI, C.; BING, L.; ZHONGWEN, T. Using specific secondary metabolites as markers to evaluate allelopathic potentials of rice varieties and individual plants. **Chinese Science Bulletin**, v.47, 2002.
- COON, M.J.; Omega oxygenases: nonheme-iron enzymes and P450 cytochromes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, p. 378-385, 2005.
- CRANEY, A.; AHMED, S.; NODWELL, J. Towards a new science of secondary metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v.66, p.387-400, 2013.
- DEREWACZ, D.K.; GOODWIN, C.R.; MCNEES, C.R.; MCLEAN, J.A.; BACHMANN, B.O. Antimicrobial drug resistance affects broad changes in metabolomic phenotype in addition to secondary metabolites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.110, p. 2336-2341, 2013.
- DÍAZ, E.; FERRÁNDEZ, A.; PRIETO, M.A.; GARCÍA, J.L. Biodegradation of Aromatic Compounds by *Escherichia coli*, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 523-569, 2001.
- DONADIO, S.; MONCIARDINI, P.; SOSIO, M. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. **Natural Product Reports**, 2007.
- DONG, W.; HE, C.; LI, Y.; HUANG, C.; CHEN, F.; MA, Y. Complete genome sequence of a versatile hydrocarbon degrader, *Pseudomonas aeruginosa* DN1 isolated from petroleum-contaminated soil. **Gene Reports**, v.7, p.123-126, 2017.
- ELCHENINOV, A.G.; MENZEL, P.; GUDBERGSDOTTIR, S.R.; SLESAREV, A.L.; KADNIKOV, V.V.; KROGH, A.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E.A.; PENG, X.; KUBLANOV, I.V. Sugar Metabolism of the First Thermophilic Planctomycete *Thermogutta terrifontis*: Comparative Genomic and Transcriptomic Approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-11, 2017.
- FARIA, M.; BORDIN, N.; KIZINA, J.; HARDER, J.; DEVOS, D.; LAGE, O.M. *Planctomyces* attached to algal surfaces: Insight into their genomes. **Genomics**, 2017.

- FAROOQUI, S.M. Aromatic hydrocarbon degradation by haloalkaliphilic and metal reducing bacteria. Tese de doutorado. (**Faculty of Science, Environment, Engineering and Technology-GRIFFITH UNIVERSITY**), Queensland, Australia, 2014.
- FUKUNAGA, Y.; KURAHASHI, M.; SAKIYAMA, Y.; OHUCHI, M.; YOKOTA, A.; HARAYAMA, S. *Phycisphaera mikurensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a marine alga, and proposal of *Phycisphaeraceae* fam. nov., *Phycisphaerales* ord. nov. and *Phycisphaerae* classis nov. in the phylum *Planctomycetes*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 55, p. 267-275, 2009.
- GERLT, J.A.; BABBITT, P.C. Divergent Evolution of enzymatic function: mechanistically diverse superfamilies and functionally distinct suprafamilies. **Annual Review of Biochemistry**, v.70, p.209-246, 2001.
- GLÖCKNER, F.O.; KUBE, M.; BAUER, M.; TEELING, H.; LOMBARDOT, T.; LUDWING, W.; GADE, D.; BECK, A.; BORZYM, K.; HEITMANN, K.; RABUS, R.; SCHLESNER, H.; AMANN, R.; REINHARDT, R. Complete genome sequence of the marine Planctomycete *Pirellula* sp. Strain 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 100, p. 8298-8303, 2003.
- GONZALES-LIMACHE, E.E. Caracterização taxonômica e potencial e potencial de biodegradação de hidrocarbonetos por bactérias isoladas de efluentes salinos associados ao petróleo. Dissertação de Mestrado (**Universidade Estadual de Campinas**), Campinas, São Paulo, 2015.
- GOMES, M.B.; GONZALES-LIMACHE, E.E.; SOUSA, S.T.P.; DELLAGNEZZE, B.M.; SARTORATTO, A.; SILVA, L.C.F.; GIEG, L.M.; VALONI, E.; SOUZA, R.S.; TORRES, A.P.R.; SOUSA, M.P., DE PAULA, S.O.; SILVA, C.C.; OLIVEIRA, V.M. Exploring the potential of halophilic bacteria from oil terminal environments for biosurfactant production and hydrocarbon degradation under high-salinity conditions. **International Biodeterioration e Biodegradation**, p. 1-12, 2016.
- GRUND, E.; DENECKE, B.; EICHENLAUB, R. Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 1874-1877, 1992.
- GUO, M.; ZHOU, Q.; ZHOU, Y.; YANG, L.; LIU, T.; YANG, J.; CHEN, Y.; SU, L.; XU, J.; CHEN, J.; LIU, F.; CHEN, J.; DAI, W.; NI, P.; FANG, C.; YANG, R. Genomic Evolution of 11 Type Strains within Family Planctomycetaceae. **Plos one**, v.9, p.1-11, 2014.
- GUREVICH, A.; SAVELIEV, V.; VYAHHI, N.; TESLER, N. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v.29, p.1072-1075, 2013.

- HENDRICKX, B.; JUNCA, H.; VOSAHOLOVA, J.; LINDNER, A.; RÜEGG, I.; BUCHELI-WITSCHER, M.; FABER, F.; EGLI, T.; MAU, M.; SCHLÖMANN, M.; BRENNEROVA, M.; BRENNER, V.; PIEPER, D.H.; TOP, E.M.; DEJONGHE, W.; BASTIAENS, L.; SPRINGAEL, D. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: Distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. **Journal of Microbiological Methods**, v.64, p.250-265, 2006.
- HRISTOV, A.E.; CHRISTOVA, N.E.; KABAIVANOVA, L.V.; NACHEVA, L.V.; STOINEVA, I.B.; PETROV, P.D. Simultaneous biodegradation of phenol and n-hexadecane by Cryogel immobilized biosurfactant producing strain *Rhodococcus wratislawiensis* BN38. **Polish Journal of Microbiology**, v. 65, p. 287-293, 2016.
- IVANOVA, A. A.; NAUMOFF, D.G.; MIROSHNIKOV, K.K.; LIESACK, W.; DEDYSH, S.N. Comparative Genomics of Four Isosphaeraceae Planctomycetes: A Common Pool of Plasmids and Glycoside Hydrolase Genes Shared by *Paludisphaera borealis* PX4^T, *Isosphaera pallida* IS1B^T, *Singulisphaera acidiphila* DSM 18658^T, and Strain SH-PL62. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p. 1-11, 2017.
- IVANOVA, A.A.; PHILIPPOV, D.A.; KULICHEVSKAYA, I.S.; DEDYSH, S.N. Distinct diversity patterns of *Planctomycetes* associated with the freshwater macrophyte *Nuphar lutea* (L.) Smith. **Antonie van Leeuwenhoek**, 2017.
- JESKE, O., JOGLER, M.; PETERSEN, J.; SIKORSKI, J.; JOGLER, C. From genome mining to phenotypic microarrays: *Planctomycetes* as source for novel bioactive molecules. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v.104, p.551-567, 2013.
- JESKE, O.; SURUP, F.; KETTENIß, M.; RAST, P.; FÖRSTER, B.; MAREIKE, J.; WINK, J.; JOGLER, C. Developing techniques for the utilization of Planctomycetes as producers of bioactive molecules. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.
- JING, L.; CHEN, B.; ZHANG, B.; ZHENG, J.; LIU, B. Naphthalene degradation in seawater by UV irradiation: The effects of fluence rate, salinity, temperature and initial concentration. **Marine Pollution Bulletin**, v.81, p.149-156, 2014.
- JOHNSON, A.R.; BENDIXEN, K.; KARLSON, U. Detection of microbial growth on polycyclic aromatic hydrocarbons in microtiter plates by using the respiration indicator wst-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p. 2683-2689, 2002.
- KAFILZADEH, F.; FARHANGDOOST, M-S.; TAHERY, Y. Isolation and identification of phenol degrading bacteria from Lake Parishan and their growth kinetic assay. **African Journal of Biotechnology**, v.9(40), p.6721-6726, 2010.

- KLMELENINA, V.N.; ROZOVA, O.N.; BUT, S.U.; MUSTAKHIMOV, I.I.; RESHETNIKOV, A.S.; BESCHASTNYI, A.P.; TROTSSENKO, Y.A. Biosynthesis of secondary metabolites in methanotrophs: biochemical and genetic aspects (review). **Biokhimiya i Mikrobiologiya** v.51, p.140-150, 2015.
- KULICHEVSKAYA, I.S.; IVANOVA, A.O.; BAULINA, O.L.; BODELIER, P.L.E.; SINNINGHE-DAMSTÈ, J.S.; DEDYSH, S.N. *Singulisphaera acidiphila* gen.nov., sp.nov., a non-filamentous, *Isosphaera*-like planctomycete from acidic northern wetlands. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.1186-1193, 2008.
- KULICHEVSKAYA, I.S.; BAULINA, O.I.; BODELIER, P.L.E.; RIJPSTRA, W.I.C.; DAMSTE, J.S.S. DEDYSH, S.N. *Zavarzinella Formosa* gen. nov., sp. nov., a novel stalked, *Gemmata* like *Planctomycete* from a Siberian peat bog. **International Journal for Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, p. 357-364, 2009.
- KUMAR, A.; KUMAR, S.; KUMAR, S. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC1194. **Biochemical Engineering Journal**, v.22, p. 151-159, 2005.
- KUMAR, P.G.N.; SUMANGALA, K.B. Fungal degradation of Azo dye-Red 3BN and optimization of physical-chemical parameters. **ISCA Journal of Biological Sciences**, vol. 1(2), p. 17-24, 2012.
- LAGE, O.M., BONDOSO, J., Planctomycetes and macroalgae, a striking association. **Frontiers of Microbiology**, v.5, 2014.
- LAGE, O.M.; BONDOSO, J.; VIANA, F. Isolation and characterization of Planctomycetes from the sediments of a fish farm wastewater treatment tank. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 194, p. 879-885, 2012.
- LEE, H.W.; ROH, S.W.; SHIN, N.; LEE, J.; WHON, T.W.; JUNG, M.; YUN, J.; KIM, M.; HYUN, D.; KIM, D.; BAE, J. *Blastopirellula cremea* sp.nov, isolated from a dead ark clam. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.63, p.2314-2319, 2013.
- LI, C.; ZHANG, C.; SONG, G.; LIU, H.; SHENG, G.; DING, Z.; WANG, Z.; SUN, Y.; XU, Y.; CHEN, J. Characterization of a protocatechuate catabolic gene cluster in *Rhodococcus ruber* OA1 involved in naphthalene degradation. **Annals of Microbiology**, 2015.
- LIN, S-H.; LIAO, Y-C. CISA: Contig Integrator for Sequence Assembly of Bacterial Genomes. **Plos One**, v.8, 2013.

- METZGAR, D.; BACHER, J.M.; PEZO, V.; READER, J.; DÖRING, V.; SCHIMMEL, P.; MARLIÈRE, P.; CRÈCY-LAGARD, V. *Acinetobacter* sp. ADP1: an ideal model an organism for genetic analysis and genome engineering. **Nucleic Acids Research**, v.32, p.5780-5790, 2004.
- MNIF, S.; CHAMKHA, M.; SAYADI, S. Isolation and characterization of *Halomonas* sp. strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hypersaline conditions. **Journal of Applied Microbiology**, 107, 785-794, 2009.
- NAIR, C.L.; JAYACHANDRAN, K.; SHASHIDHAR, S. Biodegradation of phenol. **African Journal of Biotechnology**, v.7, 2008.
- NIE, M.; NIE, H.; CAO, W.; WANG, X.; GUO, Y.; TIAN, X.; YIN, X.; WANG, Y. Phenanthrene metabolites from a new polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Aeromonas salmonicida* subsp. *Achromogenes* strain NY4. **Journal Polycyclic Aromatic Compounds**, v.36, 2016.
- ÖMURA, S.; IKEDA, H.; ISHIKAWA, J.; HANAMOTO, A.; TAKAHASHI, C.; SHINOSE, M.; TAKAHASHI, Y.; HORIKAWA, H.; NAKAZAWA, H.; OSONOE, T.; KIKUCHI, H.; SHIBA, T.; SAKAKI, Y.; HATTORI, M. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America**, v.98, p.12215-12220, 2001.
- PRIYADHARSHINI, S.D.; BAKTHAVATSALAM, A.K. Optimization of phenol degradation by the microalga *Chlorella pyreïnoidosa* using Plackett-Burman design and response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 150-156, 2016.
- RAVIN, N.V.; RAKITIN, A.L.; IVANOVA, A.A.; BELETSKY, A.V.; KULICHEVSKAYA, I.S.; MARDANOV, A.V.; DEDYSH, S.N. Genome analysis of *Fimbriiglobus ruber* SP5^T, a planctomycete with confirmed chitinolytic capability. **Applied Environmental Microbiology**, 2018.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, Chicago, v. 4, p. 406-425, 1987.
- SANSINENEA, E.; ORTIZ, A. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. **Biotechnol Letters**, p.1523-1538, 2011.
- SCHLESNER, H. The development of media suitable for the microorganisms morphologically resembling *Planctomycetes* spp., and other Planctomycetales from various aquatic habitats using dilute media. **Systematic and Applied Microbiology**, p. 135-145, 1994.

- SATCHANSKA, G.; TOPALOVA, Y.; DIMKOV, R.; GROUDEVA, V.; PETROV, P.; TSVETANOV, C.; SELENSKA-POBELL, S.; GOLOVINSKY, E. Phenol degradation by environmental bacteria entrapped in cryogels. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.29, p.514-521, 2015.
- SCHLESNER, H.; RENSMANN, C.; TINDALL, B.J.; GADE, D.; RABUS, R.; PFEIFFER, S.; HIRSCH, P. Taxonomic heterogeneity within the *Planctomycetales* as derived by DNA-DNA hybridization, description of *Rhodopirellula baltica* gen. nov., sp. nov., transfer of *Pirellula marina* to the genus *Blastopirellula* gen. nov. as *Blastopirellula marina* comb. Nov. and emended description of the genus *Pirellula*. **International Journal for Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1567-1580, 2004.
- SIERRA-GARCIA, I.N.; OLIVEIRA, V.M. Microbial hydrocarbon degradation: efforts to understand biodegradation in petroleum reservoirs. **Biodegradation – Engineering and Technology**, capítulo 3, 2013.
- TAKETANI, R.G.; SANTOS, H.F.; VAN ELSAS, J.D.; ROSADO, A.S. Characterization of effect of a simulated hydrocarbon spill on diazotrophs in mangrove sediment mesocosm. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, p. 343-354, 2009.
- TAKETANI, R.G.; FRANCO, N.O.; ROSADO, A.S.; VAN ELSAS, J.D. Microbial community response to a simulated hydrocarbon spill in mangrove sediments. **The Journal of Microbiology**, v.48, n.1, 2010b.
- THOLL, D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. **Current opinion in Plant Biology**, v.9, p.297-304, 2006.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Multiple sequence Alignment Using ClustalW and ClustalX. **Current protocols in Bioinformatics**, 2003.
- VAN BEILEN, J.B.; FUNHOFF, E.G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.74, p. 13-21, 2007.
- VAN BEILEN, J.B.; WUBBOLTS, M.G.; WITHOLT, B. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*, **Biodegradation**, v.5, p.161-174, 1994.
- VAN NIFTRIK, L.; DEVOS, D.P.; Planctomycetes-Verrucomicrobia-Chlamydiae Bacterial Superphylum: New Model Organisms for Evolutionary Cell Biology. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
- VASCONCELLOS, S.P.; ANGOLINI, C.F.F.; SIERRA-GARCÍA, I.N.; DELLAGNEZZE, B.M.; SILVA, C.C.; MARSAIOLI, A.J.; NETO, E.V.S.; OLIVEIRA, V.M. Screening for

- hydrocarbon biodegraders in a metagenomics clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs. **Organic Geochemistry**, v. 41, p. 675-681, 2010.
- WANG, W.; SHAO, Z.; Enzymes and genes involved in aerobic alkane degradation. **Frontiers in Microbiology**, v.4, 2013.
- WIDADA, J.; NOJIRI, H.; KASUGA, K.; YOSHIDA, T.; HABE, H.; OMORI, T. Molecular detection and diversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from geographically diverse sites. **Applied Microbiology Biotechnology**, p.202-209, 2002.
- WILLIAMS, P.A.; SAYERS, J.R. The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. **Biodegradation**, p.195-217, 1994.
- WOEBKEN, D.; TEELING, H.; WECKER, P.; DUMITRIU, A.; KOSTADINOV, I.; DELONG, E.F.; AMANN, R.; GLOCKNER, F.O. Fosmids of novel marine Planctomycetes from the Namibian and Oregon coast upwelling systems and their cross-comparison with Planctomycete genomes. **The ISME Journal**, New York, v. 1, p. 419-435, 2007.
- YAMADA, Y.; CANE, D.E.; IKEDA, H. Chapter Seven- Diversity and analysis of bacterial terpene synthases. **Methods in Enzymology**, v.515, p.123-162, 2012.
- YAMAMOTO, S.; KATAGIRI, M.; MAENO, H.; HAYAISHI, O. Salicylate hydroxylase, a monooxygenase* requiring Flavin adenine dinucleotide. **The Journal of Biological Chemistry**, v.240, 1965.
- ZHOU, N-Y.; FUENMAYOR, S.L.; WILLIAMS, P.A. nag Genes of *Ralstonia* (Formely *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. **Journal of Bacteriology**, v.183, 2001.
- ZYLSTRA, G.J.; GIBSON, D.T. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. **The Journal of Biological Chemistry**, v.264, p.14940-14946, 1989.
- ZHOU, H.W.; LUAN, T.G.; ZOU, F.; TAM, N.F.Y. Different bacterial groups for biodegradation of three- and four-ring PAHs isolated from a Hong Kong mangrove sediment. **Journal of Hazardous Materials**, v.152, p.1179-1185, 2008.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese objetivou desvendar as principais funções dos Planctomycetes nos manguezais do Estado de São Paulo com diferentes graus de contaminação. A partir do levantamento da diversidade de microrganismos nos manguezais em estudo por Andreote et al., (2012), obtivemos o objetivo em descobrir tal função. Com base no acidente de derramamento de petróleo ocorrido por volta de 30 anos em Bertioga-SP, realizamos o estudo comparando com as áreas contaminadas (BrMgv01 e BrMgv02) com a área com contaminação antropogênica (BrMgv03) e uma área pristina (BrMgv04). Foram realizadas diversas análises para o melhor conhecimento dessa comunidade de bactérias, sendo análises de bioinformática como a análise de 16S, o qual inferimos a estrutura e diversidade de Planctomycetes nas diferentes áreas. A área BrMgv03 com contaminação antropogênica e com uma maior diversidade de vegetação apresentou maiores resultados de riqueza e diversidade para Planctomycetes. A partir das análises taxonômicas de 16S, inferimos análises funcionais baseados nas funções de contaminantes ambientais. Como resultado desta, encontramos as áreas BrMgv01 e BrMgv02 com maiores valores de sequências para degradação de contaminantes ambientais tais como: tolueno, xileno, naftaleno, etilbenzeno, e benzeno. Corroborando com esta predição de funcionalidade, levantamos as principais funções dessas bactérias por análises de dados metagenômicos das áreas, o qual encontramos para as áreas BrMgv02 e BrMgv01 sequências de salicilato e gentisato. Separadamente, realizamos análises clássicas de isolamento, sendo esta técnica de extrema importância para melhor conhecimento dessas bactérias com relação a fisiologia, morfologia e comportamento nutricional. Essas bactérias são gram-negativas, halotolerantes, possuem uma versatilidade metabólica visível, tem morfologia de cocos e são rosa brilhantes. Foram isoladas das áreas BrMgv02 e da área de Cananéia, além do estudo ter abrangido os isolamentos obtidos pelo mestrado da autora. Com o isolamento e as análises moleculares, o estudo genômico foi eficiente e necessário para uma busca refinada de suas funções. Foram realizados primeiramente duas análises de genomas de bactérias afiliadas ao gênero *Rhodopirellula*, sendo descritas por *Rhodopirellula* sp. MGv e *Rhodopirellula baltica* BR-MGV. Novamente os dados das análises de anotações dos genes corroboraram com as análises dos dados de metagenômica com a presença de genes de intermediários centrais das vias de degradação de compostos aromáticos. Unindo a microbiologia clássica de isolamento com estudo da genômica, aferimos a funcionalidade com ensaios de tolerância em placa de Planctomycetes frente a contaminantes encontrados em petróleos, sendo eles: hexadecano, naftaleno, fenantreno e fenol como única fonte de carbono.

Somente fenantreno não apresentou resultados positivos para tolerância e os demais, foram enviados para análise de seus genomas completos. Foram analisados cinco genomas, todos afiliados ao gênero *Blastopirellula*. As análises de genômica objetivou encontrar funções de genes envolvidos nas vias clássicas de degradação dos contaminantes expostos no ensaio de tolerância. O sucesso foi alcançado pois foram levantados proteínas como: citocromo P450, monooxygenase dependente de flavia, dioxygenase intradiol e extradiol. Cada proteína respondeu a questão inicial do capítulo relacionando-se perfeitamente a cada diferente via de degradação dos diferentes contaminantes ambientais testados em placas.

O objetivo de descobrir quem são e o que Planctomycetes estão fazendo, nos manguezais brasileiros, foi de extremo sucesso, mostrando a capacidade desses microrganismos em tolerar contaminantes ambientais tóxicos. A resposta final, sobre a capacidade dessas bactérias em degradar estes contaminantes de petróleo, virá através de análises de cromatografia, o qual serão adicionadas aos artigos que virão a ser publicados.