## Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

# Contexto genômico e expressão de genes envolvidos na redução do sulfato em solos de manguezal

## Marcus Venicius de Mello Lourenço

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

Piracicaba 2017 Marcus Venicius de Mello Lourenço Licenciatura em Ciências – Habilitação Biologia

Contexto genômico e expressão de genes envolvidos na redução do sulfato em solos de manguezal versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

> Orientador: Profa. Dra. MARLI DE FATIMA FIORE

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

Piracicaba 2017

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

Lourenço, Marcus Venicius de Mello

Contexto genômico e expressão de genes envolvidos na redução do sulfato em solos de manguezal / Marcus Venicius de Mello Lourenço. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. Piracicaba, 2017

88 p.

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

1. Ciclo do enxofre 2. Metagenomica 3.Fosmideo. I. Título

# DEDICATÓRIA

Aos meus pais Adevair e Regina pelo apoio, educação, e por me fazer existir. DEDICO

A todos que contribuiram de alguma forma para que eu chegasse ate aqui.

OFEREÇO

#### AGRADECIMENTOS

A ESALQ/USP e ao programa de pós-graduação em de Microbiologia Agrícola por todos os aprendizados ao longo desses anos.

As minhas orientadoras Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner (*in memorian*) e Profa. Dra. Marli de Fatima Fiore, pela confiança e pelo privilegio de fazer parte de suas equipes de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote me permitir fazer parte de sua equipe e usufruir do Laboratório de Microbiologia do Solo.

A Dra. Valeria Maia de Oliveira pela gentileza de ceder à biblioteca metagenomica utilizada nesse estudo.

Aos meus grandes amigos Rapahel Tozelli Carneiro ("Tozado"), Ana Letica Bertolo ("Tubaina"), e sua filha Ana Ligia, Walter Fernado Bernadi ("Azeitona"), Mairys Amanda Borges Rodrigues, e seus filhos Guilherme e Henrique, Fernado Dini Andreote ("Gersy") e Cristane Cipola Fasanella Andreote ("Kit") e seus filhos Filipe, Giovanni e Clara, Francisco Dini Andreote, Maria Julia Lima Brossi, Ana Paula Dini Andreote, Felipe Cardena e a pequena Alicia, pelas viagens, festas, churrascos, convivência, aprendizado e por me mostrarem que amizade verdadeira ainda pode existir – amo vocês!!!!

Aos colegas do laboratório de microbiologia do solo Alessandra Rigoto, Ademir Durrer, Armando C.F. Dias, Cristiane C. F. Andreote, Danice M. Luvizotto, Daniela Veja, Danielle Santos, Diogo P. Costa, Dorotéia A. Ferreira, Fábio L. Soares Jr., Filipe Salvetti, Julia E. Lima Perin, Juliana E. Araújo, Kelly Alves, Luana L. Cadete, Lucas D. Lopes, Maryeimy V. Lopez, Michele de Cássia Pereira e Silva, Mayra Costa, Mylenne C. P. Silva, Pedro A. M. Andrade, Simone R. Cotta, Sonia Pires, Thiago Gumiere, pela convivência quase sempre harmônica. Aos colegas do laboratório de microbiologia de cianobactérias Janaina Rigonato, Vinicius Augusto Carvalho de Abreu, Stella Thomaz de Lima, Ana Paula Dini Andreote pela ajuda na utilização do laboratório.

Ao Dr. Itamar soares de Mello e Dr. Rodrigo Mendes pela ajuda e gentileza concedidas na EMBRAPA meio ambiente, e Dr. Rodrigo Gouveia Taketani pela colaboração no sequenciamento das amostras.

A secretaria do PPG-Microbiologia Agrícola Maria Fernanda Almeida Prado pela ajuda com a burocracia.

A Coordenação de Aperfeicoamento de Pessoal de Nivel Superior -CAPES- pela concessão da bolsa.

Aos funcionários do departamento de ciência do solo da ESALQ/USP.

Enfim a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho o meu muito obrigado!!!

#### EPÍGRAFE

"Eu acredito na capacidade de se concentrar fortemente em algo, então você é capaz de extrair ainda mais disso. Tem sido assim toda a minha vida, e foi só uma questão de melhorar isso, e aprender mais e mais e praticamente não há um fim. Conforme você avança, você continua encontrando mais e mais. É muito interessante, é fascinante."

Ayrton Senna

# SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 O ECOSSISTEMA MANGUEZAL	16
1.2 DIVERSIDADE MICROBIANA EM SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS NO BRASIL	17
1.3 CICLO DO ENXOFRE	19
1.4 REDUÇÃO DISSIMILATIVA DO SULFATO	21
1.5 GRUPOS ENVOLVIDOS NO CICLO DO ENXOFRE EM SOLOS DE MANGUEZAIS	22
1.6 Fosmideos e análise de contexto genômico	24
1.7 METATRANSCRIPTOMICA	25
2. OBJETIVOS E HIPÓTESES	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 ÁREAS DE ESTUDO E AMOSTRAGEM	31
3.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS SOLOS DOS MANGUEZAIS	33
3.3 OBTENÇÃO DA BIBLIOTECA METAGENÔMICA	33
3.4 Extração e sequenciamento de DNA fosmidial da biblioteca metageno	ĴMICA35
3.5 TRATAMENTO DAS SEQUÊNCIAS, MONTAGEM E ANOTAÇÃO DOS CONTIGS	35
3.6 RASTREAMENTO DE CLONES CONTENDO O GENE <i>DSR</i> B	36
3.7 SEQUENCIAMENTO DOS CLONES POSITIVOS NA PLATAFORMA ION TORRENT	37
3.8 TRATAMENTO DAS SEQUENCIAS E MONTAGEM DOS CONTIGS	38
3.9 ANOTAÇÕES DOS GENES RELACIONADOS AO CICLO DO ENXOFRE	38
3.10 Afiliação Filogenetica das sequências do gene <i>dsr</i> b contidas nos	CONTIGS
	39
3.11 Afiliação Taxonomica dos contigs contendo o gene <i>dsr</i> B	40
3.12 Análise de sintenia dos genes relacionados à tranformação do enx	ofre 40
3.13 METATRANSCRITÔMICA RELACIONADA À TRANFORMAÇÃO DO ENXOFRE EM S	OLOS DE
MANGUEZAIS	40
4. RESULTADOS	43
4.1 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA METAGENÔMICA E DETECÇÃO DOS CLONES CON	TENDO O
GENE <i>DSR</i> B	43

0. ( RF	EFERÊNCIAS						
6 (		72					
5. I	DISCUSSÃO	65					
4	4.7 ANÁLISES DE METATRANSCRIPTÔMICA	60					
4	4.6 ANÁLISE DE SINTENIA						
4	4.5 AFILIÇÃO FILOGENÉTICAS DO GENE DSRB						
F	FRAGMENTOS GÊNICOS AVALIADOS						
4	4.4 AFILIAÇÕES TAXONÔMICAS DOS INSE	ERTOS MICROBIANOS PRESENTES NOS					
4	4.3 SEQUENCIAMENTO, MONTAGEM E ANOTAÇÃO DA BIBLIOTECA METAGENÔMICA 44						
4	4.2 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE INSERTOS CONTENDO O GENE DSRB						

#### RESUMO

#### Contexto genômico e expressão de genes envolvidos na redução do sulfato em solos de manguezal

Os manguezais compõem um bioma de interface entre o continente e o oceano em regiões intertropicais, ambiente este caracterizado por condições únicas ambientais e uma elevada biodiversidade. Este projeto tem como objetivo estudar, utilizando abordagens de metagenômica e metatranscriptomica, as comunidades microbianas encontradas nos manguezais localizados nos municípios de Bertioga/SP e Cananeia/SP, com enfogue nos genes relacionados ao processo de redução do sulfato. Para tanto, uma biblioteca metagenômica contendo 12.960 clones em vetor fosmídeo foi triada por meio de PCR específico para o gene dsrB, ao mesmo passo que esta foi completamente seguenciada em plataforma Illumina HiSeg2000. Foram obtidos três insertos metagenomicos (23D5, MGV 10001431 e MGV 10016026, com 31, 31 e 34 kb, respectivamente). Estes foram então anotados e analisados mais detalhadamente. A inserção 23D5 foi a única a apresentar genes essenciais para a redução dissimilatória do sulfato (apr, hdr, dsr, sat). A diversidade taxonômica dos grupos relacionados ao ciclo do enxofre demonstrou a predominância dos filos Bacteroidetes e Proteobacteria enquanto a análise filogenética para gene dsrB apresentou diferenças entre os três insertos, afiliando os mesmos a sequências similares a Firmicutes e Deltaproteobacteria e revelando serem diferentes das sequências presentes em base de dados. A análise de metatrascriptomica dos quatro manguezais apresentou um padrão de expressão diferencial para o cluster dsr de acordo com o estado de conservação dos manguezais estudados. Estes resultados compõem o primeiro acesso a fragmentos genômicos e a funcionalidade dos mesmos em microrganismos redutores de sulfato em solos de manguezais.

Palavras-chave: Ciclo do enxofre; Metagenomica; Fosmideo

#### ABSTRACT

# Genomic context and expression of genes involved in sulfate reduction in mangrove soils

Mangrove is a biome composed of the interface between the continent and the ocean in tropical areas, characterizing by unique environmental conditions and high biodiversity. Here, we aimed to study, using metagenomic and metatranscriptomic approaches, the microbial communities identified in the mangroves located in the cities of Bertioga/SP and Cananeia/SP, focusing on genes related to the sulfate reduction process. For this purpose, a metagenomic library containing 12.960 clones in fosmid vector was screened by PCR for the specific dsrB gene, and the whole library was also completely sequenced by the Illumina HiSeq2000 platform. Three metagenomic inserts were obtained (23D5, MGV 10016026 and MGV 10001431, with 31, 31 and 34 kb, respectively), which were recorded and detail analyzed. The insertion 23D5 was the only one that presents essential genes for dissimilatory sulfate reduction (apr, hdr, dsr, sat). The taxonomic diversity of groups related to the sulfur cycle demonstrated the predominance of Bacteroidetes and Proteobacteria phyla, while phylogenetic analysis to dsrB gene showed differences between the similar three inserts. affiliating them sequences of Firmicutes to and Deltaproteobacteria, and revealing differ from the sequences present in the data base. The metatranscriptomic analysis of the four mangroves showed a pattern of differential expression for the DSR cluster according to the conservation status of the studied mangroves. These results constitute the first access of genomic fragments and functionality of the sulfate reducing microorganisms in mangrove soils.

Keywords: Sulfur cycle; Metagenomic; Fosmid

#### **LISTA DE FIGURAS**

#### Figura 1. Ciclo biogeoquímico do enxofre......20

Figura 5. Organização genômica do locus *dsr*B, de toda inserção, dos insertos da biblioteca metagenomica. Os quadros de leitura aberta (ORFs) identificados são mostrados em setas, e o start, stop códons e direção de codificação são indicados. As ORFs são indicadas por cores de acordo com a sua categoria funcional. Mais detalhes sobre a função atribuída para cada ORF são indicados nas tabelas 3, 4 e 5.

Figura 9. Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *dsr*B presente nos insertos metagenomicos 23D5, MGV 10001431 e MGV 100016026, com as sequências disponíveis nas bases de dados públicas do UNIPROT e *GenBank*. A filogenia foi determinada pelo método neighbor joining e a relação entre as sequencias foi inferida usando o método muscle, os dados observados nos ramos indicam os valores de bootstrap acima de 50% de um total de 1000 repetições..... 57

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das quatro áreas de manguezais estudadas
Tabela 2. Características dos solos de manguezais utilizados neste estudo. Os pontos de amostragem foram divididos em OilMgv (BrMgv01 e BrMgv02), AntMgv (BrMgv03) e PrsMgv (BrMgv04)
Tabela 3. Anotação das ORFs presentes no inserto 23D5.
Tabela 4. Anotação das ORFs presentes no inserto MGV 10001431 47
Tabela 5. Anotação das ORFs presentes no inserto MGV 10016026 50

#### 1. INTRODUÇÃO

Dentre os ecossistemas terrestres, alguns chamam atenção devido a particular combinação de condições ambientais, que resultam na evolução de espécies capazes de colonizar restritamente esses ambientes. Os manguezais são áreas localizadas nas planícies de inundação das marés, compondo um dos ambientes naturais mais degradados no Brasil, onde ocorrem sérios impactos ambientais. O Brasil tem uma das maiores extensões de manguezais do mundo, desde o Cabo Orange no Amapá, até o município de Laguna em Santa Catarina, abrangendo uma área de 25.000 Km<sup>2</sup>.

Dentre os grupos de organismos encontrados no ecossistema manguezal, os microrganismos apresentam papel fundamental na manutenção dos ciclos vitais neste ambiente, onde possuem como principal função a ciclagem de nutrientes, o que resulta na interação destes com os demais organismos presentes no ecossistema, em especial as plantas. Embora ecossistemas de manguezais sejam ricos em matéria orgânica, estes são deficientes em nutrientes, especialmente nitrogênio e fosforo, que apesar de serem abundantes não se encontram disponíveis, por ser o manguezal um ambiente redutor. Isto justifica a importância dos microrganismos neste ambiente, onde atuam diretamente na disponibilização destes nutrientes.

Mesmo com o desenvolvimento de técnicas de estudo de ecologia microbiana de maneira independente de cultivo, a maioria dos estudos acessa apenas a diversidade destas comunidades, focando as análises em genes ribossomais, como 16S rDNA, inferindo sobre alterações na composição destas comunidades. Estes estudos deixam em aberto respostas sore alterações funcionais dentro da microbiota. Dessa forma, o uso de metodologias que acessam o funcionamento dos grupos microbianos nos manguezais, bem como a descrição dos grupos que hospedam genes relacionados a importantes transformações neste sistema, é importante no avanço do conhecimento sobre este ambiente único, encontrado apenas em regiões tropicais e subtropicais de nosso planeta.

Por ser um ambiente redutor, os solos de manguezais preservam características peculiares, como a utilização do sulfato como aceptor final de elétrons, sendo este utilizado como base metabólica da microbiota. Este ponto merece atenção, uma vez que pouco se sabe sobre a diversidade microbiana

envolvida neste processo, sendo os estudos já realizados apenas focados em um gene marcador, o *dsr*B.

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de acessar genes importantes no ciclo biogeoquímico do enxofre em solos de manguezais, descrevendo o contexto genômico em que estes ocorrem, e a expressão gênica dos mesmos em manguezais sob distintos históricos de contaminação.

#### 1.1 O ecossistema manguezal

O manguezal é um ecossistema costeiro localizado em regiões de interface entre os ambientes terrestre e marinho, uma área úmida característica de zonas tropicais e subtropicais (HOLGUIN; VAZQUEZ, BASHAN; 2001; THATOI et al., 2013). Consiste em um ambiente único que apresenta condições de alta salinidade e temperatura, muito lodo, solo anaeróbico e rico em matéria orgânica (GHIZELINI et al., 2012; KRAUSS et al., 2014). Dessa forma, o manguezal abriga diversas plantas e microrganismos com adaptações ecofisiológicas para viver nessas condições (ALONGI, 2009, THATOI et al., 2013).

O ecossistema de manguezal apresenta-se amplamente distribuído geograficamente, cobrindo cerca de 60 a 75% da linha costeira mundial. O Brasil, a Indonésia e a Austrália são os países mais abundantes em ecossistemas de manguezais, sendo que só na América Latina, encontram-se cerca de 400.000 hectares (HOLGUIN; VAZQUEZ, BASHAN; 2001, 2006, GIRI 2008; ELLEGAARD et al., 2014). No Estado de São Paulo, na região da baixada santista, formada pelos municípios de Bertioga, Cubatão, Guarujá, Itanhaém, Mongaguá, Peruíbe, Praia Grande, Santos e São Vicente; encontra-se uma das maiores concentrações de manguezais do estado, apresentando uma área de 231 Km<sup>2</sup> (CUNHA-LIGNON, 2009, DUKE, et al 2007).

Esses ecossistemas apresentam elevada importância econômica e ecológica nas regiões costeiras, onde desempenham um papel fundamental como fonte de entrada de nutrientes para manutenção das cadeias alimentares estuarias e marinhas (HOLGUIN; VAZQUEZ, BASHAN, 2001), onde reside uma grande produtividade biológica com alta diversidade de peixes, crustáceos, moluscos, aves, répteis e mamíferos, sendo um dos ambientes mais produtivos do mundo. Toda esta

diversidade exige uma alta ciclagem de nutrientes no início da cadeia trófica (DIAS et al., 2009).

Apesar do seu elevado valor econômico e ecológico, os manguezais encontram-se entre os ecossistemas mais ameaçados do mundo, atingindo o nível de risco de extinção. Isto se deve aos impactos negativos de diversas origens devido à presença das muitas atividades antropogênicas, tais como expansão urbana desordenada, poluição e presença de polos industriais e petroquímicos, portuário, pesqueiro e exploração mineral, desenvolvidas em suas áreas próximas (OLIVEIRA et al., 2007; SANTOS et al., 2010). Uma das atividades que geram maior impacto no ecossistema são os vazamentos de petróleo, cujo efeito pode durar até 20 anos (BURNS et al., 1994), podendo provocar desfolha das árvores, impedindo seu crescimento adequado, influenciando diretamente a sua sobrevivência e fazendo com que a recuperação dessas áreas seja difícil e de custo elevado (SANTOS et al., 2010).

#### 1.2 Diversidade microbiana em sedimentos de manguezais no Brasil

Os manguezais são ambientes altamente variáveis e dinâmicos permitindo o sucesso ecológico de muitos grupos microbianos. Essa diversidade pode variar com o local, a profundidade, a sazonalidade e as condições físicas e químicas do ambiente que exercem pressão seletiva sobre as comunidades microbianas, sua estrutura e funcionalidade (DIAS et al., 2010; VARON-LOPEZ et al., 2013).

A comunidade microbiana em manguezais exerce papel fundamental no bom funcionamento desse ecossistema, exibindo grande diversidade taxonômica e funcional. Processos importantes, como a ciclagem de nutrientes do manguezal, estão diretamente relacionados com a atividade e diversidade das comunidades microbianas que formam a base da cadeia alimentar da flora e fauna desse ecossistema. É possível formular a hipótese de que na ausência ou redução da microbiota, haverá prejuízo nas atividades comerciais e ecológicas, e possivelmente a destruição dos ecossistemas de manguezais (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN. 2001, THATOI et al., 2013). Portanto, o conhecimento das comunidades microbianas dos manguezais é de grande relevância para entender melhor a dinâmica desse ecossistema, destacando sua preservação e manutenção (HOLGUIN; VASQUEZ; BASHAN; 2001; THATOI, et al., 2013).

Em relação às áreas amostradas no presente estudo (Cananéia e Bertioga), os grupos de bactérias, arquéias e fungos foram descritos de maneira independente de cultivo. O grupo das bactérias foi acessado pela metodologia de biblioteca de clones, onde 166 sequências foram obtidas a partir de amostras de sedimento do manguezal localizado na cidade de Cananéia (DIAS et al., 2010). A análise das sequências revelou a predominância de bactérias afiliadas a Alphaproteobacteria (40,36%), Gammaproteobacteria (19,28%) e Acidobacteria (27.71%), enquanto que grupos minoritários se afiliaram a Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes (DIAS et al., 2010). Em uma análise incluindo manguezal Cananéia utilizando 0 de а metodologia de pirosequenciamento, foi utilizada com base no gene ribossomal 16S RNAr, observando uma configuração diferenciada desta comunidade, mostrando uma prevalência de sequencias afiliadas a Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria em ambos os manguezais (VARON-LOPEZ, 2013).

A composição das comunidades de arquéias foi descrita nos manguezais de Cananéia e Bertioga baseadas no sequenciamento de genes ribossomais. Inicialmente, a descrição foi feita com base em uma amostra composta de todos os manguezais, representados por 81 sequências, indicando uma predominância de sequências afiliadas a Thaumarcheaota (54,3%) e Euryarcheaeota (29,6%), além da presença de um grupo não afiliado a filos conhecidos (16,1%) (DIAS et al., 2011). No entanto, a análise separada para cada uma das áreas, e com base na metodologia de pirosequenciamento, indicou a predominância de Crenarchaeota (48,6%), Euryarchaeota (42,6%) e arquéias não classificadas (8,7%) (VARON-LOPEZ, 2013).

Para o grupo dos fungos, além da análise comparativa das áreas por meio de PCR-DGGE, foi realizada uma descrição com base em sequenciamento da região ITS, onde foram analisadas apenas amostras dos manguezais localizados na cidade de Bertioga. Nesta análise foram utilizadas 180 sequências, as quais indicaram a predominância de grupos afiliados a Epicoccum, Nigrospora, Cladosporium e basidiomicetos não identificados (FASANELLA et al., 2012)

A fim de demonstrar de maneira detalhada essa diversidade encontrada em manguezais do Estado de São Paulo (Bertioga e Cananéia), foi feita uma análise onde o DNA total das amostras foi sequenciado por pirosequenciamento. Dentro os grupos encontrados houve o domínio dos filos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, e Chloroflexi (ANDREOTE et al., 2012). Essas comunidades atuam de maneira dinâmica no fluxo de energia nestes ambientes em processos associados ao ciclo do nitrogênio (amonificação, desnitrificação e fixação de nitrogênio) e do enxofre (oxidação e redução) (ANDREOTE et al., 2012; DIAS et al., 2012; VARON-LOPEZ et al., 2014).

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

#### 1.3 Ciclo do enxofre

O enxofre é o decimo elemento mais abundante no planeta Terra, encontrando-se presente principalmente como pirita (FeS<sub>2</sub>) ou sulfato de cálcio (CaSO4) em rochas e sedimentos, e na forma de sulfato em oceanos (MUYZER, STAMS, 2008). Na natureza, o enxofre é um elemento essencial para os organismos, compondo, aproximadamente, 1% do peso seco de uma célula bacteriana, com grande importância para a síntese dos aminoácidos cisteína e metionina, como também de algumas vitaminas, hormônios e coenzimas (SIEVERT et al, 2007, TOSTEVIN et al., 2014). O ciclo do enxofre (Figura 1) é complexo, uma vez que este elemento possui uma ampla gama de estados de oxidação, variando de -2, na forma de sulfureto (completamente reduzido) a + 6, na forma de sulfato (completamente oxidado). Este ciclo pode-se dividir em duas partes: a via assimilativa e via dissimilativa (GREIN et al., 2013). A primeira inclui assimilação de sulfureto e sulfato, enquanto a via dissimilativa inclui processos oxidativos (oxidação de enxofre) e processos redutores, tais como redução do enxofre e sulfato (MUYZER; STAMS, 2008; BARTON; FAUQUE, 2009; JAMES, 2014).



Figura 1. Ciclo biogeoquímico do enxofre. Fonte: adaptado de MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2002.

O maior reservatório de enxofre biologicamente disponível na Terra é o sulfato no oceano, mas uma enorme abundância de enxofre ocorre contido em sulfeto de rocha e minerais de sulfato (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2005). O ciclo do enxofre é influenciado pela atividade metabólica microbiana e está fortemente ligado a outros ciclos biogeoquímicos, como os ciclos do carbono, do ferro, do oxigênio e do nitrogênio. Todos os organismos assimilam enxofre para a produção de cisteína, metionina e componentes enzimáticos. Por outro lado, diversos grupos de procariontes utilizam compostos de enxofre como fontes de energia para o crescimento celular, fixação de carbono e respiração anaeróbica. Os procariontes oxidantes de enxofre estão representados em diversos grupos filogenéticos (FRIEDRICH et al., 2001; FRIEDRICH et al., 2005), e podem oxidar uma variedade de compostos de enxofre, incluindo o enxofre elementar, polissulfureto, tiossulfato, sulfito, e sulfureto, em reacções redox com uma variedade de aceitadores de elétrons incluindo O<sub>2</sub>, NO<sup>3-</sup>, Mn <sup>+3/+4</sup>, e Fe <sup>+3</sup>. A redução do sulfato é um processo importante em sedimentos marinhos anaeróbicos, onde se estima que os procariontes redutores de sulfato sejam responsáveis por metade de oxidação do carbono orgânico global (CANFIELD et al., 1993; THULLNER et al., 2009; BOWLES et al., 2014). Os procariontes redutores de sulfato também têm sido alvos de estudo devido a sua importância em relações sintroficas com arqueias

anaeróbias oxidante de metano (SCHINK, 2006), sendo este consórcio sintrófico abundante em alguns sedimentos marinhos (HINRICHS; BOETIUS, 2003).

#### 1.4 Redução dissimilativa do sulfato

A respiração do sulfato é um processo anaeróbio realizado por um grupo filogeneticamente diversificado de organismos, distribuídos entre os domínios Bactéria e Archaea. Este processo é um dos principais contribuintes para o ciclo global do enxofre e carbono em ambientes anaeróbios, e tem impactos ambientais e econômicos muito importantes (MUYZER; STAMS, 2008; BARTON; FAUQUE, 2009). Procariotos redutores de sulfato são encontrados em ambientes ubiquamente anaeróbicos, e são particularmente abundantes nos habitats marinhos, devido à alta concentração de sulfato na água do mar (RAMOS et al., 2012).

O sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) é um composto quimicamente inerte, não volátil e não tóxico encontrado normalmente difundido em rochas, solos e águas. Pode ser reduzido por duas vias distintas: a assimilativa e a dissimilativa. Na via dissimilativa, o sulfato é o receptor final de elétrons da cadeia respiratória das bactérias redutoras de sulfato, as quais investem uma molécula de trifosfato de adenosina (ATP) para ativar o sulfato através de uma sulfurilase de ATP, produzindo fosfosulfato de adenosina (adenosine phosphosulphate, APS) e pirofosfato inorgânico (PPi). Após a ativação, o APS é reduzido pela redutase do APS para formar sulfito (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) e monofosfato de adenosina (adenosina (adenosine monophosphate, AMP). O SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> é então reduzido a sulfureto de hidrogénio (H<sub>2</sub>S) por uma redutase dissimilativa de sulfito, transformação que pode acontecer por duas vias: redução direta do sulfito a sulfureto e via tritionato (ONTIVEROS-VALENCIA, 2012; BRADLEY, LEAVITT, JOHNSTON; 2011).

A redução dissimilativa do sulfato é realizada por vários gêneros de bactérias redutoras de sulfato. Inúmeros estudos foram realizados de forma a compreender a transferência de elétrons na cadeia respiratória destes organismos, e foi proposto que a conservação de energia é realizada por complexos membranares de transporte de elétrons, nomeadamente os complexos QmoABC e *dsr*MKJOP, cujas subunidades de cada encontram-se relacionadas com as heterodisulfureto redutases (*hdr*) de organismos metanogênicos, sendo também capazes de interatuar

com as quinonas (DAHL; FRIEDRICH, 2008; RAMOS et al. 2012, PIRES et al. 2006, MUSSMANN, et al. 2005).

As enzimas dSiR (dissimilatórias sulfito redutases) estão compostas de duas subunidades, *ds*rA e *dsr*B, originadas a partir da duplicação do gene primitivo de dsr, antes da separação dos domínios Archaea e Bactéria (OLIVEIRA et al., 2011). Estes genes codificam para a enzima redutase dissimilatória de sulfito (dSiR), a qual é responsável pela redução do sulfato para sulfeto de hidrogênio, tendo funcionalidade apenas em condições anaeróbias (MUYZER; STAMS, 2008). Esses genes apresentam regiões conservadas dentre os procariotos redutores de sulfato, e são uns dos genes mais utilizados na caracterização dessas comunidades (MUYZER; STAMS, 2008; VARON-LOPEZ et al., 2014). Esse sistema para a detecção de grupos microbianos redutores de sulfato, baseado nos genes funcionais *dsr*A e *dsr*B, é alvo tanto da quantificação por PCR em tempo real, como de estudo de diversidade por meio de clonagem e sequenciamento (GEETS et al., 2006; VARON-LOPEZ et al., 2014).

#### 1.5 Grupos envolvidos no ciclo do enxofre em solos de manguezais

O processo de redução dissimilatória de sulfato, ou respiração do sulfato, é um dos principais mecanismos associados à degradação da matéria orgânica nos manguezais, visto que esse é um ambiente onde a concentração do oxigênio é extremamente baixa, levando a necessidade de utilizar outro aceptor final de elétrons para sustentar o metabolismo microbiano (HEIDELBERG et al., 2004).

A redução dissimilatória do sulfato é um processo metabólico fundamental para o ciclo biogeoquímico do enxofre e carbono em sedimentos marinhos. O sulfato é um dos ânions mais comum em águas e está presente em grandes quantidades nos estuários e oceanos (BLAZEJAK; SCHIPPERS, 2011). A maioria das plantas e microrganismos podem utilizar o sulfato como sua única fonte de enxofre, convertendo esta molécula para compostos sulfidrilas ou sulfato de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), sendo este último tóxico a muitos microrganismos (MUYZER; STAMS, 2008).

O H<sub>2</sub>S é produzido durante a decomposição da matéria orgânica pela redução dissimilatória do sulfato. As bactérias redutoras de sulfato têm um grande papel na mineralização do enxofre orgânico e na produção de ferro e fósforo solúvel,

que são utilizados por outros organismos nos manguezais, tendo também contribuição na fixação de nitrogênio (N<sub>2</sub>) (RABUS, 2006).

A redução do sulfato é um dos processos responsáveis pela degradação anaeróbia de compostos orgânicos. Estudos de enriquecimento com lactato ou H<sub>2</sub>, indicam que principal fração da comunidade redutora de sulfato é composta das espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Desulfovibrium* (POHORELIC et al., 2002). No entanto, utilizando enriquecimento com outras fontes de carbono, esta diversidade aumentou significativamente, principalmente quando a avaliação foi feita por meio de metodologias independentes de cultivo (SCHEID; STUBNER, 2001). Foram determinandos três principais grupos envolvidos nesta função; as famílias *Desulfovibrionaceae* e *Desulfobacteraceae* e o gênero *Desulfobulbus*, todas pertencentes à classe Deltaproteobacteria.

Com base na análise comparativa de sequências do gene ribossomal 16S rDNA, as bactérias redutoras de sulfato, podem ser agrupadas em 7 grupos filogenéticos, 5 dentro do grupo bactéria e 2 dentro das arquéias. Muitos dos redutores de sulfato pertencem a 23 gêneros dentro da classe Deltaproteobacteria, seguidos do filo Firmicutes e, dentro dele, a classe Clostridia, com destague para os gêneros Desulfotomaculum, Desulfosporosinus e Desulfosporomusa, além dos filos Thermodesulfovibrio), Nitrospira (gênero Thermodesulfobacteria (gênero Thermodesulfobacterium) e Thermodesulfobiaceae (familia Thermodesulfobium). Dentro do domínio Archaea, o gênero Archaeoglobus, em Euryarchaeota e os gêneros Pyrobaculum, Thermocladium e Caldirvirga em Crenarchaeota, têm destaque neste processo (LIU; BEER; WHITMAN, 2012; MUYZER; STAMS, 2008; ZHOU et al., 2011). Até agora, a sua distribuição polifilética foi mais parcimoniosamente explicado pelas transferências horizontais múltiplas de genes, fornecendo evidências de que a transferência horizontal de um conjunto de genes pode ser de fato responsável pela distribuição desigual de redutoras de sulfato procariontes na árvore filogenética (MUSSMANN et al., 2005).

Em sedimentos dos manguezais, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Deltaproteobacteria são os grupos mais abundantes associados com o ciclo do enxofre (DOS SANTOS et al., 2011; PEIXOTO et al., 2011; ANDREOTE et al., 2012). Taketani e colaboradores (2010) salientaram a ocorrência de grupos únicos de sequências do gene *dsr*B em sedimento do manguezal de Cananéia, evidenciando a importância deste processo nesse ambiente. Além disso, foi observada a ocorrência de um grupo de microrganismos que muito provavelmente são exclusivos desse sistema, taxonomicamente afiliados com Deltaproteobacteria (VARON-LOPEZ, 2013).

#### 1.6 Fosmideos e análise de contexto genômico

A grande maioria das ferramentas disponíveis para o estudo da microbiota ambiental infere sobre dados de apenas um gene, com grande destaque neste ponto para os genes ribossomais (LOUWS et al., 1999). Dessa forma, dificilmente os resultados obtidos para tais genes podem ser relacionados com a funcionalidade dos grupos identificados em determinada amostra.

Apesar de algumas metodologias, como a marcação de DNA com isótopos estáveis (SIP) buscarem esta ligação, ainda não existe uma metodologia eficiente de associar a filogenia de grupos microbianos, com suas funções no ambiente onde são encontrados (HUNAG et al., 2009, DUMONT et al., 2011). Dentro deste contexto, a possibilidade de se explorar sequências de fosmídeos, obtidos a partir da clonagem de DNA ambiental, pode fornecer importantes informações sobre o contexto genômico dos microrganismos que vivem na área estudada (SUENAGA et al., 2012, MUSSMAM, et al., 2005).

Fosmideos são vetores de clonagem que se baseiam no plasmídeo Fbacteriano, que conseguem suportar inserções de DNA de até 40 kb de tamanho, onde, muitas vezes, a fonte do elemento de inserção do DNA genômico é aleatória. Uma biblioteca de fosmídeos é preparada pela extração de DNA genômico do ambiente visando a sua clonagem (HALL, 2004). Dentro deste contexto, a possibilidade de se explorar sequências de fosmídeos, obtidos a partir da clonagem de DNA ambiental, pode fornecer importantes informações sobre o contexto genômico dos microrganismos que vivem na área estudada.

Com a finalidade de se focar neste tipo de estudo, a busca de genes candidatos, envolvidos em funções particulares, e de interesse no ambiente acessado, pode ser uma estratégia interessante. Esta metodologia oferece uma alternativa para a exploração do potencial metabólico de microrganismos que não são recuperados por métodos baseados em cultivo. O método consistiu-se inicialmente na clonagem de fragmentos grandes de DNA (40 a 100 kb), obtido a partir de amostras ambientais, em vetores do tipo BAC (Bacterial Artificial

Chromosome) ou fosmídeos, e análise das bibliotecas resultantes em busca de uma nova expressão fenotípica na linhagem hospedeira de *Escherichia coli* (HANDELSMAN et al., 1998, SUENAGA 2012). Com o objetivo de compreender a organização gênica em função da adaptabilidade ao ambiente, genes alvos são selecionados e iniciar a busca de fosmídeos contendo os mesmos. O trabalho de Brochier-Armanet e colaboradores (2011) usou este tipo de análise em insertos fosmidiais originários de arquéias planctônicas não cultivadas. Outros autores descrevem uma elevada taxa de transferência horizontal de genes nestes organismos, relacionando isto a capacidade de adaptação destes organismos ao ambiente marinho (SUENAGA, 2012, MUSSMANN, et al. 2005).

Conclusivamente, o uso da estratégia metagenômica a partir de fosmídeos permite ainda combinar a busca de genes funcionais com a análise de sequências de genes ribossomais, o que pode representar um mecanismo para se estabelecer relações entre filogenia e função e ajudar a elucidar o papel ecológico dos componentes da microbiota em diferentes ecossistemas.

#### 1.7 Metatranscriptomica

Além da análise do DNA ambiental, existe a possibilidade de se basear as análises de sequenciamento de segunda geração na porção funcional da molécula microbiana, utilizando moléculas de RNA como molde, num tipo de estudo este denominado de metatranscriptômica. Neste contexto, a metatranscriptômica aparece como uma metodologia poderosa para determinar padrões de expressão gênica de comunidades microbianas sem prévias inferências sobre a atividade metabólica de grupos dominantes, ou especificidade para o estudo de alguns genes específicos, como é feito pela metodologia de PCR em tempo real (PORETSKY et al., 2005; FRIAS-LOPEZ et al., 2008 , ZHI et al., 2014). Em contraste com a metagenômica, que fornece uma análise sobre a estrutura genética da comunidade, a metatranscriptômica identifica quais destes genes estão sendo transcritos no ambiente avaliado (GILBERT et al., 2008; PORETSKY et al., 2010).

O sequenciamento e análise in silico de RNA mensageiro (metatranscriptomica) está sendo aplicado rotineiramente para as comunidades microbianas complexas em diversas ecossistemas, incluindo, solo (BAILLY et al 2007; URICH et al; 2008; DAMON et al, 2012), marinho (GILBERT et al, 2008; 26

MARCHETTI et al, 2012; ) e intestinal (GOSALBES et al, 2011) entre outros. Os típicos da metatranscriptomica são classificar taxonomicamente objetivos transcrições, prever suas funções e quantificar suas abundâncias, e relacioná-los com os dados ambientais, a fim de revelar como as condições ambientais impactam comunidades as microbianas em diferentes habitats (TOSELAND et al, 2014). Este tipo de análise só se torna possível devido ao advento da segunda geração de sequenciadores, com destaque para aos que produzem maior número de sequências (PORETSKY et al., 2005, 2009; FRIAS-LOPEZ et al., 2008; URICH et al., 2008; HEWSON et al., 2009a), elevando em várias ordens de grandeza o tamanho dos datasets analisados. Permanece ainda para ser determinado, qual o valor de cobertura que as bibliotecas metatranscriptômicas estão sendo analisadas, o que se torna importante se considerarmos que, ao analisar uma biblioteca com baixa cobertura as sequências dominantes poderão ser advindas de processos metabólicos realizadas na grande maioria dor organismos presentes nas amostras, limitando nossas inferências sobre processos realizados por grupos específicos presentes no ambiente alvo do estudo (HEWSON et al., 2009b; PORETSKY et al., 2009).

Neste sentido, Shrestha e colaboradores (2009) demonstraram que tal análise é eficiente em identificar os grupos ativos, bem como as atividade microbianas metabólicas abundantes, em comunidades bacterianas do solo. No entanto, os autores também destacam a importância do número e tamanho das sequências obtidas para a correta inferência taxonômica e funcional. Analisando amostras de comunidades microbianas marinhas, Gilbert e colaboradores (2008) descrevem observações similares, com a alta eficiência desta metodologia, e destacam a possibilidade de detectar genes pertencentes a muitas famílias nunca anteriormente descritas em análises baseadas em moléculas DNA. de Recentemente Cabral e colaboradores (2016) analisaram o metaranscriptoma de dois manguezais sob distinto histórico de preservação, um na cidade de Bertioga, contaminado, e um na cidade de Cananéia, sob condições pristinas. Esta análise demonstrou que os microrganismos ativos mais abundantes nos sedimentos de manguezais contaminados e pristinos estavam relacionados com os genomas de Desulfobacterium autotrophicum HRM2 e Desulfatibacillum alkenivorans AK-01, respectivamente, com funções específicas relacionadas com a resistência a xenobióticos. Sequências relacionadas à resistência a antibióticos também foram

detectadas demonstrando que a comunidade microbiana está respondendo a

poluição, desencadeando a expressão de proteínas capazes de lidar com compostos tóxicos presentes no ambiente.

#### 2. OBJETIVOS E HIPÓTESES

O principal objetivo do presente estudo foi identificar genes relacionados a redução do sulfato em uma biblioteca de fosmídeos construída a partir de solo do manguezal, contaminado com petróleo, localizado no municipio de Bertioga/SP, e inferir sobre a organização genômica desses genes e em seguida avaliar a expressão gênica dos mesmos em solos de dois manguezais com distintos estados de conservação localizados nos municipios de Bertioga/SP e Cananéia/SP. Este objetivo deverá auxiliar na comprovação das hipóteses de que áreas de manguezais hospedam organizações gênicas particulares, diferentes daquelas encontradas em organismos já descritos em outros ambientes marinhos e que expressão dos genes envolvidos na redução do sulfato pode variar de acordo com a contaminação diferencial dos solos dos manguezais estudados.

#### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### 3.1 Áreas de estudo e amostragem

O presente estudo esta inserido no projeto intitulado "Metatranscriptômica e contexto genômico de genes microbianos relacionados aos ciclos biogeoquímicos em manguezais" processo FAPESP nº 12/06245-2, cujo pesquisador responsável é o Prof. Dr. Fernando Dini Andreote. Neste projeto foram avaliadas as comunidades microbianas presentes em quatro áreas de manguezais do Estado de São Paulo, sendo três localizadas no município de Bertioga, e uma localizada na cidade de Cananéia (Figura 2). Os manguezais selecionados apresentam características distintas, sendo que um dos manguezais localizados no município de Bertioga é altamente contaminado com petróleo (Oil Mgv), devido a um derramamento de 35 milhões de litros de óleo cru, ocorrido no ano de 1983. Neste manguezal a mata nativa apresenta-se ainda em processo de regeneração. Próximo a este manguezal situa-se outro, sem a presença de derramamento de óleo, porém ainda com a pressão de contaminantes oriundo da proximidade com o centro urbano de Bertioga (Ant Mgv). Em contraste, o manguezal, localizado no município de Cananéia, encontra-se situado em área de reserva ambiental na Ilha do Cardoso, tendo como fator externo de impacto apenas um baixo efeito antrópico (Prs Mgv). Além dos fatores ambientais ou antrópicos considerados distintos entre os dois manguezais, pode ser salientada também a disponibilidade de oxigênio, a quantidade de nutrientes e de matéria orgânica, que são distintas entre os manguezais (DIAS et al., 2011; ANDREOTE et al., 2012). Dentre tais fatores, algumas variáveis com grande diferença entre os manguezais são a salinidade, a condutividade elétrica que podem estar ligadas a inundação do manguezal de Cananéia diretamente pelo mar, enquanto que os manguezais de Bertioga são banhados por uma mistura de água oriunda do mar e do rio Iriri. Estes três manguezais foram divididas, com base em características de contaminação, vegetação e microbiológicas, em quatro áreas distintas, conforme Andreote et al. 2012 (Tabela 1).

Foram coletados aproximadamente 300 gramas de solo por ponto amostrado. As amostras foram colocadas em sacolas plásticas, fechadas e levadas ao laboratório. A partir destas amostras, alíquotas de 5,0 gramas de solo foram e utilizados para extração do material biológico alvo de análise (DNA e RNA).



**Figura 2.** Esquema da localização geográfica dos manguezais avaliados, sendo BrMg01 e BrMg02 contaminados com baixo e alto teor de petróleo respctivamente e BrMg03 com contaminação antropogênica, ambos situados em Bertioga e um localizado em Cananéia, BrMg04, sendo o manguezal preservado. Modificado de Dias e colaboradores (2011).

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

Tabela 1. Características das quatro áreas de manguezais estudadas (Andreote et al. 2012).

#### 3.2 Caracterização química dos solos dos manguezais

Estes manguezais têm ampla caracterização física e química, determinadas e reportadas em outros trabalhos (DIAS et al., 2011; TAKETANI et al., 2010; ANDREOTE et al., 2012). Análises de enxofre total (S), conteúdo de sulfato (SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>), conteúdo de matéria orgânica e pH foram realizadas previamente por Varon-Lopez et al. (2014), no Laboratório de Análises de Solo da Escola Superior de Agricultura – "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP, Piracicaba, Brasil), utilizando-se a metodologia descrita em Raij e colaboradores (2001) (Tabela 2).

Tabela 2. Caracteristicas físico-químicas dos solos utilizados das quatro áreas de manguezais utilizadas neste estudo.

	BrMg01	BrMσ02	BrMg03	BrMg∩4
A		52.0 + 4.0 0		
Areia	$27 \pm 0.0$	53,0 ± 16,0	48,5 ± 2,5	78,5 ± 6,5
Silte	42,5 ± 3,5	37,0 ± 16,0	32 ± 2,0	7,0 ± 2,0
Argila	30,5 ± 2,5	10,0 ± 0,0	19,5 ± 0,5	14,5 ± 4,5
Umidade (%)	59,1 ± 3,0	75,0 ± 5,4	71,4 ± 2,5	48,8 ± 14,0
рН	5,4 ± 0,5	6,3 ± 0,0	6 ± 0,9	6,9 ± 0,0
Máteria Orgânica g/dm <sup>3</sup>	129,5 ± 1,5	271,0 ± 52,2	235,7 ± 7,3	71,0 ± 14,0
Р	24,5 ± 9,5	37,0 ± 8,0	56 ± 5,0	6,0 ± 1,0
К	4,8 ± 1,9	11,7 ± 1,9	12,4 ± 0,8	7,25 ± 1,0
Са	51,0 ± 2,0	183,0 ± 9,0	78,5 ± 7,8	51,0 ± 15,0
Mg	124,0 ± 29,1	239,5 ± 92,8	161,75 ± 8,3	93,5 ± 22,6
H+AI	48,0 ± 10,0	36,5 ± 5,5	31,2 ± 3,3	27,5 ± 5,5
SB	179,4 ± 29,5	434,4 ± 85,6	253,2 ± 1,3	151,4 ± 38,6
СТС	227,4 ± 39,5	470,9 ± 79,7	284,2 ± 2,1	179,0 ± 43,8
V	79,0 ± 1,0	91,5 ± 2,5	88,75 ± 1,3	82,7 ± 0,3
Eh	390,5 ± 44,6	123,0 ± 101,3	180,2 ± 18,3	438,0 ± 22,1
Sulfato (mM)	10,3 ± 0,3	9,5 ± 2,4	9,2 ± 0,6	8,0 ± 5,0
Enxofre(S) (%)	0,3 ± 0,02	0,34 ± 0,0	0,23 ± 0,0	0,18 ± 0,0
Sulfato/ Enxofre	11,1 ± 0,7	8,9 ± 1,7	12,5 ± 0,6	12,4 ± 5,7
Ferro piritico (FeS2) (ìmol g-1)	172,2 ± 15,6	279,5 ± 61,3	308,4 ± 31,2	174,3 ± 134,3
DOP (%)	56,4 ± 3,0	84,0 ± 2,6	74,1 ± 4,9	79,3 ± 3,2

#### 3.3 Obtenção da biblioteca metagenômica

A construção da biblioteca metagenômica utilizada neste estudo faz parte do projeto "Prospecção de metagenôma microbiano de sedimentos de manguezais na busca por novos compostos bioativos" (Processo FAPESP nº 11/50809-5) sobe

responsabilidade da pesquisadora Dra. Valéria Maia de Oliveira. Foram utilizadas as amostras do ponto BrMgv 02 (manguezal de Bertioga contaminado com óleo) para a construção desta biblioteca.

A metodologia utilizada foi a mesma descrita por Vasconcellos et al. (2010). Os passos envolvidos na construção da biblioteca consistem na extração direta do DNA do ambiente e sua clonagem em um vetor fosmídial (pCC2FOS). Posteriormente, o DNA recombinante vetor-inserto foi introduzido em um hospedeiro cultivável (*Escherichia coli* EPI300<sup>™</sup>-T1R) para a análise dos genes, e para determinação de sua sequência, e estão esquematizados na figura 3.



**Figura 3.** Etapas envolvidas na construção de bibliotecas de fosmídeos, utilizando-se o kit "CopyControlTM Fosmid Library Production" (Epicentre). FONTE: (adaptado de Daniel 2005).

A partir da biblioteca obtida, composta de 12.960 clones, diversos estudos foram desenvolvidos para a exploração dos genes nesta contidos. Dentre estes, o presente trabalho desenvolveu na busca e caracterização de insertos que possuem genes envolvidos na transformação do enxofre, com destaque para aqueles relacionados ao processo de redução do sulfato.

A busca por estes insertos se baseou em duas estratégias complementares, a análise do sequenciamento completo da biblioteca de clones, e a localização, por meio de PCR específico, de clones contendo o gene *dsr*B, marcador filogenético de grupos microbianos redutores de sulfato.

#### 3.4 Extração e sequenciamento de DNA fosmidial da biblioteca metagenômica

Nesta estratégia, todos os 12.960 clones obtidos foram submetidos à extração do DNA fosmidial, sendo os produtos de extração misturados e posteriormente submetidos ao sequenciamento de DNA, realizado na plataforma *Illumina* HiSeq2000 (*Next Generation Sequencing* – NGS).

Para essa etapa, as extrações foram realizadas em pools de 10 placas por vez. Para tanto, cada placa de 96 poços do estoque da biblioteca teve seus clones reativados em placas deep well contendo, em cada poço, 1,0 mL de meio LB líquido com 12,5 µg/mL de cloranfenicol. Com auxílio de um carimbo de placas, uma alíquota dos clones foi transferida da placa estoque de origem para a placa deep well, que posteriormente foi disposta em shaker a 37 °C por 16 horas e rotação de 180 rpm. Ao término da incubação, 500 µL de cada 1 dos 96 poços da placa foram recolhidos em tubos de 50 mL (o volume de 1 placa de 96 poços ocupa 1 tubo de 50 mL). Esse procedimento foi repetido com 10 placas de 96 poços por vez, as células foram precipitadas por centrifugação a 9.500 rpm por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Ao final, foram obtidos 13 pools de células de toda a biblioteca, e o DNA fosmidial foi extraído com o kit *Large-Construct*, da Qiagen, seguindo orientações do fabricante.

O DNA resultante foi sequenciado por *Illumina HiSeq2000*, por meio da Facility para Genômica Funcional para Estudos de Agricultura na ESALQ/USP (Piracicaba, SP). O sequenciamento foi realizado em um lane do *Illumina HiSeq2000*.

#### 3.5 Tratamento das sequências, montagem e anotação dos contigs

As sequências obtidas foram inicialmente trimadas, onde reads menores que 50pb ou com baixa qualidade (*Phred score* < 20) foram removidos. As sequências remanescentes foram submetidas à busca de sequências do vetor pCC2FOS e do DNA genômico da linhagem hospedeira *Escherichia coli* EPI- 300, as quais quando presentes, foram excluídas das análises subsequentes. As sequências com alta qualidade foram submetidas à montagem com a utilização do programa CLCbio *Genomics Workbench* (Qiagen, Germany) utilizando a ferramenta *de novo assembly* tool. Um total de 189 contigs apresentaram tamanho acima de 10 kb, os quais foram
submetidos a anotação automática de genes, realizada na plataforma IMG/MER 4 (*Integrated Microbial Genomes and Metagenomes*) (MARKOWITZ et al., 2014).

#### 3.6 Rastreamento de clones contendo o gene dsrB

Paralelamente ao desenvolvimento da primeira estratégia, foi também realizada a triagem dos clones que continha o gene *dsr*B, associado à atividade de redução dissimilatória do sulfato. Para isto, as 135 placas da biblioteca, contendo 96 clones cada (totalizando 12.960 clones), foram cultivadas em placas de Petri descartáveis (15 cm de diâmetro) em meio de cultura Luria Bertani (LB) sólido, com acréscimo de 12,5µg/ml de cloranfenicol.

As placas foram incubadas em camara incubadora (BOD) à temperatura de 37°C durante 24 horas. Após esse período, os 96 clones de cada placa foram agrupados em uma única amostra originando 135 amostras (demoninadas pools), as quais foram utilizadas para a realização da extração de DNA, utilizando o protocolo descrito a seguir: os clones foram cultivados em 5 mL de meio de cultura liquido por 18 a 24 horas a 37 °C. Em seguida 2 mL da cultura de células foram transferidos para um eppendorf de mesmo volume, e e centrifugados a 10.000 g durante 2 minutos e o sobrenadante descartado. Resuspendeu-se a amostra em 500 µL de tampão de extração (10µl DE TRIS 1 M pH 8; 2µl EDTA 0,5 M pH 8.0). Em seguida adicionou-se 10 µL de SDS 10% e glass beads e agitou-se durante 2 minutos em vortex. Foram acrescentados 1 mL de clorofórmio-fenol-álcool isoamilco (25:24:1), homogeneizou-se a amostra, e em seguida centrifugou-se durante 5 minutos a 10.000g. O sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf, acrescentado 10 microlitros de acetato de amônio 5 molar (pH 5.2) e 400 µL isopropanol gelado em seguida inverteu-se o eppendorf lentamente algumas vezes e armazenou-se em freezer -20° C por um período de 5 minutos. Os eppendorfs foram centrifugados durante 5 min. a 10.000g e fora descartado o sobrenadante. Acrescentou-se 500 µL de etanol 70% gelado, e centrifugou-se durante 3 minutos a 10.000g. Em seguida o sobrenadante foi descartado e os eppendorfs foram secados em estufa de ventilação. Após serem secos resuspendeu-se o DNA precipitado em 50 µL de água ultrapura autoclavada.

Em seguida, foram realizadas reações de PCR utilizando primers específcos para o gene *dsr*B. A seleção dos insertos positivos foi realizada utilizando os primers

DSRp2060F (5'-CAACATCGTYCAYACCCAGGG-3') e DSR4R (5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3'), utilizando a metodologia descrita por Geets e colaboradores (2006). Os pools que apresentaram resultado positivo tiveram seus 96 clones triados separadamente, com o intuito de identificar os clones que continham o inserto desejado.

Os clones que apresentaram resultados positivos foram submetidos à extração do DNA fosmidial. Primeiramente, foi realizada a reativação dos clones estriando-os por esgotamento, em placas de Petri, contendo meio de cultura Luria Bertani (LB) sólido, com acréscimo de 12,5 µg/ml de cloranfenicol e incubados em temperatura média de 37ºC. Após 12 horas de crescimento, foi retirada uma única colônia isolada para inoculação em tubos contendo 5 ml de meio LB líquido com 12,5 µg/ml de cloranfenicol (cultura starter) e incubados em shaker com temperatura média de 37ºC e rotação de 100 rpm. Decorridos 12 horas de crescimento, foi inoculado 1ml da cultura starter em erlemeryers contendo 500 ml do mesmo meio líquido, sob agitação de 100 rpm a 37°C por 18 horas. A partir do crescimento final, as células foram recolhidas por centrifugação a 13.000 rpm durante 15 minutos à 4ºC. Este material foi usado para a extração do DNA fosmidial, realizada com o Kit Qiagen Large-Construct, seguindo recomendações do fabricante. Após obtenção do DNA fosmidial, as amostras foram quantificadas em gel de agarose 2% utilizando os marcadores moleculares 1kb e Low Mass e via QubitTM, utilizando-se o Kit QuantiTTM dsDNA BR assay (Fluorometric Quantitation - Invitrogen).

### 3.7 Sequenciamento dos clones positivos na plataforma lon Torrent

O sequenciamento do DNA fosmidial contendo o gene *dsr*B foi realizado pela plataforma *lon Torrent* (Life Technologies, EUA) utilizando o sequenciador modelo PGM (*Personal Genome Machine*). Este equipamento detecta a incorporação dos nucleotídeos por meio de um chip semicondutor. No presente trabalho foi utilizado um chip 316 com capacidade para gerar até 100 Mb de sequências (reads) com tamanho entre 50 a 200 pb (ROTHBERG et al., 2011).

O preparo das amostras consistiu de duas etapas: construção da biblioteca e enriquecimento da amostra, desenvolvidas de acordo com os protocolos disponíveis na "*lon Community*". A quantidade de cada amostra de DNA fosmidial foi de 1µg eluído em 10µl de H2O deionizada esterilizada (100 ng/µl). Para a construção da

biblioteca foi utilizado o Kit *ION Xpress DNA Fragment Library*, que é constituído das etapas: i) Fragmentação; ii) Purificação; iii) Ligação dos Adaptadores; iiii) Amplificação.

Após a construção da biblioteca, foi utilizado o Kit *ION XpressTM Template* v2.0, para realização do enriquecimento das amostras utilizando o "mini robô" ION Touch, o qual faz a ligação das beads metálicas (semicondutores) com os fragmentos marcados com adaptadores específicos. Somente após a construção e enriquecimento, pode ser realizado o sequenciamento.

## 3.8 Tratamento das sequencias e montagem dos contigs

Após realização da etapa de sequenciamento dos insertos de interesse, as sequências foram analisadas na plataforma de análise de genomas CLC *Genomics WorkBench* versão 7.0.3. Neste momento, foram removidas as sequências dos adaptadores, do genoma da célula hospedeira (*Escherichia coli* EPI- 300) e do vetor, além de sequências de baixa qualidade. Estas etapas foram realizadas de maneira separada para cada clone de interesse. Para isto, inicialmente foi realizado o *Upload File* das sequências no formato fastaq por meio da ferramenta Import Data. Foram utilizados os comandos em sequencia, disponíveis na ferramenta de trabalho, TOOL BOX, sendo: i) *Create Sequencing QC Report* – análise da qualidade dos reads gerados pós-sequenciamento; ii) *Trim Sequences* – remoção dos adaptadores e do *prime*r reverse, assim como reads de baixa qualidade; iii) *Maps Reads to Reference* - remoção das sequencias referentes à *Escherichia coli* EPI- 300 e vetor fosmídeo pCC2FOS. Esta metodologia foi primeiramente desenvolvida e utilizada por Soares Jr. (2015). O processo de montagem dos contigs foi realizada por meio do comando *De Novo Assembly*, utilizando os parâmetros padrões do CLC.

### 3.9 Anotações dos genes relacionados ao ciclo do enxofre

A identificação dos quadros abertos de leitura (ORFs - Open Reading Frames), a partir dos contigs reconstruídos foi realizada por meio do servidor web RAST - *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (http://rast.nmpdr.org) (AZIZ et al, 2008). Esta anotação foi posteriormente curada manualmente utilizando os programas ARTEMIS®: *Genome Browser and Annotation Tool* (RUTHERFORD,

2000) e *Glimmer*3 (DELCHER, 1999). O ARTEMIS® é um anotador de sequências de DNA que permite a visualização dos resultados dentro do contexto da sequência com tradução para as 6 fases. A identificação de ORFs pelo ARTEMIS® é realizada basicamente pela procura entre códons de inicio e parada de tradução. Já o sistema *Glimmer*3 pode ser treinado com um subconjunto de sequências do DNA do organismo a ser anotado podendo, desse modo, utilizar outros parâmetros (porcentagem GC e preferência de códons, por exemplo) para identificar uma ORF. Os resultados gerados pelo RAST e pelo *Glimmer*3 foram sobrepostos aos do ARTEMIS®, produzindo uma anotação mais confiável.

As sequências de DNA das ORFs identificadas foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando-se (ALTSCHUL 1997), 0 programa BLASTx et al. Pfam (http://pfam.xfam.org/) (PUNTA et al.. 2012) е FIGfams (ftp://ftp.theseed.org/FIGfams/) (MEYER; OVERBEEK; RODRIGUEZ; 2009). Em ambos os casos foi utilizado o banco de dados de proteínas não redundantes (nr).

# 3.10 Afiliação Filogenetica das sequências do gene dsrb contidas nos contigs

Uma inferência filogenética das sequências detectadas como oriundas do gene *dsr*B, por ambas estratégias adotadas (sequenciamento da biblioteca e rastramento de clones) foi realizada por alinhamento destas com sequências de proteínas similares presentes em bancos de dados do UNIPROT (http://www.uniprot.org/) e *GenBank* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Para isto, o alinhamento entre estas sequências foi determinado pelo Muscle (EDGAR, 2004), sendo estes posteriormente convertidos numa matriz de distância determinada pelo parâmetro Kimura-2 (KIMURA, 1980), que foi agrupada pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987). A consistência da estrutura da árvore filogenética obtida foi determinada pela análise de bootstrap, feita com base em 1000 sub-amostragens na matriz de distância, no *software* MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007).

#### 3.11 Afiliação Taxonomica dos contigs contendo o gene dsrB

Com o proposito de identificar taxonomicamente o inserto metagenômico, as sequências de nucleotídeos de todas as ORFs geradas pela anotação funcional, foram comparadas com as sequencias de proteinas presentes no banco de dados de proteinas não redundantes (nr) do *GenBank* por meio do programa Blastx (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1997). Não foi aplicado nenhum parâmetro de corte como bit score ou E-*value*, visando obter todos os alinhamentos encontrados.

### 3.12 Análise de sintenia dos genes relacionados à tranformação do enxofre

A analise de conservação da ordem gênica entre os insertos obtidos neste trabalho foi realizada por meio do programa BIOPHYTON (COCK et al., 2009), utilizando o script adaptado "Proux et al 2002 Figure 6.py" (PROUX et al 2002), o qual utiliza como entrada arquivos no formato .gbk, resultando em um gráfico de sintenia (*Cross link*). Esta análise permite identificar regiões que apresentaram conservação da ordem gênica, a fim visualizar as regiões novas entre os insertos, rearranjos, translocações, deleções e inserções. A sintenia dos genes presentes nos três insertos metagenômicos avaliados no presente estudo quando comparadas, tanto entre si, como com dois outros clusters, desritos na literatura oriundos de biomas marinhos (fosmid ws39f7, fosmid ws7f8).

# 3.13 Metatranscritômica relacionada à tranformação do enxofre em solos de manguezais

Esta etapa do projeto foi desenvolvida com base em amostras das quatro áreas de manguezais descritas anteriormente. Estas sequências de RNA já haviam sido posteriormente obtidas pelo grupo de estudo (CADETE, 2014), e então exploradas no presente contexto. Basicamente, a extração de RNA foi realizada com o kit RNA PowerSoil® Total RNA Isolation (MoBio Labs, Inc. Solana Beach, USA), tendo como base 2,0 gramas dos solos amostrados e seguindo as recomendações do fabricante. Parte das amostras de RNA total, foram utilizadas para o enriquecimento de RNA mensageiro, onde foram utilizados 15 µL de RNA total para

o procedimento com o kit Ribo-Zero<sup>™</sup> rRNA Removal Kit\* (Meta-Bacteria) (Epicentre®, *Illumina*) (CADETE, 2014). Os ácidos nucleicos extraídos foram purificados e então submetidos ao sequenciamento em larga escala, por meio do equipamento *Illumina* HiSeq 2000, com a finalidade de se obter um panorama dos RNA presentes nos sedimento dos distintos manguezais estudados.

As sequências foram trimadas com o objetivo de selecionar as que apresentaram qualidade *Phred* (Q score) maior que 20, que admite apenas um erro a cada 100 pares de bases, ou seja, permite uma acurácia de 99% das bases sequenciadas. Foram descartados reads com baixa qualidade, artefatos de sequenciamento e sequências com tamanho menor do que 50 pb. Essa seleção inicial das sequências foi realizada no software CLC *Genomics Workbench* versão 7.0.3. (CLCbio, DEMARK) (BADIAL et al., 2011).

Com o propósito de avaliar a expressão dos genes anotados nos insertos avaliados (23D5, MGV 10001431 e MGV 10016026), a busca por sequências de RNA com similaridade aos genes descritos nos contigs foi realizada por meio de um mapeamento das reads de cDNA com as seguencias de aminoácidos dos respectivos genes anotados. Um arguivo FASTQ foi obtido para cada uma das 12 bibliotecas de cDNA. Os dados foram então importados para o software CLC Genomics Workbench versão 7.0.3. O mapeamento de leitura foi realizado utilizando as configurações de pacote de análise de padrão de RNA-Seq (*mismatch cost:* 2, insertion cost: 3, deletion cost: 3, length fraction: 0.8, e similarity fraction: 0,8, com o número máximo de acertos para conjunto de *reads* definido como 1). A normalização dos dados foi realizada pelo método conhecido por Reads Per Kilobase per Million Mapped Reads (RPKM) (MORTAZAVI et al., 2008). Durante a normalização dos dados foram determinados valores de expressão genica global de cada gene envolvido na mineralização do enxofre separadamente, baseado no valor de RPKM, Nesse processo foi utilizado à ferramenta RNA-Seq Analysis do software CLC Genomics Workbench versão 7.0.3. Os dados normalizados foram comparados utilizando ANOVA, e as médias obtidas foram comparadas pelo teste TUKEY, á 95% de confiança. As analises foram realizados pelo software R, utilizando o pacote "laercio".

### 4. RESULTADOS

# 4.1 Construção da biblioteca metagenômica e detecção dos clones contendo o gene *dsr*B

A construção da biblioteca metagenômica da amostra de sedimento de manguezal de Bertioga com derramamento de óleo originou 135 placas de 96 poços, totalizando 12.960 clones. Ao serem analisados por PCR, foram encontrados quatro clones que apresentaram PCR especifico para o gene *dsr*B (Figura 4). Vale destacar que apenas dois desses clones (23D5 e 40E4), foram submetidos ao sequenciamento.



**Figura 4.** Gel de eletroforese do produto de PCR para o gene *dsr*B, amplificado a partir de DNA da biblioteca metagenômica. Clones positivos linhas 4; 5; 13; 14. Controle positivo linha 21, branco da reação linha 23. Marcador molecular 1 kb linhas 24 e 25.

## 4.2 Análise das sequências de insertos contendo o gene dsrB

Uma vez identificados, dois clones (23D5 e 40E4) que apresentaram amplificação para o gene *dsr*B, tiveram o DNA fosmidial foi extraído e submetido ao sequenciamento. O chip 316 utilizado para o sequenciamento apresentou uma cobertura de sequenciamento de 78% e um total de 2.772.179 reads, com tamanho médio de 112 pb.

O processo de montagem dos contigs dos clones foi realizado, onde os clones 23D5 e 40E4 apresentaram 10 e 11 contigs, respectivamente. O maior *contig* obtido para o inserto do clone 23D5 possui 31.254 pb (contendo 38 ORFs e 66.3% de conteúdo GC), enquanto o maior contig para o clone 40E4 possui 28.577pb (23 ORFs e 66% de conteúdo GC). Cada uma destas ORFs foi anotada na plataforma RAST e também confirmada e re-anotada manualmente, por meio de análise de BLASTx, com software ARTEMIS®.

As ORFs presentes no inserto, pertencentes ao clone 40E4, apesar de apresentarem PCR positiva, não revelaram similaridade com proteínas envolvidas na redução do enxofre. Já o inserto,pertencente ao clone 23D5 apresentou 38 ORFs, sendo 22 ORFs envolvidas no ciclo do enxofre, porém com uma baixa identidade com as proteínas de sulfato/sulfito redutores e oxidantes de procariotos já descritas na literatura (Tabelas 3). O arranjo de genes anotados pelo programa web RAST e validados pelo ARTEMIS®, deste inserto, está representado na figura 5.

## 4.3 Sequenciamento, montagem e anotação da biblioteca metagenômica

No intuito de obter de forma robusta uma visão dos diferentes arranjos gênicos de interesse contidos na biblioteca metagenômica, seu sequenciamento completo foi também realizado. O número total de sequências obtidas foi de 156 milhões. Após a retirada das sequências do vetor pCC2FOS e do DNA genômico da linhagem hospedeira (*E. coli* EPI-300), foram obtidas 38 milhões de sequências. A montagem de contigs deu origem a 189 *contigs* com tamanho superior a 10.000 pb, dos quais, após anotados na plataforma IMG-MER, dois apresentaram o gene *dsr*B entre os genes ali encontrados (MGV 10001431 e MGV 10016026).

O inserto, MGV 10001431 possui 31.835 pb, contendo 35 ORFs e 52% de conteúdo GC, enquanto o inserto MGV 10016026 possui 34.192 pb, contendo 36 ORFs e 43% de conteúdo GC (Figura 5). O sistema de validação destas ORFs foi o mesmo descrito acima, e a afiliação de cada uma delas são apresentadas nas Tabelas 3, 4 e 5.



**Figura 5.** Organização genômica do locus *dsr*B, de toda inserção, dos insertos da biblioteca metagenomica. Os quadros de leitura aberta (ORFs) identificados são mostrados em setas, e o start, stop códons e direção de codificação são indicados. As ORFs são indicadas por cores de acordo com a sua categoria funcional. Mais detalhes sobre a função atribuída para cada ORF são indicados nas tabelas 3, 4 e 5.

Tabala 3 Anotação das OPEs oroopto no incorto 22DE

Tabela 3. Anotação das ORFs presentes no inserto 23D5.				Continua	
23D5 ORF	Tamanho			Homólogo mais próximo Blastx,	2 2
<u>n<sup>o</sup> (aa')</u>	(bp²)	Função	Subsistemas	(E value) em bases de dados públicas	°id%°
1 (382)	423	TrfA	- none -	Cloning vector pGNS-BAC	100
2 (449)	924	Inner membrane protein	- none -	Desulfitobacterium hafniense (4e-27)	45
3 (414)	1197	<sup>4</sup> <i>dsr</i> A (EC 1.8.99.3)	Sulfite reduction-associated complex DsrMKJOP	Desulfobacca acetoxidans (2e-174)	63
4 (354)	1890	<i>dsr</i> B (EC 1.8.99.3)	Sulfite reduction-associated complex DsrMKJOP	Desulfotomaculum hydrothermale (8e-174) uncultured sulfate-reducing bacterium (5e-	67
5 (655)	1299	<i>dsr</i> L Cobvrinic acid A.C-diamide	Sulfite reduction-associated complex DsrMKJOP	94)	63
6 (479)	690	synthase	Sulfite reduction-associated complex DsrMKJOP	Desulfobacula toluolica (1e-19)	54
7 (304)	678	Sulfite exporter TauE/SafE	- none -	Thalassobacter arenae (3e-12)	55
8 (308)	330	Sulfite exporter TauE/SafE	- none -	Methyloceanibacter caenitepidi (2e-20)	50
9 (273)	810	sulfite exporter TauE/SafE	- none -	Desulfobacca acetoxidans (3e-18)	26
10 (420)	696	sat (EC 2.7.7.4)	- none -	Psychrobacter sp.	53
11 (308)	876	<i>dsr</i> M (= HmeC)	Sulfite reduction-associated complex DsrMKJOP	Archaeoglobus fulgidus (3e-47)	38
12 (537)	1674	<i>dsr</i> K (=HmeD)	Sulfite reduction-associated complex DsrMKJOP	Desulfomonile tiedjei (0.0)	60
13 (385)	864	<i>dsr</i> P (= HmeB)	Sulfite reduction-associated complex DsrMKJOP	Desulfotignum phosphitoxidans (7e-101)	55
14 (385)	291	dsrP (= HmeB)	Sulfite reduction-associated complex DsrMKJOP	Desulfotignum phosphitoxidans (9e-18)	60
15 (263)	144	hypothetical protein	- none -	Desulfomonile tiedjei (2e-14)	68
16 (537)	195	dsrK (=HmeD)	Sulfite reduction-associated complex DsrMKJOP	Desulfovibrio sp. TomC (4e-20)	67
17 (138)	384	dsrJ (=HmeF)	Sulfite reduction-associated complex DsrMKJOP	Desulfovibrio sp. TomC (2e-18)	51
18 (537)	438	dsrK (=HmeD)	Sulfite reduction-associated complex DsrMKJOP	Desulfovibrio sp. TomC (4e-56)	71
19 (537)	882	dsrK (=HmeD)	Sulfite reduction-associated complex DsrMKJOP	Desulfovibrio sp. TomC (2e-112)	68
20 (341)	993	ds <i>r</i> M (= HmeC)	Sulfite reduction-associated complex DsrMKJOP	Desulfovibrio africanus (6e-83)	48
21 (181)	579	hypothetical protein	- none -	Desulfomonile tiedjei (8e-30)	44
22 (1614)	588	TPR repeat	- none -	Xenococcus sp. PCC 7305 (1e-13)	33

Tabala 2 Anatasão das ODEs presentos na inserta 22DE

Tabela 3 Anotação das ORFs presentes no inserto 23D5.				Conclusão		
23D5 ORF nº. (aa <sup>1</sup> )	Tamanho (bp <sup>2</sup> )	Função	Subsistemas	Homólogo mais próximo BLASTx, (E <i>value</i> ) em bases de dados públicas	<sup>3</sup> id%	
23 (105)	318	<i>dsr</i> C (EC 1.8.99.3)	Sulfite reduction-associated complex DsrMKJOP	Desulfotomaculum kuznetsovii (2e-50)	73	
24 (309)	879	Arabinose operon regulatory protein	- none -	Escherichia coli O55:H7 (0.0)	100	
25 (158)	474	1.5.1.3)	- none -	Citrobacter freundii (2e-109)	99	
26 (381)	918	5.1.1.1)	Alanine biosynthesis	Thermacetogenium phaeum (3e-65)	46	
27 (370)	1029	hypothetical protein	- none -	Parcubacteria bacterium (5.3)	38	
28 (279)	849	Cytidylate kinase (EC 2.7.4.25)	- none -	Desulfococcus multivorans (7e-20)	39	
29 (147)	438	<sup>₅</sup> aprB (EC 1.8.99.2)	Adenylylsulfate reductase	Desulfotomaculum (1e-69)	72	
30 (634)	396	aprA (EC 1.8.99.2)	Adenylylsulfate reductase	Syntrophobacter fumaroxidans (2e-41)	83	
31 (627)	315	aprA (EC 1.8.99.2)	Adenylylsulfate reductase	Desulfotomaculum kuznetsovii (6e-47)	<u>75</u>	
32 (626)	1203	aprA (EC 1.8.99.2)	Adenylylsulfate reductase	Desulfotomaculum gibsoniae (0.0)	<u>74</u>	
33 (89)	177	hypothetical protein	- none -	delta proteobacterium NaphS2 (2e-05)	64	
34 (263)	270	hypothetical protein	- none -	Syntrophobacter fumaroxidans (3e-10)	46	
35 (413)	1158	<sup>6</sup> hdrA (EC 1.8.98.1)	Methanogenesis	Desulfotomaculum thermocisternum (6e-58)	36	
36(736)	2058	hdrA	- none -	Desulfotomaculum thermocisternum (0.0)	51	
37 (762)	192	hdrA	- none -	Desulfonauticus sp. (9e-10)	57	
38 (391)	846	QmcO	- none -	Desulfotignum phosphitoxidans (2e-26)	28	

1- aa- aminoacido; 2 - pb-pares de base; 3 - id- identidade; 4 - dsr- Dissimilatory sulfite reductase; 5 -hdr- heterodisulfide reductase; 6 -apr-Adenylylsulfate reductase.

# 48

**Tabela 4**, Anotação das OREs presentes no inserto MGV 10001431

Tabela 4. Anot	ação das O	RFs presentes no inserto MGV 10001431.	Continua		
MGV10001431	Tamanho	Função	Subsistemas	Homólogo mais próximo BLASTx, (E value) em bases de dados públicas	<sup>3</sup> id %
1 (527)	<u>(bp)</u> 1617		nono	Desulfovibrio sp. TomC (0.0)	66
1(337)	006		- none -	Desulfovibrio africanus (6e-97)	40
2 (341)	990		- none -	Desulfosporosinus voungiae (1e-38)	49
3 (177)	534		- none -	Arabaaadabua aufatiaallidua (2a. 179)	42
4 (409)	1203	<sup>a</sup> dsrA (EC 1.8.99.3)	- none -	Archaeoglobus sullaticalitidus (2e-178)	64
5 (354)	1062	<sup>⁴</sup> <i>dsr</i> B (EC 1.8.99.3)	- none -	Desulfotomaculum reducens MI-1 (2e-179)	66
6 (69)	204	Transcriptional regulator	- none -	Desulfitibacter alkalitolerans (2e-20)	59
7 (455)	123	hypothetical protein - cobyrinic acid a,c-diamide synthase	- none -	Methanoculleus marisnigri (4e-09)	56
8 (379)	1713	RND multidrug efflux transporter; Acriflavin resistance protein - glycosyl transferase family 1	- none -	Clostridium sp. (2e-37)	33
9 (448)	1413	hypothetical protein	- none -	Proteiniphilum acetatigenes (6e-171)	56
	77	tRNA-His-GTG	- none -		
10 (285)	852	hypothetical protein	- none -	Fluviicola taffensis (5e-107)	52
11 (239)	852	Deoxyribose-phosphate aldolase (EC 4.1.2.4)	- none -	Prolixibacter bellariivorans (1e-125)	73
12 (333)	1005	hypothetical protein - multidrug DMT transporter permease	- none -	Alkaliflexus imshenetskii (3e-101)	64
13 (333)	942	hypothetical protein-signal peptide prediction	- none -	Adhaeribacter aquaticus (8e-91)	45
14 (67 )	207	hypothetical protein	- none -	delta proteobacterium (4e-08)	42
15 (110)	261	Transcriptional regulator, PadR family	- none -	Hassallia byssoidea (6e-28)	59
16 (385)	1404	hypothetical protein	- none -	Fluviicola taffensis (1e-24)	35
17 (147)	444	hypothetical protein	- none -	Draconibacterium orientale (3e-38)	47
18 (159)	507	Dihydrofolate reductase (EC 1.5.1.3)	- none -	Draconibacterium orientale (1e-60)	57
19 (264)	795	Thymidylate synthase (EC 2.1.1.45)	- none -	Bacillus flexus (3e-154)	74
20 (290)	141	hypothetical protein	- none -	Candidatus Xenolissoclinum pacificiensis (3.8)	41
21 (362)	1116	Permease	- none -	Flavobacterium cauense (3e-59)	36%
22 (285)	381	hypothetical protein	- none -	Rudanella lutea (5e-11)	35
23 (289)	894	Na(+) dependent transporter	- none -	Mariniradius saccharolyticus (2e-49)	42
24 (419)	1128	Molybdopterin oxidoreductase subunit	CBSS- 269799.3.peg.2220	Cyclobacteriaceae bacterium AK24 (2e-56)	47

Tabela 4. Anotação das ORFs presentes no inserto MGV 10001431.				Conc	Conclusão	
MGV10001431 ORF n <sup>º.</sup> (aa <sup>1</sup> )	Tamanho (bp <sup>2</sup> )	Função	Subsistemas	Homólogo mais próximo BLASTx, (E <i>value</i> ) em bases de dados públicas	<sup>3</sup> id %	
				Thermonema rossianum (0.0)		
25 (1042)	2973	Molybdopterin oxidoreductase	CBSS-269799.3.		45	
26 (479)	1398	Molybdopterin oxidoreductase (EC 1.2.7)	CBSS-269799.3.	Nonlabens ulvanivorans (1e-142)	51	
27 (176)	537	ABC-type Fe3+ transport system protein	CBSS-269799.3	Mariniradius saccharolyticus (6e-20)	31	
28 (190)	558	hypothetical protein	- none -	Draconibacterium orientale (1e-65)	54	
29 (386)	1164	hypothetical protein-signal peptide and transmembrane prediction	- none -	Draconibacterium orientale (4e-133)	51	
30 (278)	837	hypothetical protein	- none -	Leptospira interrogans (6e-17)	27	
31 (258)	813	hypothetical protein	- none -	Gaetbulibacter saemankumensis (5e-15)	31	
32 (237)	117	hypothetical protein	- none -	no significant found in NCBI		
33 (196)	396	hypothetical protein - heavy metal transporter	- none -	Spirosoma spitsbergense (9e-10)	38	

- none -

- none -

Tabela 4 Anotação das OREs presentes no inserto MGV 10001431

34 (126)

35 (414)

1 -aa- aminoacido; 2 - pb-pares de base; 3 - id- identidade; 4 - dsr- Dissimilatory sulfite reductase

hypothetical protein

Small Molecule Metabolism

435

579

42

39

Desulfospira joergensenii (2e-27)

Lewinella persica (3e-19)

50

**Tabela 5.** Anotação das ORFs presentes no inserto MGV 10016026

continua Homólogo mais próximo BLASTx, <sup>3</sup>id MGV10016026 Tamanho ORF  $n^{0}$  (aa<sup>1</sup>)  $(bp^2)$ (E value) em bases de dados públicas Funcão Subsistemas % Desulfovibrio longu (6e-58) Arsenate reductase (EC 1.20.4.1) 66 1 (150) 429 Anaerobic respiratory reductases hypothetical protein tryptophan Shewanella baltica (2e-06) 2 (543) 192 halogenase 46 - none -Thermodesulfobacterium geofontis (6e-3 (462) 1266 hypothetical protein 35) 33 - none -Phosphate regulon sensor protein PhoR PhoR-PhoB two-component regulatory Halanaerobium saccharolyticum (4e-103) 4 (593) (SphS) (EC 2.7.13.3) 36 1776 system Glucosamine-1-phosphate N- UDP-N-acetylmuramate from Fructose-6-Novosphingobium sp. P6W (3e-19) 5 (463) 834 acetyltransferase (EC 2.3.1.157) phosphate Biosynthesis, 29 PhoR-PhoB two-component regulatory Phosphate regulon transcriptional Salinispira pacifica (1e-85) regulatory protein PhoB (SphR) 6 (233) 693 58 system Desulfatibacillum alkenivorans AK-01 7 (535) 1581 hypothetical protein (2e-130) 41 - none -Desulfosarcina sp. BuS5 (0.007) 8 (690 141 hypothetical protein 58 - none -Adhaeribacter aquaticus (0.0) 9 (429) 1332 Xaa-Pro aminopeptidase (EC 3.4.11.9) Aminopeptidases (EC 3.4.11.-) 66 Clostridium sp. KNHs205 (5.1) 10 (304) 186 hypothetical protein 40 - none -Desulfatibacillum alkenivorans (4e-21) 11 (151) 408 hypothetical protein 36 - none -ADP-ribose pyrophosphatase (EC Desulfotomaculum sp. BICA1-6 (1e-490 12 (179) 50 507 3.6.1.13Nudix proteins Fulvivirga imteche (2e-98) 42 13 (433) 1269 peptidase, M23/M37 family - none -Streptomyces (1e-07) 14 (154) 399 Transamidase GatB domain protein 32 - none -Prevotella intermedia (2e-16) 543 Thioredoxin 31 15 (161) - none -Membrane-bound lvtic murein Desulfobacula sp. (2e-63) 16 (192) 606 transglycosylase D precursor (EC 3.2.1) 54 - none -UTP--glucose-1-phosphate Desulfococcus multivorans (0.0) uridvlvltransferase (EC:2.7.7.9) 60 17 (462) 1398 - none -Branched-chain amino acid Desulfatirhabdium butyrativorans (0.0) 18 (353) 1062 aminotransferase (EC 2.6.1.42) 77 - none -Desulfococcus oleovorans Hxd3 (5e-60) 57 19 (150) 456 hypothetical protein - none -Desulfococcus multivorans DSM 2059 20 (273) 783 hypothetical protein (1e-30) 70

- none -

MGV10016026 ORF nº. (aa <sup>1</sup> )	Tamanho (bp <sup>2</sup> )	Função	Subsistemas	Homólogo mais próximo BLASTx, (E <i>value</i> ) em bases de dados públicas	<sup>3</sup> id %
21 (349)	1035	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase (EC 4.3.3.7)	- none -	Desulforegula conservatrix (1e-170)	66
22 (110)	333	hypothetical protein	- none -	Desulfobacterium autotrophicum (2e-450	69
23 (207)	621	TPR repeat-containing protein	- none -	Desulfococcus multivorans (5e-890	61
24 (414)	1191	hypothetical protein	- none -	Desulfosarcina sp. BuS5 (1e-112)	43
25 (437)	1317	<sup>4</sup> <i>dsr</i> A (EC 1.8.99.3)	Anaerobic respiratory reductases	Desulfovibrio sp. TomC (0.0)	73
26 (387)	1149	<i>dsr</i> B (EC 1.8.99.3)	Anaerobic respiratory reductases	Desulfovibrio sp. TomC (0.0)	76
27 (80)	240	dsrD	- none -	Desulfococcus multivorans (4e-25)	68
28 (476)	1443	Cobyrinic acid A,C-diamide synthase	- none -	Desulfococcus multivorans (0.0)	63
29 (138)	516				29
		Tetraheme cytochrome c isozyme 2	- none -	Desulfovibrio acrylicus (0.001)	
30 (251)	747	Twin-arginine translocation protein TatC	Twin-arginine translocation system	Campylobacter concisus (2e-62)	48
31 (205)	336	Twin-arginine translocation protein TatB	translocation system	Heliobacterium modesticaldum (1e-06)	47
32 (391)	1176	Acetvl-CoA acetvltransferase (EC 2.3.1.9)	Butanol Biosvnthesis	Desulfosarcina sp. BuS5 (0.0)	77
33 (283)	852	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (EC 1.1.1.157)	Butanol Biosynthesis	Desulfosarcina sp. BuS5 (2e-162)	78
34 (182)	552	transcriptional regulator, XRE Family	- none -	Desulfobacterium autotrophicum (4e-73)	64
35 (379)	1155	Butyryl-CoA dehydrogenase (EC 1.3.8.1)	Anaerobic respiratory reductases, Butanol Biosynthesis	Clostridiaceae bacterium L21-TH-D2 (1e- 138)	53
36	126	hypothetical protein	- none -	No significant similarity found.	

1 -aa- aminoacido; 2 - pb-pares de base; 3 - id- identidade; 4 - dsr- Dissimilatory sulfite reductase

conclusão

A triagem da biblioteca metagenômica, por meio das duas metodologias aplicadas, deu origem a três insertos contendo o gene *dsr*B (23D5, MGV 10001431 e MGV 10016026). Para a inserção de 31 kb do inserto 23D5, 38 ORFs foram previstas, das quais 22 apresentaram homologia com genes envolvidos na redução do sulfato (Tabela 3). O segundo inserto MGV 10001431 contem 31 kb com 35 ORFs previstas (Tabela 4), dos quais somente quatro apresentaram homologia com genes envolvidos na redução de sulfato (Tabela 4). O inserto MGV 10016026 abrigou uma inserção de 34 kb, exibindo 36 ORFs das quais somente três apresentaram homologia com genes envolvidos na redução de sulfato (Tabela 5).

Todos os três insertos codificaram diversas proteínas implicadas na redução dissimilatória do sulfato. As sequências de aminoácidos deduzidos a partir da sequência de DNA de cada uma das ORFs demonstrou baixa semelhança às proteínas já descritas em bases públicas (Tabela 3, 4 e 5). Por exemplo, para os genes associados aos genes *dsr*A, *dsr*B e *dsr*C e ao complexo *dsr*ABCMKJOP, foram encontradas similaridades variando entre 38 e 76% ao passo que para os genes associados a Adenylylsufate redutase (genes *apr*) foram encontradas similaridades variando entre 72 e 83%. Já para os genes associados à Heterodissulfuto redutase (genes *hdr*), foram encontradas similaridades variando entre 28 e 57%. O gene associado a sulfate adenylyltransferase (*sat*) apresentou similaridade de 53%.

Dentre os insertos estudados, apenas o inserto presente no clone 23D5 incluiu um *cluster* dos genes relacionados a redução dissimilativa do sulfato, composta pela a Adenylylsufate sulfato redutase [gene *apr*AB (ORF29 a ORF32)], heterodissulfito reductase [genes *hdr*A e *hdr*E (ORFs 35 a ORFs 38)] e Dissimilatoria sulfito redutase [genes *dsr*A, *dsr*B e *dsr*C (ORFs 3, 4 e 23 respctivamente)]. Além disso, um gene que codifica para a sulfurilase de ATP (gene *sat*, ORF10) foi identificado diretamente a montante dos genes que compõem o complexo *dsr*MKJOP (ORFs 11 a 20). Esses genes são conservados entre os organismos redutores e oxidantes de enxofre organismos, onde tais conjuntos de enzimas catalisam a ativação de sulfato e a subsequente redução do sulfato em sulfureto de hidrogeno (H<sub>2</sub>S).

Em contraste, os clusteres *apr* e *hdr* não se apresentaram nos insertos MGV10001431 e MGV10016026, onde se encontram apenas os genes *dsr*MKD e os

genes *dsr*A e *dsr*B, responsáveis pelas etapas terminais na redução de sulfito em sulfureto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S).

A ORF5 descrita no inserto 23D5 é predita para ser funcionalmente semelhante ao gene *dsr*L. Seu posicionamento a jusante do gene *dsr*B esta em conformidade com a ocorrência deste gene em outros procariotos redutores de sulfato, como por exemplo *Chlorobium phaeobactero* e foshr42c9. A sua função ainda não está completamente esclarecida, mas tem sido postulado que a proteína codificada pelo gene *dsr*L pode desempenhar um papel na interação com a derivada de *dsr*AB para se ligar a sulfito. A ORF 6, a jusante do gene *dsr*L, foi predita como codificadora da Cobyrinic acid A,C-diamide synthase, provavelmente envolvida na biossíntese de siro (heme) amida, o grupo prostético da enzima dissimilatória redutase de sulfito, derivada dos genes *dsr*AB.

# 4.4 Afiliações taxonômicas dos insertos microbianos presentes nos fragmentos gênicos avaliados

A afiliação taxonômica dos grupos que compõem os insertos avaliados (23D5, MGV 10016026, MGV 10001431) foi determinada de duas maneiras; pela afiliação das ORFs contidas em cada inserto, e por meio da comparação das sequências das ORFs anotadas como pertencentes ao gene dsrB com aquelas presentes no banco de dados.

A afiliação taxonômica das 38 sequências das ORFs do inserto 23D5 mostrou a dominância dos filos Proteobacteria (69%) e Firmicutes (25%). Outros filos também presentes foram Cyanobacteria (3%) e Euryarchaeota (3%).

O filo Proteobacteria foi representado pelas classes Alphaproteobacteria (8%), Gammaproteobacteria (12%), Betaproteobacteria (4%) e Deltaproteobacteria (76%).

A classe Deltaproteobacteria foi representada pelas ordens Syntrophobacterales (39%), Desulfovibrionales (33%) e Desulfobacterales (28%). As famílias predominates foram Desulfobacteraceae (28%), Desulfovibrionaceae (28%), Syntrophaceae (28%), Syntrophobacteraceae (11%) e Desulfohalobiaceae (5%) (Figura 6). Estas observações permitem inferir que este inserto derivou do DNA de uma bactéria afiliada a classe Deltaproteobacteria, presente nos manguezal em estudo.



**Figura 6.** Frequência de afiliação das 38 ORFS presentes no inserto do fosmideo 23D5, via Blastx, utilizando o banco de dados de proteínas não redundantes (nr), do banco de dados *GenBank*.

Analogamente, a afiliação taxonômica das 35 sequências das ORFs do inserto MGV 10001431 mostrou a dominância do filo Bacteroidetes (56%), além dos filos Firmicutes (14%), Proteobacteria (12%), Euryarchaeota (6%), Cyanobacteria (3%), Spirochaetes (3%), além de duas ORFs que não possuem similaridade significativa com o banco de dados do NCBI. O filo Bacteroidetes foi representado pelas classes Bacteroidia (37%), Flavobacteria (26%), Cytophagia (32%), Sphingobacteriia (5%), seguido pelas ordens Bacteroidales (40%), Cytophagales (30%), Flavobacteriales (25%), Sphingobacteriales (5%) e pelas famílias Cyclobacteriaceae (16%), Prolixibacteraceae (26%), Cytophagaceae (16%), Flavobacteriaceae (16%), Cryomorphaceae (11%), Marinilabiliaceae (5%), Porphyromonadaceae (5%) e Saprospiraceae (5%) (Figura 7).



Estas observações permitem inferir que este inserto derivou do DNA de uma bactéria afiliada ao filo Bacteroidetes, presente nos manguezal em estudo.

**Figura 7.** Frequência de afiliação das 35 ORFS presentes no inserto MGV 10001431, via Blastx, utilizando o banco de dados de proteínas não redundantes (nr), do banco de dados *GenBank*.

Por fim, a afiliação taxonômica das 36 seguências das ORFs do inserto MGV 100016026 apresentou a dominância do filo Proteobacteria (72%), além de ORFS afiliadas a Firmicutes (14%), Thermodesulfobacteria (2%), Actinobacteria (3%), Spirochaetes (3%), Bacteroidetes (3%), além de uma ORF sem similaridade significativa com o banco de dados do NCBI. O filo Proteobacteria foi representado (91%), Alphaproteobacteria pelas classes Deltaproteobacteria (4%), Gammaproteobacteria (5%), seguido pelas ordens Desulfovibronales (19%) e Desulfobacterales (81%) e pelas famílias, Desulfovibrionaceae, (81%) e Desulfovibrionaceae (19%) (Figura 8). Nesse caso as informações obtidas permitem inferir que este inserto derivou do DNA de uma bactéria afiliada ao filo Proteobacteria, classe deltaproteobacteria, ordem desulfobacterales e família Desulfobacteraceae, presente nos manguezal em estudo.



**Figura 8.** Frequência de afiliação das 36 ORFS presentes no inserto MGV 100016026, via Blastx, utilizando o banco de dados de proteínas não redundantes (nr), do banco de dados *GenBank*.

## 4.5 Afilição filogenéticas do gene dsrB

A filogenia construída pelo método de distância, utilizando o algoritmo *Neighbor-Joining*, para o gene *dsr*B, revelou diferenças em relação a análise anteriormente apresentada. A reconstrução filogenética do gene *dsr*B (Figura 9) indicou claramente uma afiliação dos respectivos insertos metagenomicos 23D5, MGV 10001431 e MGV 10016026 com procariotos oxidantes e redutores de enxofre.

Algo comum para as três sequências do gene *dsr*B analisadas é a baixa similaridade com sequências deste gene já descritos em outas bactérias e outros ambientes. Além desta observação, verifica-se que apenas o clone MGV 10016026

manteve sua afiliação ao grupo das Proteobacteria, enquanto que as outras duas sequências agruparam com aquelas derivadas de bactérias afiliadas ao filo Firmicutes (Figura 9).



**Figura 9.** Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *dsr*B presente nos insertos metagenomicos 23D5, MGV 10001431 e MGV 100016026, com as sequências disponíveis nas bases de dados públicas do UNIPROT e *GenBank*. A filogenia foi determinada pelo método neighbor joining e a relação entre as sequencias foi inferida usando o método muscle, os dados observados nos ramos indicam os valores de bootstrap acima de 50% de um total de 1000 repetições.

Não foi possível observar uma clara relação das sequencias de *dsr*B obtidas com qualquer grupo caracterizado de procariotos redutores de sulfato. A sequência contida no inserto MGV 10001431 mostrou 85% de similaridade com aquela oriunda de *Desulfitobacterium hafniense*, enquanto a sequência encontrada no inserto 23D5

afiliou-se a bactéria redutora de sulfato não cultivada, isolada de ambiente marinho (89% de similaridade), e o gene *dsr*B do inserto MGV 10016026 afiliou-se com sequencias de *dsr*B de clones isolados do manguezal BrMgv02 (com 76% de similaridade), alocados dentro da classe Deltaproteobacteria.

# 4.6 Análise de sintenia

As sintenias dos genes presentes nos três insertos metagenômicos avaliados no presente estudo foram comparadas, tanto entre si, como com dois outros clusters, descritos na literatura e oriundos de biomas marinhos (fosmid ws39f7, fosmid ws7f8).

A análise da ordem gênica demonstrou que das 22 orfs presentes no inserto 23D5, somente quatro estão presentes no inserto MGV 10001431, e duas no inserto MGV 10006026. Foi possível observar que a porcentagem de similaridade é baixa entre os genes, variando de 18 a 60%. Adicionalmente, não foram observadas inversões gênicas nem translocações. Os genes *dsr*K e *dsr*M, presentes no inserto 23D5 sofreram deleções quando comparados com o inserto MGV 10001431.O inserto MGV 10001431 quando comparado com o inserto MGV 1006026 apresentou sintenia da ordem gênica para os genes *dsr*AB (Figura 10).



**Figura 2.** Análise de sintenia dos genes envolvidos na redução dissimilatória do sulfato presentes nos insertos metagenomicos estudados. As sintênicas genicas são indicadas por blocos coloridos comuns unidos por linhas verticais (genes na mesma orientação). As porcentagens de similaridade estão indicadas nas linhas. A analise de sintenia foi realizada utilizando o programa BIOPYTHON. As ORFs são codificadas por cores de acordo com a sua função prevista. Setas vermelhas *dsr*A, setas laranja *dsr*B, setas verdes complexo *dsr*MKJOP, setas azuis escuro *dsr*C, setas roxas *apr*AB, setas azuis claro *hdr*AB. Os genes que codificam proteínas que mostraram significativa semelhança de sequência de amino ácido estão ligados por sombreamento vermelho, e a percentagem de identidade de aminoácidos está indicada. O grau de identidade de aminoácidos (%) é refletido na intensidade da cor do sombreamento vermelho.

Os genes *dsr*M, *dsr*K, dsrJ, *dsr*A, *dsr*B e *dsr*A presentes no inserto ws39f7 apresentaram inversão da colinearidade, quando comparados com o inserto 23D5, entretando quando comparado esse inserto com o inserto fosws7f8 os genes *dsr*k, *dsr*M e *hdr*E também apresentaram inversões na colinearidade. Foi possível observar também que os valores de grau de identidade dos aminoácidos foram baixos, variando entre 5 a 77%.

O inserto 23D5, que apresentou o *cluster* completo para a redução de sulfato, teve sua sequencia comparada com outros dois insertos presentes no banco de dados. O resultado dessas sintenias demonstraram uma conservação da ordem genica entres os mesmos, com exceção *dsr*M, *dsr*K, *dsr*J, *apr*A, *apr*B e *hdr*A presentes no inserto ws39f7 apresentaram inversão da colinearidade (ordem gênica), quando comparados com o inserto 23D5, entretanto quando comparado

esse inserto com o inserto fosws7f8 os genes *dsrk*, *dsr*M e *hdr*E, também apresentaram inversões da ordem genica. A porcentagem de similaridade entre os genes foi baixa, variando de 5 a 77%, indicando que o ambiente manguezal leva a uma especificidade gênica. Nesse caso também não ocorreram inversões genicas nem translocações (Figura 11).



**Figura 3.** Análise de sintenia dos genes envolvidos na redução dissimilatória do sulfato presentes nos inserto metagenômico 23D5 comparados com os insertos metagenômicos fosws7f8 e ws39f7 depositados no banco de dados do *GenBank*. As sintênicas genicas são indicadas por blocos coloridos comuns unidos por linhas verticais (genes na mesma orientação). As porcentagens de similaridade estão indicadas nas linhas. A analise de sintenia foi realizada utilizando o programa BIOPYTHON. As ORFs são codificadas por cores de acordo com a sua função prevista. Setas vermelhas *dsr*A, setas laranja *dsr*B, setas verdes complexo *dsr*MKJOP, setas azuis escuro *dsr*C, setas vermelho escuro *apr*AB, setas azuis claro *hdr*AB e setas roxas *sat*. Os genes que codificam proteínas que mostraram significativa semelhança de sequência de amino ácido estão ligados por sombreamento vermelho, e a percentagem de identidade de aminoácidos está indicada. O grau de identidade de aminoácidos (%) é refletido na intensidade da cor do sombreamento vermelho.

### 4.7 Análises de metatranscriptômica

Com o propósito de avaliar a expressão dos genes anotados nos insertos avaliados (23D5, MGV 10001431 e MGV 10016026), foi realizado um mapeamento das reads de cDNA com as sequencias de aminoácidos dos respectivos genes

anotados. Após a remoção de sequências de baixa qualidade, foram obtidas um total de 301.433.684 sequências derivadas do mRNA (cDNA), sendo o número de reads encontrada para cada área de manguezal foi 83.746.350 para BrMgv01, 76.130.246 para BrMgv02, 67.138.506 para BrMgv03 e 74.418.582 para BrMgv04.

Em resumo, observa-se que estes insertos apresentam variações na representatividade entre as sequências de RNA, e algumas variações na expressão dos mesmos entre as áreas de manguezais estudadas.

De maneira geral, foi possível observar uma grande representação dos genes presentes neste inserto entre as sequências de mRNA. Dentre estes, maiores valores de ocorrência foram relacionados aos genes *apr*A, *apr*B, *dsr*A e *dsr*B.

A expressão dos genes, envolvidos na redução do sulfato, presentes no inserto 23D5 não apresentaram diferenças estatísticas, com exceção dos genes *dsr*AB, que representam a parte final da reação, principal responsável pelo processo de redução, cujo os valores indicam que o processo de redução é menos intenso no manguezal BrMgv01.(Figura 12).



**Figura 4.** Expressão genica normalizada dos genes-alvo envolvidos no metabolismo do enxofre presente no inserto 23D5. A expressão do gene normalizado (reads por milhão) foi calculada usando a CLC *Genomics Workbench* versão 7.0.3. Os dados foram comparados utilizando ANOVA, e as médias obtidas foram comparadas pelo teste TUKEY, á 95% de confiança. As barras indicam o erro padrão da média nas diferentes amostras quantificadas.

O inserto MGV 10001431 apresentou somente quatro genes pertencentes ao processo de redução do sulfato. Destes, os genes *dsr*A e *dsr*K mostraram maiores expressões do que os genes *dsr*B e *dsr*M. Em relação a funcionalidade diferencial em cada uma das áreas, foi possível observar que o genes *dsr*K e *dsr*M (pertencentes ao complexo para transporte de elétrons transmembranar *dsr*KMJOP), e o gene *dsr*B não apresentaram diferenças estatísticas no padrão de expressão para os quatro solos de manguezais avaliados. O gene *dsr*M apresentou expressão somente no mangue BrMgv04, entretanto o gene *dsr*A não apresentou expressão na manguezal BrMgv01, sendo o maior valor de expressão encontrado no mangue BrMgv04 (Figura 13).



**Figura 5.** Expressão genica normalizada dos genes-alvo envolvidos no metabolismo do enxofre presente no inserto MGV 10001431. A expressão do gene normalizado (reads por milhão) foi calculada usando a CLC *Genomics Workbench* versão 7.0.3. Os dados foram comparados utilizando ANOVA, e as médias obtidas foram comparadas pelo teste TUKEY, á 95% de confiança. As barras indicam o erro padrão da média nas diferentes amostras quantificadas.

O inserto MGV 10016026 apresentou somente três genes pertencentes ao processo de redução do sulfato sendo eles *dsr*D, *dsr*A e *dsr*B, sendo a expressão do gene *dsr*D a menor entre os três genes analisados. Os genes *dsr*A e *dsr*B não apresentaram variações na expressão nos quatro manguezais, e o gene *dsr*D não apresentou expressão no manguezal BrMgv01. A análise de expressão demonstrou que tal gene também não apresentaou variação estatística nas quatro áreas de manguezais analisadas (Figura 14).



**Figura 6.** Expressão genica normalizada dos genes-alvo envolvidos no metabolismo do enxofre presente no inserto MGV 10016026. A expressão do gene normalizado (reads por milhão) foi calculada usando a CLC *Genomics Workbench* versão 7.0.3. Os dados foram comparados utilizando ANOVA, e as médias obtidas foram comparadas pelo teste TUKEY, á 95% de confiança. As barras indicam o erro padrão da média nas diferentes amostras quantificadas.

# 5. DISCUSSÃO

Os manguezais possuem características únicas e muitas vezes extremas, como variações da salinidade, inundação das marés e a frequente redução dos teores de oxigênio, unidos aos altos teores de matéria orgânica, combinações que por vezes fazem com que as transformações do enxofre sejam uma das mais ativas nestes ecossistemas (LYIMO; POL; OP DEN CAMP, 2002; MEYER; KUEVER, 2007a). Diversos estudos em manguezais, oriundos de distintas localidades, têm demonstrado que este ambiente alberga uma comunidade microbiana diversa e variável em função de ações antropogênicas e contaminações (CABRAL et al., 2106; ANDREOTE et al., 2012; DIAS et al., 2011; FASANELLA et al., 2012; MENDES et al., 2012). Estes trabalhos mostram que a comunidade microbiana é importante para manter a estabilidade e o funcionamento deste ecossistema (ANDREOTE, et al. 2012). Como exemplo, a redução dissimilatória de sulfato é uma atividade metabólica importante em muitos ambientes reduzidos, tais como sedimentos marinhos (VARON-LOPEZ, 2014, TAKETANI, 2012), lodo anaeróbico (DAS; KAZY, 2014) e aquíferos contaminados (KLEIKEMPER; et al 2002). Este processo é mediado por um grupo metabolicamente diversificado de microrganismos (VARON-LOPEZ, 2014). No entanto, são escassos os estudos visando à compreensão da estruturação destes organismos a das comunidades que os mesmos compõem. A grande maioria de estudos disponíveis é focada no gene marcador de determinados processos, mas não abrangem uma visão mais completa, tanto da organização genômica destes organismos, ou da atividade de microrganismos relacionados às transformações do enxofre, como as bactérias redutoras de sulfato, nos manguezais.

O processo de redução de sulfato, ou respiração do sulfato, é um dos principais mecanismos associados à degradação da matéria orgânica nos manguezais, visto que esse é um ambiente onde a concentração do oxigênio é extremamente baixa, levando a necessidade de utilizar outro aceptor final de elétrons como base do metabolismo microbiano. Este mecanismo é realizado principalmente por procariontes redutores de sulfato, sendo este um grupo muito diversificado de bactérias anaeróbias que desempenham um papel fundamental na ciclagem global de carbono e do enxofre. Em sedimentos marinhos anóxicos, a

redução do sulfato é responsável por até 50% de toda a mineralização orgânica (PUGGLE, et al., 2011).

Na tentativa de compreender melhor essa funcionalidade microbiana, dos procariotos redutores de sulfato, no ecossistema de manguezal foi o presente estudo, avaliou o contexto genômico e a expressão dos agrupamentos gênicos responsáveis por este processo, com o objetivo de compreender como a pressão seletiva exercida pelo meio influencia na organização e estruturação dos genes desses organismos.

A organização do cluster DSR (dissimilatorias sulfito redutase) em procariotos redutores de sulfato, até o momento pouco explorado em solos de manguezal, foi investigada, sendo este dado recuperado a partir de três insertos de DNA obtidos a partir de uma biblioteca de fosmideos. Os insertos metagenômicos que hospedam o gene dsrB, relacionados a redução do sulfato, foram sequenciados e anotados, no intuito de fornecer mais detalhes sobre a organização, e também fornecer um contexto genômico em que tais genes ocorrem. Como esperado, todos os três insertos analisados contêm genes que codificam proteínas diretamente envolvidas na redução do sulfato. De modo geral, os resultados indicam que os insertos avaliados albergam genes pertencentes ao complexo dsrMKJOP. Foram identificadas também proteínas diretamente envolvidas na redução dissimilatória de sulfato/sulfito, como genes que codificam transportadores de sulfato (aprAe aprB), transportadores de elétrons (hdrA, hdrB e hdrE) e redução dissimilatoria de sulfito (dsrA, dsrB e dsrC). Esses últimos são descritos somente em microrganismos capazes de realizar a redução dissimilatória de sulfato (MUSSMAMM et al. 2005). Uma vez que alguns destes genes são encontrados em organismos alocados em diferentes grupos taxonômicos, pode-se inferir que os mesmos possam ser transferidos via transferência horizontal de genes, contribuindo para a adaptação dos organismos aos distintos ambientes ou a drásticas alterações ambientais (MUSSMANN et al., 2005).

Os genes pertencentes ao complexo *dsr*MKJOP estão presentes na maioria dos organismos redutores de sulfato (PEREIRA, et al; 2011) Uma das questões importantes sobre a redução do sulfato é a natureza dos doadores de elétrons ao genes *apr*A, *apr*B, *dsr*A e *dsr*B. Dois complexos membranares, QmoABC e *Dsr*MKJOP, têm sido propostos para desempenhar esta função (PEREIRA, 2008). . A distribuição dos genes DSR descrito no inserto 23D5 corrobora com a afirmação

de que todos os organismos de sulfato/sulfito redutores e que possuem os genes dsrA e dsrB, também apresentam o gene dsrC e os genes dsrMK. Em vários organismos, estes genes ocorrem de forma conjunta, o que fornece evidência para suas interações funcionais (VENCESLAU, et al.; 2014). A importância destes genes foi relatada por Mussmam e colaboradores (2005), que descreveram as etapas citoplasmáticas das DSR da seguinte maneira: o sulfato é ativado por uma sulfurilase de ATP (gene sat), para formar APS. Uma translocação de elétrons para APS é catalisada por aprA e aprB, que catalisa a transformação da APS para sulfito e AMP (adenosina monofosfato). As subunidades dsrA, dsrB e dsrC reduzem os intermediários de sulfito em sulfureto de hidrogénio (H<sub>2</sub>S). Tendo em vista estas transformações, podemos sugerir que dentre os insertos anotados, apenas o inserto 23D5 apresentou o aparato genético completo para codificar para a redução do sulfato. Para os demais, observamos a falta dos sistemas transportadores de sulfato (apr), dos sistemas transportadores de elétrons (hdr), bem como o gene sat, responsável pela ativação do sulfato. Certamente, esta ausência dos genes não descarta a atividade na transformação do enxofre pelos organismos que hospedam estes insertos. Devido ao pequeno tamanho do fragmento analisado, os genes não encontrados nestes aproximadamente 40Kb, podem estar alocados em outras regiões do genoma, próximas ou não aos insertos analisados.

Os resultados de afiliação filogenética do gene *dsr*B demonstraram que os grupos bacterianos que hospedam os inserto estudados pertencem a Filo proteobacteria, classe Deltaproteobacteria e filo Firmicutes, classe Clostridia corroborando a descrição de grupos atuantes no ciclo do enxofre em trabalhos anteriores (ANDREOTE et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2011; PEIXOTO et al., 2011, VARON-LOPEZ, 2014). Estes grupos foram descritos como organismos responsivos ao processo de contaminação dos manguezais, onde os mesmos aumentam suas frequências (TAKETANI et al., 2009, 2010. DOS SANTOS, et al.; 2011). Possivelmente, a entrada de contaminante contribua para uma maior disponibilidade de carbono, qual é metabolizado em combinação com o processo de redução de sulfato.

Nas afiliações taxonômicas dos insertos microbianos por meio da análise das ORFs dos insertos metagenômicos avaliados, as inserções 23D5 e MGV 100016026 mostraram predominância do filo Proteobacteria, sendo os dois insertos apresentando ORFs afiliadas preferencialmente a classe Deltaproteobacteria. Na inserção MGV 100016026, foi possível inferir que este inserto derivou da família Desulfobacteraceae, congruente com os resultados filogenéticos do gene *dsr*B, o qual se mostrou bastante similar a uma sequência previamente obtida de solos de manguezais, classificada como pertencente ao filo Deltaproteobacteria, mas não classificada ao nível de gênero (VARON-LOPEZ, 2014). Já na análise do inserto 23D5, o gene *dsr*B foi afiliado a bactérias redutoras de sulfato não cultiváveis pertencentes ao filo Firmicutes. As ORFs presentes no inserto MGV10001431 foram principalmente afiladas ao filo Bacteroidetes, contrapondo a afiliação do gene *dsr*B destes inserto, o qual se afiliou a sequências de filo Firmicutes. Esta não compatibilidade na afiliação do gene *dsr*B e das demais ORFs neste inserto podem ocorrer devido a ocorrência de transferência horizontal destes genes.

Estudos filogenéticos comparativos sobre o gene de rRNA 16S e as duas enzimas chave, dissimilatória sulfito redutase (*dsr*AB) e adenosina-5-fosfo-sulfato redutase (*apr*AB), sugeriu eventos múltiplos e independentes de transferência horizontal destes genes (KLEIN et al., 2001). A topologia da árvore de *apr*A difere daquela observada para o gene 16S rRNA ou para a proteína *dsr*AB (FRIEDRICH, 2002; MULLER, et al., 2015). Com base nestas informações, pode-se sugerir que Firmicutes e Deltaproteobacteria, podem ter servido como linhagens doadores destes sistemas genéticos para outros grupos taxonômicos. Firmicutes que respiram sulfato são descritos como envolvidos em processos de trasferência horizontal dos genes *dsr*AB e *apr*A (FRIEDRICH, 2002), e uma relação filogenética é observada entes os sistemas enzimáticos *dsr*AB de Archaea e Firmicutes. O padrão de inserções e deleções suporta a ocorrência de um ancestral comum de *dsr*AB oriundos de Firmicutes, Nitrospira e *Archaeoglobus* spp., o que esta ainda para ser comprovado por análises mais detalhadas como a comparação e genomas microbianos destes grupos taxonômicos.

Outro fator que pode ter levado a esta diferenciação entre os grupos identificados como origem taxonômica do inserto MGV 10001431 pode ser a baixa identidade dos genes nele contidos com aqueles presentes no banco de dados. As ORFs afiliadas como genes relacionados ao processo de redução do enxrofre se mostraram pertencentes aos filos Proteobacteria (*dsr*K, *dsr*M), Euryarchaeota (*dsr*A) e Firmicutes (*dsr*B), sendo o gene dsrB com 66% de similaridade ao encontrado em *Desulfotomaculum reducens* (Firmicutes) e 85% de similaridade com a sequência originada de *Desulfitobacterium hafniense* (Firmicutes). De qualquer maneira, o filo

Bacteroidetes teve grande representatividade dentre as ORFs do inserto MGV 10001431. Organismos pertencentes a este filo são descritos como relevantes em ambientes costeiros, onde participam da ciclagem da matéria orgânica (FERNANDEZ-GOMEZ et al. 2013; TESKE et al, 201;VAN TRAPEN et al., 2004), ou ocorrem em áreas contaminadas com hidrocarbonetos, onde ocorrem aqueles afiliados a família Flavobacteriaceae (KIM; KWON, 2010). Dias e colaboradores (2010) descreveram a presença desse filo no manguezal de Bertioga contaminado (OilMgv).

Retomando um ponto previamente apresentado, nestas análises foi frequente a observação de sequências com baixa similaridade àquelas já presentes em bancos de dados. Tais sequências são classificadas como os genes alvos, no entanto quando comparadas em análises filogenéticas, se agrupam separadamente das demais. Este tipo de observação pode ser feita na análise filogenética do gene *dsr*B, o que sugere a ocorrência de grupos diferenciados, com história evolutiva distinta dos encontrados em outros ambientes. Possivelmente, as combinações particulares de condições ambientais encontradas nos solos de manguezais levam a processos adaptativos que geram estrutura protéica, e possivelmente funcionamento enzimático, distintos daqueles observação reitera a potencialidade presentes nos solos de manguezais para análises de bioprospecção, na busca por novas moléculas, não encontradas em outros ambientes.

As análises de sintenia e colinearidade são utilizadas no intuito de verificar a conservação do conteúdo e da ordem gênica entre espécies aparentadas (MUDGE et al., 2005). Diversos estudos de sintenia têm sido realizados tendo como base sequências depositadas em bancos de dados, ou com base na comparação de mapas de ligação densos em diferentes grupos taxonômicos (MAHADEVAN; SETO, 2010; BOOTHA, et al. 2015; JAUBERT, et al. 2016). Em geral, a identificação de sintenias parte da comparação do genoma em estudo com genomas descritos em bancos de dados, buscando a ocorrência de organizações de genes sintênicos ao do organismo pesquisado.

Quando os três insertos foram comparados, revelaram elevados níveis de colinearidade, incluindo casos de perfeita conservação de ordem genética e orientação, por exemplo, genes *dsr*AB. Na análise de sintenia dos genes envolvidos na redução dissimilatória do sulfato presentes no inserto metagenomico 23D5,

quando comparados com os insertos metagenômicos oriundos de biomas marinhos (fosws7f8 e ws39f7) depositados no banco de dados do *GeneBank*, foi revelado um agrupamento gênico conservado e colinear. No entanto, a identidade de aminoácidos entre os genes sintênicos analisados dentro do cluster DSR, foram baixas, variando de 5 a 77%, quando comparados com genes presentes nos insertos metagenômicos fosws7f8 e ws39f7. Tekaia (2016) relata que a indicação de que os genes que podem estar envolvidos em funções semelhantes é o fato de estarem agrupado, o que também justifica a presença de grupos de sintenia entre espécies diferentes dentro do mesmo gênero. Esta observação complementa o comentado acima sobre pressões de seleção específicas no manguezal. Neste caso, pode-se sugerir que a sintenia se mantem, mas a diferenciação ocorre pela alteração na sequencia dos genes presentes no cluster analisado.

Apesar dos avanços rápidos na tecnologia de sequenciamento, os estudos de metatranscriptomica microbianas são ainda relativamente escassos (URICH et al., 2008; MCCARREN et al., 2010, CABRAL et al., 2016). É geralmente assumido que a expressão do gene (a transcrição de DNA em RNA) é indicativa de atividade microbiana e refletem a resposta de microrganismos a estímulos ambientais (MYROLD; ZEGLIN; JANSSON; 2013). Como estes métodos são cada vez mais aplicados a ecossistemas diversos, o presente estudo se torna importante para descrever as características gerais do metatranscriptoma microbiano nos solos de manguezais, com destaque para o sequenciamento de mRNAs oriundos de genes relacionados a transformação do enxofre neste ambiente.

Não há dúvida de que o ciclo do enxofre é um das mais importantes vias quimiosintéticas microbianas no ecossistema de manguezal, mas poucos estudos têm tentado caracterizar o processo, em especial nos níveis de função e atividade. Até o presente momento, a expressão dos genes envolvidos na redução do sulfato em manguezais permanece obscuro. Este estudo combinado de metagenômica e de metatranscriptômica, em solos de dois manguezais com distintos estados de preservação, fornece indícios sobre o funcionamento do ciclo do enxofre nesse ecossistema, com base não só nos resultados de genômica, mas também na análise de expressão dos genes envolvidos nesse ciclo. Esta parte do trabalho foi realizada com amostras das quatro áreas de manguezais descritas no item 3.1.

O repertório de genes associados com a via de redução do sulfato, presentes no inserto 23D5 avaliado, foram encontrados, com diferentes níveis de

expressão para as diferentes áreas de manguezais analisadas. Os genes pertencentes ao complexo *dsr*KMJOP (complexo para transporte de elétrons transmembranar), não apresentaram diferenças estatísticas no padrão de expressão para os quatro solos de manguezais avaliados. O mesmo foi observado para os genes *apr*, *hdr* e *sat*. Já os genes *dsr*AB apresentaram valores distintos para os quatro solos de manguezal, sendo mais expressos no manguezal pristino (BrMgv04), seguido do manguezal contaminado (BrMgv02).

Os valores de expressão obtidos dos genes *dsr*A, *dsr*B, *dsr*D contidos no inserto MGV 10016026 não apresentaram diferenças nos níveis de expressão para as diferentes áreas de manguezais analisadas. Já os valores de expressão encontrados para os genes *dsr*K, *dsr*M, *dsr*A e *dsr*B, presentes no inserto MGV100431 apresentaram diferenças nos padrões de expressão entre os manguezais avaliados, sendo que para os genes dsrA e dsrB não foi observado expressão no manguezal BrMgv01.

As expressões destes sistemas genéticos indicam a funcionalidade da ciclagem do enxofre nos diferentes manguezais, e as variações encontradas podem estar relacionadas às características físico-quimicas diferenciais encontradas em cada uma das áreas. Por exemplo, observa-se um decréscimo nas concentrações de sulfato e matéria orgânica entre as áreas estudadas, variáveis que estão intimamente ligadas a mineralização da matéria orgânica neste ambiente, processo diretamente conectado a redução do sulfato (BOWLES, et al., 2014).

Chim e colaboradores (2004) sugeriram que os níveis de transcritos de genes envolvidos na respiração anaeróbica podem ser influenciados não só pela velocidade de respiração, mas também por a concentração de receptor de elétrons disponível. Os resultados demonstraram que a expressão dos genes *dsr*AB é um indicativo de que a redução do sulfato esteja ocorrendo nos sedimentos avaliados. Os resultados também sugerem que pode ser possível estimar as taxas relativas de redução do sulfato a partir de níveis de transcrição dos genes *dsr*A e *dsr*B quando as condições ambientais importantes, tais como disponibilidade de sulfato, são comparáveis. Devido ao fato de não haver qualquer trabalho de avaliação da expressão genica do cluster dsr em solos de manguezais, os padrões de expressão encontrados não foram passíveis de serem comparados.

Portanto, neste trabalho foi possível comprovar, após a anotação funcional das ORFs, presentes nos três insertos avaliados, que microrganismos encontrados
em solos de manguezais hospedam organizações gênicas particulares. Adicionalmente, sugere-se que a expressão destes genes varia de acordo com o nível de contaminação dos solos dos manguezais. Pode-se, em resumo, dizer que os resultados obtidos este trabalho auxiliam numa descrição mais detalhada da diversidade e da funcionalidade da microbiota dos solos de manguezais.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, a metagenômica de solos já forneceu uma visão sobre as questões de longa data de "quem está aí?" e está fazendo incursões a questão do "o que estão fazendo?". O progresso exigirá novos desenvolvimentos relacionados com a metagenômica, por exemplo, redução de dados e análise, melhorias na anotação funcional de genes, e curadoria de banco de dados, bem como a integração com outros métodos moleculares, prometem melhorar a nossa compreensão sobre o funcionamento dos ecossistemas do solo.

Os resultados demostraram que foi possível à identificação de genes relacionados ao processo de redução de sulfato nas bibliotecas metagenomicas construídas a partir do sedimento de manguezal contaminado de Bertioga/SP, e que foi possível identificar um *cluster* com todos os genes relacionados ao processo de redução de sulfato, bem como a expressão desses genes redutores de sulfato que habitam os solos, contaminados e pristinos, de manguezais. A ocorrência de expressão dos genes em todos os manguezais avaliados, indica que parte da microbiota envolvida na redução do sulfato é mantida, mesmo em condições de alterações nas condições desse ambiente por meio de contaminações.

Desta forma, este projeto preencheu esta lacuna no entendimento dos mecanismos que regem o funcionamento dos solos de manguezais, com enfoque no processo de redução do sulfato, que possuem papel fundamental em processos como a ciclagem de nutrientes, mantendo a funcionalidade e preservando o ecossistema. Os dados aqui gerados deverão também servir de base para auxiliar o desenvolvimento de técnicas mais refinadas no estudo de comunidades microbianas, como por exemplo, o desenvolvimento e análise de bibliotecas ou sequências metagenômicas.

Aqui, portanto, fornecemos dados que descrevem a diversidade genética, a distribuições de genes e parentesco entre as amostras, tanto para estabelecer um quadro de questões específicas de ecossistema, como para construir uma compreensão geral da expressão genica nas comunidades microbianas dos manguezais estudados.

## REFERÊNCIAS

ALONGI D.M. **Paradigm shifts in mangrove biology**. In: Perillo GME, Wolanski E, Cahoon D.R., Brinson M.M. (eds) Coastal wetlands: an integrated ecosystem approach. Elsevier, Amsterdam, 2009, p. 615–640.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANDREOTE, F.D.; JIMENEZ, D.J.; CHAVES, D.; DIAS, A.C.F.; LUVIZOTTO, D.M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELLA, C. C.; VARON - LOPEZ, M.; BAENA, S.; TAKETANI, R. G.; MELO, I. S. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **PLoS ONE**, v.7, p.1–14, 2012.

AZIZ, R.K.; BARTELS D.; BEST, A.A.; DEJONGH M.; DISZ T.; EDWARDS R.A.; FORMSMA K.; GERDES S.; GLASS E.M.; KUBAL M., MEYER F.; OLSEN G.J.; OLSON R.; OSTERMAN A.L.; OVERBEEK R.A.; MCNEIL L.K.; PAARMANN D.; PACZIAN T.; PARRELLO B.; PUSCH G.D.; REICH C.; STEVENS R.; VASSIEVA O.; VONSTEIN V.; WILKE A.; ZAGNITKO, O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, v.9 n.75 , p. 441-454, 2008.

BADIAL, P.R.; OLIVEIRA FILHO, J.P.; CUNHA, P.H.J.; CAGNINI, D.Q.; ARAÚJO JR., J.P.; WINAND, N.J.; BORGES, A.S. Identification, characterization and expression analysis of hepcidin gene in sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 90, p. 443-450, 2011.

BAILLY J.; FRAISSINET-TACHET L.; VERNER M.C.; DEBAUD J.C.; LEMAIRE M.; WÉSOLOWSKI-LOUVEL M.; MARMEISSE R. Soil eukaryotic functional diversity, a metatranscriptomic approach. **The ISME Journal**, v. 1, n. 7, p.632–642, 2007.

BARTON, L.L.; FAUQUE, G.D. Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, v.68, p. 41–98, 2009.

BARTON, L.L.; FAUQUE G.D. Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfatereducing bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, v.68, p..41-98, 2009. BLAZEJAK, A.; SCHIPPERS, A. Real-time PCR quantification and diversity analysis of the functional genes *apr*A and *dsr*A of sulfate-reducing prokaryotes in marine sediments of the Peru continental margin and the Black Sea. **Frontiers in Microbiology**, v. 2 n.253, p. 1-11, 2011.

BOOTHA, I. R.; MILLER, S.; MÜLLER, A.; LEHTOVIRTA-MORLEY, L. The evolution of bacterial mechanosensitive channels. **Cell Calcium**, v.57, n. 3, p. 140–150 (2015).

BOWLES, M.W.; MOGOLLÓN, J.M.; KASTEN, S.; ZABEL, M.; HINRICHS, K,U. Global rates of marine sulfate reduction and implications for sub-seafloor metabolic activities. **Science** v.344,n.6186, p.889 – 891, 2014.

BRADLEY A.S.; LEAVITT W.D.; JOHNSTON D.T. Revisiting the dissimilatory sulfate reduction pathway. **Geobiology**, v.9, n.5, p. 446-57. 2011.

BROCHIER-ARMANET, C.; DESCHAMPS, P.; LÓPEZ-GARCÍA, P.; ZIVANOVIC, Y.; RODRÍGUEZ-VALERA, F.; MOREIRA, D. Complete-fosmid and fosmid-end sequences reveal frequent horizontal gene transfers in marine uncultured planktonic archea. **The ISME Journal**, v. 5, n. 8, p.1291-1302, 2011.

BURNS, K.A.; GARRITY, S.D.; JORISSEN, D.; MACPHERSON, J.; STOELTING, M.; TIERNEY, J.; YELLE-SIMMONS, L. The galeta oil spill.II. Unexpected persistance of oil trapped in mangrove sediments. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 38, p. 349-364, 1994.

CABRAL, L.; LACERDA JÚNIOR, G. V.; SOUSA, S. T. P.; DIAS, A. C. F.; CADETE, L. L.; ANDREOTE, F. D.; HESSC, M.; OLIVEIRA V. M. Anthropogenic impact on mangrove sediments triggers differential responses in the heavy metals and antibiotic resistomes of microbial communities. **Environmental Pollutio**, in press, 2016.

CADETE, L.L. Descrição da comunidade microbiana ativa em solos de manguezais por metagenômica e metatranscriptômica. 2014. 84p. Dissertação (Mestrado em microbiologia agrícola)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo. 2014. Disponivel: em: www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/.../tde.../Luana Lira Cadete versao revisada.pdf. Acessado em 21 junho 2016.

CANFIELD, D. E.; JØRGENSEN, B. B.; FOSSING, H.; GLUD, R.; GUNDERSEN, J.; RAMSING, N. B. Pathways of organic carbon oxidation in three continental margin sediments. **Marine Geology**, v. 113, n.1, p. 27-40, 1993.

CHIN K.J.; ESTEVE-NUNEZ A.; LEANG C.; LOVLEY D.R. Direct correlation between rates of anaerobic respiration and levels of mRNA for key respiratory genes in Geobacter sulfurreducens. **Applied and Environmental Microbiology**. v.70, n.9, p.5183–5189, 2004.

COCK P.J.;, ANTAO, T.; CHANG, J.T.; CHAPMAN, B.A.; COX, C.J.;DALKE ,A.; FRIEDBERG, I.; HAMELRYCK, T.; KAUFF, F.; WILCZYNSKI, B .; DE HOON M.J. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. **Bioinformatics**, v. 25, p.1422-3 (2009)

CUNHA-LIGNON, M.; MENGHINI, R.P.;. SANTOS, L.C.M.; NIEMEYER-DINOLA, C.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Case studies in the mangroves of the State of São Paulo (Brazil): application of tools with different spatial and temporal scale. **Journal of Integrated Coastal Zone Management**, v. 9, p. 79–91, 2009.

DAHL, C; FRIEDRICH, C. G. **Microbial Sulfur Metabolism**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2008.

DAMON C.; LEHEMBRE F.; OGER-DESFEUX C.; LUIS P, RANGER J; FRAISSINET-TACHET L.; MARMEISSE R. Metatranscriptomics Reveals the Diversity of Genes Expressed by Eukaryotes in Forest Soils. **PLoS One**, v.7, n.1, 2012.

DANIEL, R. The Metagenomics of soil. Nature, London, v. 3, p. 471-478, 2005.

DAS, R.; KAZY, S. K. Microbial diversity, community composition and metabolic potential in hydrocarbon contaminated oily sludge: prospects for in situ bioremediation. **Environmental Science and Pollution Research**. V. 21, n. 12, 2014.

DELCHER A.L.; HARMON D.; KASIF S.; WHITE O.; SALZBERG S.L. Improved microbial gene identification with GLIMMER, **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 23, p.4636-4641, 1999.

DIAS A.F.C.; ANDREOTE F.D.; RIGONATO J.; FIORE M.F.; MELO I.S;, ARAÚJO W.L. The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.98, n. 4, p.541-51, 2010.

DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F.D.; DINI-ANDREOTE, F. ; LACAVA, P. T. ; SÁ, A. L. B. ; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. ; ARAÚJO, W. L. . Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. **World Journal 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 of Soils and Sediments**, v. 11, n. 8, p. 1466-1476, 2011.

DIAS, A.C. F.; PEREIRA E SILVA, M.C.; 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, n. 22 p. 7960–7967, 2012.

DIAS, A.C.F.; ANDREOTE, F.D.; DINI-ANDREOTE, F.; LACAVA, P.T.; SÁ, A.L.B.; MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Bazilian mangrove sediment. **World Journal of microbiology and biotechnology**, v.25, p. 1305-1311, 2009.

DOS SANTOS, H.F.; CURY, J.C.; DO CARMO, F.L.; DOS SANTOS, A.L.; TIEDJE, J.; VAN ELSAS, J.D.; Rosado, A. S.; Peixoto, R. S. Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contaminationrevealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. **PLoS ONE**, v.6 p. 1–8, 2011.

DUMONT, M.G.; POMMERENKE, B.; CASPER, P.; CONRAD, R. DNA-, RNA- and mRNA-based stable isotope probing of aerobic methanotrophs in lake sediment. **Enviromental Microbiology**, v. 13, p. 1153-1167, 2011.

ELLEGAARD, M.; GIANG, N. N. T.; ANDERSEN, T. J.; MICHELSEN, A.; LAM, N. N.;. HAI, D. N.; KRISTENSEN, E.; WECKSTRÖM, K.; SON, T. P. H.; LUND-HANSEN, L. C. Temporal changes in physical, chemical and biological sediment

parameters in a tropical estuary after mangrove deforestation. Estuarine, Coastal and Shelf Science, v. 142, p. 32–40, 2014.

FASANELLA, 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, Air, and Soil Pollution**, v. 223, n. 7, p. 4233-4243. 2012.

FERNANDEZ-GOMEZ, B.; RICHTER, M.; SCHULER, M.; PINHASSI, J.; GACINAS, S.; M GONZALEZ, J.; PEDROS-ALIO C. Ecology of marine Bacteroidetes: a comparative genomics approach. **The ISME Journal** v.7, p.1026–1037, 2013.

FRIAZ-LOPEZ, J.; SHI, Y.; TYSON, G.M.; COLEMAN, M.L.; SCHUSTER, S.C.; CHISHOLM, S.W.; DELONG E.F. Microbial community gene expression in ocean surface waters. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 105, n. 10, p. 3805–3810, 2008.

FRIEDRICH, C. G.; BARDISCHEWSKY, F.; ROTHER, D.; QUENTMEIER, A.; FISCHER, J. Prokaryotic sulfur oxidation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n.3, p.253-259, 2005.

FRIEDRICH, C. G.; ROTHER, D.; BARDISCHEWSKY, F.; QUENTMEIER, A.; FISCHER, J. Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2873-2882, 2001.

FRIEDRICH, M. W. Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms. **Journal of Bacteriology**. v.184, n.1, p. 278–289, 2002.

GEETS, J.; BORREMANS, B.; DIELS, L.; SPRINGAEL, D.; VANGRONSVELD, J.; VAN DER LELIE, D.; VANBROEKHOVEN, K. DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. **Journal of Microbiolgical Methods**, v.66, p.194–205, 2006. GHIZELINI, A. M.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S.; MACRAE, A. Microbial diversity in Brazilian mangrove sediments – a mini review. Brazilian **Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p.1242-1254, 2012.

GILBERT, J.A.; FIELD, D.; HUANG, Y.;EDWARDS, R.; LI, W.; GILNA, P.; JOINT, I. Detection of large numbers of novel sequencer in the metetranscriptomes of complex marine microbial communities. **PIoS ONE**, v. 3, n. 8, p. 3042, 2008.

GIRI, C.; PRAKASH, O.; SINGH, A.; GILLETE, S.; KELMELIS, J.A. Mangrove forest distributions and dynamics (1975 – 2005) of the tsunami-affect region of Asia. **Journal of Biogeography**, v. 35, p. 519-528, 2008.

GOSALBES M.J.; DURBÁN, A.; PIGNATELLI, M.; ABELLAN, J.J.; JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ, N.; PEREZ-COBAS, A. E.; LATORRE A.MOYA, A. Metatranscriptomic Approach to Analyze the Functional Human Gut Microbiota. **PLoS ONE**, v.6, n.3 p. e17447, 2011.

GREIN, F.; RAMOS, A.R.; VENCESLAU, S.S.; PEREIRA, I.A. Unifying concepts in anaerobic respiration: insights from dissimilatory sulfur metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1827, n. 2, p. 145-160, 2013.

HALL, H. B. G. Predicting the evolution of antibiotic resistance genes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 430–435, 2004.

HANDELSMAN J.; RONDON, M.R.; BRADY, S.F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier of natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 10, p.245-249, 1998.

HEIDELBERG, J. F.; SESHADRI, R. ; HAVEMAN, S. A.; HEMME, C. L.;. PAULSEN, I. T.; KOLONAY, J. F.; EISEN, J. A.; WARD, N.; METHE, B.; BRINKAC, L. M.; DAUGHERTY, S. C.; DEBOY, R. T.; DODSON, R. J.; DURKIN, A.; MADUPU, R.; NELSON, W. C.; SULLIVAN, S. A.; FOUTS, D.; HAFT, D. H.; SELENGUT, J.; PETERSON, J. D.; DAVIDSEN, T. M.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; RADUNE, D.; DIMITROV, G.; HANCE, M.; TRAN, K.; KHOURI, H.; GILL, J.; RUTTERBACK, T.; FELDBLYUM, T. V.; DWALL, J.; VOORDOUW, G.; FRASER, C. M. The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium Desulfovibrio vulgaris Hildenborough. **Nature Biotechnology**, v.22, n. 5, p.554-559, 2004. HEWSON, I.; PORETSKY, R.S.; BEINART, R.A.; WHITE, A.E.; SHI, T.; BENCH, S.R.; MOISANDER, P.H.; PAERL, R.W.; TRIPP, H.J.; MONTOYA, J.P.; MORAN, M.A.; ZEHR, J.P. In situ transcriptomic analysis of the globally important keystone N2-fixing taxon Crocosphaera watsonii. **The ISME Journal**, v. 3, p. 618–631, 2009a.

HEWSON, I.; PORETSKY, R.S.; DYHRMAN, S.T.; ZIELISNKI, B.; WHITE, A.E.; TRIPP, H.J.; MONTOYA J.P.;, ZEHR J.P. Microbial community gene expression within colonies of the diazotroph, Trichodesmium, from the Southwest Pacific Ocean. **The ISME Journal**, v. 3, n. 11, p. 1286–1300, 2009b.

HINRICHS, K. U.; BOETIUS, A. The anaerobic oxidation of methane: new insights in microbial ecology and biogeochemistry. in: **Ocean margin systems**. Springer Berlin Heidelberg. p. 457-477, 2003.

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

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

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

HUANG, W.E.; FERGUSON, A.; SINGER, A.C.;LAWSON, K.; THOMPSON, I.P.; KALIN, R.M; Larkin, M.J.; Bailey, M.J.; and Whiteley, A.S.. Resolving genetic functions within microbial populations: in situ analyses using rRNA and mRNA stable isotope probing coupled with single-cell Raman-fluorescence in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 234-241, 2008.

JAUBERT, C.; DANIOUX, C.; OBERTO, J.; CORTEZ, D.; BIZE, A.; KRUPOVIC, M.; SHE, Q.; FORTERRE, P.; PRANGISHVILI, D.; SEZONOV, G. Genomics and genetics of Sulfolobus islandicus LAL14/1, a model hyperthermophilic archaeon. **Open Biology**, v.3, p. 1-19, 2016. KIMURA M . "A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences". **Journal of Molecular Evolution**. V.16, n.2. p.111–120, 1980.

KRAUSS, K. W.; MCKEE, K. L.; LOVELOCK, C. E.; CAHOON, D. R.; SAINTILAN, N.; REEF, R.; CHEN, L. How mangrove forests adjust to rising sea level. **New Phytologist**. v.202, p. 19–34, 2014.

LIU, Y.; BEER, L.L.; WHITMAN, W.B. Sulfur metabolism in archaea reveals novel processes. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 10, p. 2632-2644, 2012.

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.

LYIMO, T.J.; POL, A.; OP DEN CAMP, H.J.M. Sulfate reduction and methanogenesis in sediments of Mtoni Mangrove Forest, Tanzania. **Journal of the Human Environment,** v. 31, n. 7, p. 614-616, 2002.

MADIGAN, M. T. MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Brock Biology of Microorganisms, 11<sup>th</sup> ed., 2005.1160 p.

MADIGAN, M. T. MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**, Prentice hall, 11<sup>th</sup> ed., 2002. 1140 p.

MAHADEVAN, P.; SETO, D. Rapid pair-wise synteny analysis of large bacterial genomes using web-based GeneOrder4.0. **BMC Research Notes**, 2010 v. 3, n. 41. p.1-5, 2010.

MARCHETTIA, A.; SCHRUTHA, D.M.; DURKINA, C.A.; PARKERA, M.S.; KODNERA, R. B.; BERTHIAUMEA, R. MORALESA, C. T.; ALLENB, A. E.; ARMBRUSTA, E. V. Comparative metatranscriptomics identifies molecular bases for the physiological responses of phytoplankton to varying iron availability. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 109 n. 6, p. 317–325, 2012.

MCCARREN J.; BECKER J.W.; REPETA D.J.; SHI Y., YOUNG C.R.; MALMSTROM R.R.; CHISHOLM S.W.; DELONG E.F. Microbial community transcriptomes reveal

microbes and metabolic pathways associated with dissolved organic matter turnover in the sea. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, n.38, p.16420-16427, 2010.

MENDES, R.; KRUIJT, M.; BRUIJN, I.; DEKKERS, E.; VAN DER VOORT, M.;. SCHNEIDER, J.H.M; PICENO, Y.M.; DESANTIS, T.Z. ANDERSEN, G.L.; BAKKER, P.A.H.M.; RAAIJMAKERS, J.M. Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria. **Science**, v. 332, n. 6033 p. 1097-1100 2011.

MEYER, B.; KUEVER, J. Molecular analysis of the diversity of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes in the environment, using aprA as functional marker gene. **Applied Environmenal Microbiology**, v. 73, n. 23, p. 7664-7679, 2007a.

MEYER, F.; OVERBEEK; R.; RODRIGUEZ. A. FIGfams: yet another set of protein families. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 20, p. 6643–6654, 2009.

MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B.A., MCCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, v. 5, p. 621–628, 2008.

MUSSMANN, M.; RICHTER, M.; LOMBARDOT, T.; MEYERDIERKS, A.; KUEVER, J.; KUBE, M.; GLOCKNER, F.O.; AMANN, R. Clustered genes related to sulfate respiration in uncultured prokaryotes support the theory of their concomitant horizontal transfer. **Journal Of Bacteriology**, v.187, n. 20, p. 7126–7137, 2005.

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

MYROLD, D.;, L. H. Z.; JANSSON. J. K. Dep. of Crop and The Potential of Metagenomic Approaches for Understanding Soil Microbial Processes. **Journal of Soil Science**, v.78, n.3–10, p; 1-8, 2013.

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 pristine and anthropized Brazilian mangroves. **Regional Studies in Marine Science**, v. 2, p. 56-64, 2015. OLIVEIRA, M.A.J.; VIDAL-TORRADO, P.; OTTERO, X.L.; FERREIRA, R.J. Mercurio total em solos de manguezais da baixada santista e ilha do cardoso, estado de São Paulo. **Química Nova**, v.30, p.519-524, 2007.

OLIVEIRA, T.F.; FRANKLIN, E.; AFONSO, J.P.; KHAN, A.R.; OLDHAM, N.J.; PEREIRA, I.A.; ARCHER, M. Structural insights into dissimilatory sulfite reductases: structure of desulforubidin from desulfomicrobium norvegicum. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 71, 2011.

ONTIVEROS-VALENCIA A., ZIV-EL M., ZHAO H. P., FENG L., RITTMANN B. E., KRAJMALNIK-BROWN R. Interactions between nitrate-reducing and sulfate-reducing bacteria coexisting in a hydrogen-fed biofilm. **Environmental Science andTechnology**, V.46, p. 11289–11298, 2012.

PEIXOTO, R.; CHAER, G.M.; CARMO, F.L.; ARAUJO, F.V.; PAES, J.E.; VOLPON, A.; SANTIAGO, G.A.; ROSADO, A.S. Bacterial communities reflect the spatial variation in pollutant levels in Brazilian mangrove sediment. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 2, p. 341-354, 2011.

PEREIRA E SILVA, M.C.; SEMENOV A.V.; VAN ELSAS J.D.; SALLES J.F. Seasonal variations in the diversity and abundance of diazotrophic communities across soils. **FEMS Microbial Ecology**, v. 77, p. 57–68, 2011.

PIRES, R.H. VENCESLAU, S.S.; MORAIS, F.; TEIXEIRA, M.; XAVIER, A.V.; PEREIRA, I.A.; Characterization of the Desulfovibrio desulfuricans ATCC 27774 DsrMKJOP complex-a membrane-bound redox complex involved in the sulfate respiratory pathway. **Biochemistry**, v.45,n.1, p.249-62, 2006.

PLUGGE, C. M.; ZHANG, W.; SCHOLTEN, J. C. M.; STAMS A. J. M. Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria. **Frontiers in Microbiolgy**, v.2 ,n.81, p. 1-8, 2011.

POHORELIC B.K.; VOORDOUW J.K.; LOJOU E, DOLLA A.; HARDER J.; VOORDOUW G. Effects of deletion of the genes enconding Fe-only hydrigenases of desulfovibrio vulgaris hildenborough on hydrogen and lactate metabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 184(3),p. 679-686, 2002.

PORETSKY, R.S., BANO, N., BUCHAN, A., LECLEIER, G., KLEIKEMPER, J., PICKERING, M., PATE W.M.; MORAN M.A.; HOLLIBAUGH JT. Analysis of microbial gene transcripts in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 4121–4126, 2005.

PORETSKY, R.S.; HEWSON, I.; SUN, S.L.; ALLEN, A.E.; ZEHR, J.P.; MORAN, M.A. Comparative day/night metatranscriptomic analysis of microbial communities in the North Pacific subtropical gyre. **Environmental Microbiology**, v.11, p. 1358–1375, 2009.

PORETSKY, R.S.; SUN, S.; MOU, X.; MORAN, M.A. Transporter genes expressed by coastal bacterioplankton in response to dissolved organic carbon. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 616–627, 2010.

PUNTA, M.; COGGILL, P. C.; EBERHARDT, R. Y.; MISTRY, J.; TATE, J.; BOURSNELL, C.; PANG, N.; FORSLUND, K.; CERIC, G.; CLEMENTS, J.; HEGER, A.; HOLM, L.; SONNHAMMER, E. L. L.; EDDY S. R;, BATEMAN, A.; FINN. R. D. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n.1, p. 222-230, 2012.

RABUS, R.; HANSEN, T.A.; WIDDEL, F. Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. Prokaryotes, CHAPTER 1.22. v.2, p.659–768, 2006.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agronômico, 2001. 285 p.

RAMOS A.R.; KELLER, K. L.; WALL, J. D.; PEREIRA, I. A. C. The membrane QmoABC complex interacts directly with the dissimilatory adenosine 5-phosphosulfate reductase insulfate reducing bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 3 p.1-10, 2012

RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; RAJANDREAN, M.; BARREL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics Applications**, v. 16, n.10, p. 944-945, 2000.

SÁ, A.L.B. Diversidade de rizobactérias endoglicoliticas isoladas de mangue vermelho (*Rhizophora mangle*). 2008. 61 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. Disponível em: <a href="http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-05012009-103835/pt-br.php">http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-05012009-103835/pt-br.php</a>> acesso em: 20 de maio 2016.

SAITOU N.; NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, n.4, p.406-25, 1987.

SANTOS, H.F.; CARMO, F.L.; PAES, J.E.S.; ROSADO, A.S.; PEIXOTO, R.S. Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 216, n. 1, n. 4, p. 329-350, 2010.

SCHEID, D.; STUBNER, S. Structure and diversity of Gram-negative sulfate-reducing bacteria on rice roots. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 36, p.175-183, 2001.

SCHINK, B. Microbially driven redox reactions in anoxic environments: Pathways, energetics, and biochemical consequences. **Engineering in Life Sciences**, v.6. n.3, p. 228-233, 2006.

SHRESTHA, P.M.; KUNE, M.; REINHARDT, R.; LIESACK, W. Transcriptional activity of paddy soil bacteria communities. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 4, p.960–970, 2009.

SIEVERT, S.; KIENE, R.P.,; SCHULZ-VOGT, H.N. The Sulfur Cycle. **Oceanography**, v.20, n. 2, p.117-123, 2007.

STINGL, U.; GIOVANNONI, S. J. Molecular Diversity and Ecology of Microbial Plankton. **Nature**, v.437, p.343-348, 2005.

SUENAGA H. Targeted metagenomics: a high-resolution metagenomics approach for specific gene clusters in complex microbial communities. **Environmental Microbiology**, v.14, p. 13-22. 2012.

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, n. 4, p.401–411, 2010.

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

TAMURA, K. ; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, n.8, p.1596–1599. 2007.

TEKAIA, F. Inferring Orthologs: Open Questions and Perspectives. **Genomics Insights**, v.9, p.17–28, 2016.

TESKE, A.; DURBIN, A.; ZIERVOGEL, K.; COX, C.; ARNOSTI C. Microbial Community Composition and Function in Permanently Cold Seawater and Sediments from an Arctic Fjord of Svalbard. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 77, n.6, p. 2008–2018, 2011.

THATOI, H.; CHANDRA, B.; RASHMI, B.; MISHRA, R.; DUTTA, S. K. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. **Annals of Microbiology**, v.63, p.1–19, 2013.

THULLNER, M.; DALE, A. W.; REGNIER, P. Global scale quantification of mineralization pathways in marine sediments: A reactiontransport modeling approach. **Geochemistry, Geophysics, Geosystems**, v.11, n. 12, p. 1-24, 2009.

TOSELAND, A.; MOXON, S.; MOCK, T.; MOULTON, V. Metatranscriptomes from diverse microbial communities: assessment of data reduction techniques for rigorous annotation. **BMC Genomics**, v. 15, n. 901, p. 1-7, 2014.

URICH T.; LANZÉN A.Q.I.J.; HUSON D.H.; SCHLEPER C.; SCHUSTER S.C. Simultaneous Assessment of Soil Microbial Community Structure and Function through Analysis of the Meta-Transcriptome. **PLoS One**, v.3, n. 6 p.1-13, 2008.

VARON –LOPEZ, M. Descrição da microbiota relacionada as transformações do enxofre em sedimentos de manguezais. 2013. 108p. Tese (Doutorado em Microbiologia agricola) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013. Disponivel em: <a href="http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-30102013-144329/pt-br.php">http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/1138/tde-30102013-144329/pt-br.php</a> acesso em: 20 junho 2014.

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**, v.16, n. 3. p. 845-55, 2013.

VASCONCELLOS, S. P.; ANGOLINI, C. F. F.; SIERRA-GARCIA, I. N.; DELLAGNEZZE, B. M.; SILVA, C. C.; MARSAIOLI, A. J.; SANTOS NETO, E. V.; OLIVEIRA, V. M. Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs. **Organic Geochemistry**, v.41, p.675-681, 2010.

VENCESLAU, S.S.; CORT, J.R.; BAKER, E.S.; CHU R.K.; ROBINSON, E.W.; DAHL, C.; SARAIVA, L.M.; PEREIRA, I.A.C. Redox states of Desulfovibrio vulgaris DsrC, a key protein in dissimilatory sulfite reduction, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 441 (2014) 732–736.

ZHI,W.; GE, Z; HE, Z.; ZHANG, H. Methods for understanding microbial community structuresand functions in microbial fuel cells: A review. **Bioresource Technology**, v. 171, p.461–468, 2014.

ZHOU, J.; HE, Q.; HEMME, C.L.; MUKHOPADHYAY, A.; HILLESLAND, K.; ZHOU, A.; HE, Z.; VAN NOSTRAND, J.D.; HAZEN, T.C.; STAHL, D.A.; WALL, J.D.; ARKIN, A.P. How sulphate-reducing microorganisms cope with stress: lessons from systems biology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 452-466, 2011.