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

**Transformações do nitrogênio e diversidade de *Planctomycetes* em
sedimentos de manguezais**

Danice Mazzer Luvizotto

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

**Piracicaba
2013**

Danice Mazzer Luvizotto
Licenciada em Ciências – Habilitada em Biologia

Transformações do nitrogênio e diversidade de *Planctomycetes* em sedimentos de manguezais

Orientadora:
Profa. Dra. **ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER**

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

Piracicaba
2013

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

Luvizotto, Danice Mazzer

Transformações do nitrogênio e diversidade de *Planctomycetes* em sedimentos de manguezais / Danice Mazzer Luvizotto. - Piracicaba, 2013.
107 p: il.

Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Bactérias anaeróbicas 2. Desnitrificação 3. Ecossistema de mangue 4. Microbiologia do solo 5. Sequenciamento genético I. Título

CDD 631.46
L976t

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

Aos meus pais, Osmar e Maria Inês
Meus irmãos, Daniela, Daniel e Danila
E ao meu noivo, Henrique
Por me apoiarem e me entenderem
Em todas as decisões.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me proporcionado serenidade, saúde e paciência para concluir este trabalho de doutorado.

À orientadora Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner, por esses quase nove anos de confiança e convivência.

Ao co-orientador, extra-oficial, Prof. Dr. Fernando Dini Andreote, também por todos os anos de convivência e paciência.

À agência de fomento CNPq, pela concessão das bolsas de doutorado e doutorado sanduíche.

À FAPESP, pelo financiamento do projeto do qual este trabalho fez parte.

Ao Dr. Itamar Soares de Melo, coordenador do projeto Manguezais, por todo apoio e estrutura disponibilizada.

Aos colegas do laboratório ‘Microbiologia do Solo’: Ademir, Armando, Cristiane, Danielle, Diogo, Dorotéia, Emiliana, Fábio, Júlia, Juliana, Luana, Lucas, Marcos Vinícius, Maryeimy, Mylenne, Pedro, Simone e Thiago.

Aos colegas do laboratório ‘Genética de Microrganismos Prof. João Lúcio de Azevedo’: Andrea, Bruna, Giulia, Joelma, José Antonio (Zezo), Maria Carolina, Maria Letícia, Renata e Sarina.

Aos técnicos que tanto me ajudaram no decorrer deste trabalho: José Antonio (Zezo), Denise, Luiz Fernando, e João Silva.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica: Prof. Dr. Kitajima, Dr. Francisco e ao técnico Renato, por disponibilizar o uso e auxiliar durante o manuseio do microscópio de fluorescência.

A todos os colegas do curso PPG Microbiologia Agrícola.

Aos funcionários do departamento de Genética e Ciência do Solo ESALQ/USP.

As secretárias do PGG Microbiologia Agrícola Giovanna e Maria Fernanda.

My special thanks to Fitness Group, MPI, for receive me and teach me everything that I needed at my time in Germany, specially Prof. Dr. Ir Marc Strous, fitness group head, Beate and Zanaib, colleagues and friends. Thank you for your great patience, mainly with my poor English.

Agradeço a todos os colegas de trabalho que foram se tornando amigos, e que estiveram presentes em períodos distintos ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Entre eles, a amiga Joelma, por seu apoio e companheirismo desde o início, ainda na iniciação científica, no mestrado e na reta final do doutorado. Aos amigos: Anderson, Armando, Carlos, Cristiane, Francisco e Zezo, por todos sábios conselhos, brincadeiras e colaboração, principalmente no início deste trabalho. Aos amigos, Armando (novamente), Michele e Sandy, que me apoiaram, escutaram e me divertiram durante o período do doutorado sanduíche, o mais difícil deste trabalho. E finalmente, agradeço o companheirismo e amizade das ‘meninas’ Júlia, Juliana e Mylenne, que têm estado presentes principalmente nesta reta final do doutorado.

Agradeço à minha família e amigos, especialmente meus pais, Osmar e Maria Inês, aos meus irmãos, e ao meu noivo Henrique, que acompanharam de perto todas as etapas pelas quais passei durante o desenvolvimento deste trabalho, principalmente pela paciência.

“Tudo o que nós precisamos é de um pouco de paciência”

William A. Rose

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Revisão Bibliográfica	13
1.1.1 O Ecossistema Manguezal	13
1.1.2 O nitrogênio e os sedimentos	15
1.1.3 O Nitrogênio e a atmosfera terrestre	17
1.1.4 O ciclo do nitrogênio	18
1.1.5 Fixação de nitrogênio	20
1.1.6 Nitrificação	22
1.1.7 Desnitrificação	23
1.1.8 Bactérias oxidadoras anaeróbias de amônio - anammox	25
1.1.9 Redução Dissimilatória de Nitrato a Amônia – DNRA	27
Referências	29
2 TRANSFORMAÇÕES DO NITROGÊNIO EM SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS	41
Resumo	41
Abstract	41
2.1 Introdução	42
2.2 Desenvolvimento	45
2.2.1 Material e Métodos	45
2.2.1.1 Descrição dos locais de coleta	45
2.2.1.2 Sequenciamento de DNA ambiental	55
2.2.1.3 Seleção de genes relacionados ao ciclo do nitrogênio	50
2.2.3 Mapeamento metabólico das transformações do nitrogênio em sedimento de manguezais - dados metagenômicos	51
2.2.1.5 Sequenciamento de RNA ambiental	51
2.2.1.6 Mapeamento metabólico das transformações de nitrogênio em sedimentos manguezais - dados metatranscriptômicos	52
2.2.1.7 Determinação das taxas de desnitrificação, anammox e DNRA por meio de incubações com ¹⁵ N marcado	52
2.3 Resultados e discussão	53

2.3.1 Avaliação metagenômica dos genes relacionados às transformações do nitrogênio nos sedimentos de manguezais	53
2.3.2 Mapeamento metabólico das transformações de nitrogênio em sedimentos do manguezais	61
2.3.3 Determinação da ocorrência da desnitrificação, anammox e DNRA	62
2.4 Conclusões do capítulo	70
Referências	70
3 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE <i>Planctomycetes</i> EM SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS	79
Resumo	79
Abstract	79
3.1 Introdução	80
3.2 Desenvolvimento	83
3.2.1 Seleção de sequências afiliadas à <i>Planctomycetes</i>	83
3.2.2 Separação em UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais)	83
3.2.3 Análises filogenéticas	84
3.2.4 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization FISH)	84
3.3 Resultados e discussão	85
3.3.1 Seleção de sequências afiliadas à <i>Planctomycetes</i>	85
3.3.2 Separação em UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais)	87
3.3.3 Análises filogenéticas	88
3.3.4 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization FISH)	92
3.4 Conclusões do capítulo	94
Referências	95
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
ANEXO	105

RESUMO

Transformações do nitrogênio e diversidade de *Planctomycetes* em sedimentos de manguezais

O nitrogênio é o quinto elemento mais abundante em nosso sistema solar, é essencial para a síntese de ácidos nucleicos e proteínas, os dois polímeros mais importantes da vida. Apesar da importância do nitrogênio e sua abundância na atmosfera, o N_2 é praticamente inerte; assim, as formas de nitrogênio inorgânico fixados mais comuns são os íons nitrato e amônio que muitas vezes limitam a produtividade primária nos ecossistemas marinhos e terrestres. Uma biosfera ativa requer a incorporação do nitrogênio em moléculas biológicas por meio da fixação de nitrogênio, um processo no qual os domínios em procarióticos *Bacteria* e *Archaea* reduzem gás nitrogênio em amônia. Porém, a maioria dos organismos não pode fixar nitrogênio, mas sim obtê-lo na forma de nitrogênio orgânico a partir do ambiente, ou a partir da redução do nitrato. O amônio é retornado para o ambiente quando os organismos morrem e isto depende da presença do oxigênio nestes locais. Na presença do oxigênio, o amônio é oxidado em nitrato, numa via conhecida como nitrificação. Na ausência de oxigênio, o nitrato é utilizado por muitos microrganismos como um receptor de elétrons, como na redução dissimilatória de nitrato a amônia (DNRA), acoplada à oxidação anaeróbica de carbono orgânico; o nitrato pode ser convertido em gás dinitrogênio pela desnitrificação, ou ainda uma via alternativa pode transformar o nitrogênio fixado em N_2 , realizada por um grupo de bactérias conhecido como planctomycetes, onde a oxidação do amônio é acoplada a redução de nitrato, no processo chamado anammox. Neste trabalho de tese foi realizada a avaliação do ciclo do nitrogênio, buscando entendimento de três vias de transformação deste elemento. Neste sentido, estas vias foram avaliadas quanto as suas taxas de ocorrência, com uso incubações do sedimento de manguezais e nitrogênio marcado, como também por meio da identificação de genes funcionais envolvidos nestes três processos, por meio de pirosequenciamento. O grupo *Planctomycetes* ainda pode ser estudado utilizando a hibridização com sonda fluorescente *in situ* FISH. Os resultados indicam a presença marcante de genes identificados como parte da via desnitrificação, assim como as taxas de incubação observadas para esta via foram muito expressivas quando comparadas com as taxas obtidas para o processo anammox e DNRA. Os resultados obtidos com as análises metagenômicas e com a técnica FISH sustentam os resultados obtidos com as incubações. Pode-se observar que a filogenia sugere a tendência do agrupamento com organismos planctomycetes não descritos como responsáveis pelo processo anammox. Por meio da técnica FISH pode-se confirmar a detecção destas bactérias e visualizar sua menor presença nos manguezais amostrados, quando comparadas às bactérias totais encontradas nestas amostras.

Palavras-chave: Anammox bactéria; Desnitrificação; DNRA

ABSTRACT

Nitrogen transformations and *Planctomycetes* diversity in mangrove sediments

Nitrogen is the fifth most abundant element in our solar system, essential for the synthesis of nucleic acids and proteins, one of the most important polymers of life. Despite the importance of nitrogen and its overwhelming abundance in the atmosphere, N_2 is practically inert, so the most common forms of inorganic nitrogen fixed are nitrate and ammonium ions, which often limit primary productivity in marine and terrestrial ecosystems. An active biosphere requires the incorporation of nitrogen in biological molecules through nitrogen fixation, a process in which domains *Archaea* and *Bacteria* reduce nitrogen gas into ammonia. The most organisms can't fix nitrogen, but they can get it in inorganic nitrogen form from the environment or from the reduction of nitrate. The ammonia is returned to environment when organisms die and it depends on the presence of oxygen at these sites. In the presence of oxygen, ammonia is oxidized to nitrate, in a way known as nitrification, and in the absence of oxygen, the nitrate being used by many microbes as an electron acceptor, such as dissimilatory nitrate reduction to ammonia (DNRA), coupled to anaerobic oxidation of organic carbon. The nitrate can be converted to dinitrogen gas by denitrification, or an alternative route can turn fixed nitrogen in N_2 , performed by a bacteria group known as *Planctomycetes*, where oxidation is coupled to the ammonium nitrate reduction, in a process called anammox. In this work, with mangrove sediments from Bertioga city, State of São Paulo, the evaluation of these three pathways of nitrogen transformation was performed as their rates of occurrence, with incubations with labeled nitrogen, as well as through the identification of functional genes involved in these three cases, by pyrosequencing. The group *Planctomycetes* can also be studied using the hybridization probe FISH fluorescence *in situ*. The results show the strong presence of genes identified as part of the denitrification pathway, as well as the rates observed for incubation of this pathway were very significant when compared with the rates obtained for the process anammox and DNRA. The results obtained from the metagenomic analyze and the FISH technique support the results obtained with incubations. It can be observed that the trend suggests the phylogeny of the organisms group with *Planctomycetes* not described as responsible for anammox process. Through the FISH technique, it was possible to confirm the detection of these bacteria and view its reduced presence in mangrove sampled compared to total bacteria found in these samples.

Keywords: Anammox bacteria; Denitrification; DNRA

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 estes ambientes. Os manguezais são um exemplo deste tipo de ecossistema, pois é composto por espécies de plantas, animais e microrganismos selecionados por características ambientais únicas, originadas pela localização na interface entre o continente e o oceano em regiões intertropicais, conferindo condições como salinidade e alterações sazonais na disponibilidade de nutrientes.

Em manguezais, bactérias, arqueias e fungos constituem uma comunidade microbiana diversa e produtiva, tendo como principal função a ciclagem de nutrientes. Estes locais têm se destacado como '*hotspots*' para o estudo de micro-organismos presentes em sedimentos e associados às plantas e animais endêmicos. Embora os manguezais apresentem elevados teores de matéria orgânica são, de maneira geral, deficientes em nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo que, apesar de abundantes, não se encontram prontamente disponíveis neste ambiente com características redutoras, tornando a matéria orgânica de difícil degradação.

Com relação as transformação do nitrogênio, o nitrato é uma das formas de nitrogênio assimilável (juntamente com o amônio) e pode atuar comoceptor final de elétrons para muitas reações bacterianas na ausência de oxigênio. Assim, em ambientes anaeróbios, alguns processos podem competir por este composto, como por exemplo, os processos de desnitrificação, redução dissimilatória de nitrato a amônio (DNRA) e oxidação anaeróbica de amônio (anammox). Neste intuito, este trabalho teve por objetivo estudar as transformações do nitrogênio nestes locais, com destaque para as transformações do nitrato e nitrito, buscando um maior entendimento deste ciclo biogeoquímico e dos microrganismos envolvidos nestas transformações.

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 O Ecossistema Manguezal

O ecossistema Manguezal apresenta-se amplamente distribuído geograficamente, cobrindo cerca de 60 a 75% da linha costeira mundial, entre os trópicos de Câncer e Capricórnio, se estendendo das latitudes 30°N a 30°S. 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 et al., 2001; GIRI et al., 2008; JENNERJAHN et al., 2002). Estes locais são caracterizados como ambientes tropicais costeiros localizados na interface terra e mar, sob grande influência de marés e de água salobra (*i.e.* mistura de água doce e salgada), o que confere a estes ambientes características únicas e específicas (DIAS et al., 2009; ZHOU et al., 2008).

O Brasil tem uma das maiores extensões de manguezais do mundo que ocorrem ao longo do litoral, desde o Cabo Orange no Amapá, até o município de Laguna em Santa Catarina, abrangendo uma área de 20.000 km². 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 encontram-se uma das maiores concentrações de manguezais do estado (CURY, 2002), apresentando uma área de cobertura vegetal de 675 km², dos quais 125 km² correspondem a áreas típicas de manguezal (HOLGUIN et al., 2001; CUNHA-LIGNON et al., 2009).

Este ecossistema é altamente produtivo, principalmente devido ao grande quantidade de nutrientes oriundos dos rios que se depositam em seu sedimento; possui ainda alta diversidade de peixes, crustáceos, aves, répteis e mamíferos. Toda esta diversidade exige uma alta disponibilidade de nutrientes no início da cadeia trófica (HOLGUIN et al., 2006).

A atividade microbiana é então a principal via de ciclagem de nutrientes do manguezal, onde a matéria orgânica é composta e os nutrientes são fixados. Assim, pode-se dizer que as comunidades microbianas formam a base da cadeia alimentar da flora e fauna deste ecossistema, o que torna o ambiente altamente dependente dos microrganismos. É possível formular a hipótese de que na ausência ou redução da microbiota, haverá prejuízo nas atividades ecológicas, possivelmente resultando na destruição dos manguezais (HOLGUIN et al., 2001).

Apesar de possuir muita matéria orgânica, os ecossistemas de manguezal sofrem por deficiência de alguns nutrientes, especialmente o nitrogênio e o fósforo. A alta taxa de suprimento desses nutrientes está relacionada à atividade microbiana, que em manguezais tropicais e subtropicais transformam a vegetação morta em fontes de nitrogênio, fósforo e outros nutrientes que podem ser usados pelas plantas (BASHAN; HOLGUIN, 2002). Assim as bactérias estão envolvidas em processos de transformação de nutrientes (*e.g.* amonificação, nitrificação e desnitrificação) (HOLGUIN et al., 2001). Dessa forma, nos manguezais ocorre uma interdependência entre micro e macro-organismos, onde os macro-organismos dependem das bactérias na reciclagem de nutrientes, e as bactérias se beneficiam através da absorção de

fontes de carbono oferecidas principalmente pela vegetação (HOLGUIN et al., 2001; HOLGUIN et al., 2006).

O bioma mangue é ainda pouco compreendido em relação a suas comunidades microbianas e vias biogeoquímicas. Muitos estudos precisam ainda ser concretizados para que se possamos ter uma visão melhor do funcionamento destes locais. Além disso, o ecossistema manguezal é por vezes erroneamente associado com área improdutiva. Por este motivo, sofrem muito impacto ambiental, de origem industrial ou causada pela espécie humana, o que tem levado os manguezais a uma situação insustentável, que o coloca como um ambiente em extinção na superfície terrestre (DUKE et al., 2007).

Muitos trabalhos têm sido realizados em manguezais com diferentes abordagens microbiológicas. Dias et al. (2010), por exemplo, avaliaram a diversidade bacteriana presente em sedimentos de manguezal preservado da Ilha do Cardoso, São Paulo, por meio de técnicas independentes de cultivo. Em outro trabalho, Dias et al., (2012a) realizaram um estudo com a comunidade bacteriana presente na filosfera de plantas de dois diferentes manguezais, nas cidades de Bertioga e Cananéia, São Paulo. Já Fasanella et al. (2012) estudaram a comunidade fúngica selecionada por contaminação de óleo no manguezal de Bertioga. E ainda, de maneira mais abrangente, Andreote et al. (2012) estudaram o microbioma presente em manguezais brasileiros por meio de abordagens metagenômicas. Desta forma, o aumento de estudos relacionados ao Bioma Mangue, a importância dos micro-organismos presentes nestes locais e a relação destes com *habitat* nos conduzem a um objetivo maior, promovendo a conscientização da população e a preservação destes locais.

1.1.2 O Nitrogênio e os sedimentos

Ecossistemas marinhos sedimentares abrangem mais da superfície da Terra do que qualquer outro *habitat*. Embora a biodiversidade destes locais não receba a atenção necessária, ela apresenta grande importância para os recursos que extraem do mar, para a saúde do ambiente marinho e para a qualidade de vida humana (WESLAWSKI et al., 2004). Muitos dos processos ecossistêmicos que ocorrem em sedimentos marinhos também têm consequências importantes para a sustentabilidade dos ecossistemas avaliados pela sociedade humana (por exemplo, estabilização da linha costeira, reciclagem de lixo, etc.).

Sedimentos são essencialmente sistemas heterotróficos, no qual partículas de matéria orgânica que foram produzidas na água (fitoplâncton, zooplâncton) ou derivadas da terra

(madeira, folhas, resíduos, etc.) (LEWIS, 1973). Os invertebrados processam o material grosseiro dos sedimentos em grãos finos, que serão então ainda mais degradados por fungos e bactérias. O receptor de elétrons mais importante durante a degradação da matéria orgânica é o oxigênio. A alta atividade aeróbica, como a respiração por micro-organismos, pode rapidamente diminuir a concentração de oxigênio circundante. Se este processo ocorrer mais de forma mais rápida (comparando com fornecimento do oxigênio vindo da fase superior da água), condições anóxicas serão estabelecidas (WALLACE et al., 1996).

Na degradação da matéria orgânica o oxigênio é utilizado em primeiro lugar, seguido do nitrogênio contido nos nitratos, óxidos de manganês, óxidos de ferro e óxidos de enxofre. A consequência desta sequência de reações é a de que o oxigênio dissolvido é rapidamente removido das águas nos milímetros superiores e nos poucos centímetros de sedimentos nas margens continentais ao longo dos oceanos. Portanto, os processos mais importantes que ocorrem na água marinha são desnitrificação e redução de sulfato (MARTIN; SAYLES, 2007).

No caso dos compostos nitrogenados, a amônia é produzida pela decomposição de matéria orgânica nitrogenada tal como aminoácidos e ácidos nucleicos. No entanto, altas concentrações de amônio podem se acumular, uma vez que este íon é relativamente estável em condições anóxicas, predominando na maioria dos sedimentos (MANINI et al., 2003).

O nitrato pode ser biologicamente acumulado e transportado para a profundidade. Sua geração de energia é útil para vias metabólicas quando sua redução é acoplada à oxidação de compostos reduzidos, como NH_4^+ , matéria orgânica (C org), ferro (Fe^{2+}) e sulfureto de amônio (H_2S), todos potenciais doadores de elétrons para a redução de nitrato em profundidade (PROKOPENKO et al., 2011). O transporte de nitrato biológico, a oxidação do carbono e as implicações para a absorção de nitrato no ciclo e transporte do N biológico e parece ser uma estratégia amplamente utilizada para organismos vivos dentro de sedimentos marinhos ricos em matéria orgânica em regiões deficientes de O_2 . Ao contrário de O_2 , o nitrato pode ser concentrado e armazenado, o que torna um aceitador de elétrons facilmente transportável. Esta estratégia permite que os organismos possam expandir seu *habitat* em áreas com disponibilidade limitada de receptores de elétrons (NEALSON; BERELSON, 2003).

1.1.3 O nitrogênio e a atmosfera terrestre

O planeta Terra possui aproximadamente 4,6 bilhões de anos e, desde seu surgimento, a atmosfera terrestre tem sofrido vários tipos de transformações químicas, sendo elas cruciais para o desenvolvimento de nossa atual atmosfera (JARDIM; CHAGAS, 2011; SCHOPF, 1999). O processo que mais contribuiu para estas transformações foi o desenvolvimento da vida, que surgiu e ainda é predominantemente microbiana. Registros fósseis indicam que as primeiras formas de micro-organismos estavam presentes no planeta já há 3,6 bilhões de anos (SCHOPF, 1999).

Sabemos que, durante o período Arqueano (durante os primeiros 2,5 bilhões de anos do planeta), o esfriamento gradual da crosta terrestre e a pressão atmosférica adequada permitiram a condensação do vapor de água e sua precipitação sob a forma de chuvas (SALGADO-LABOURIAU, 1994). Nesse cenário, descargas elétricas liberadas pela colisão de nuvens eletricamente carregadas podem ter contribuído como uma poderosa fonte de energia para ativar reações biossintéticas entre moléculas de gases na atmosfera ou na água. Ainda na atmosfera, a radiação solar ultravioleta, também pode ter sido responsável pela formação de moléculas. No planeta ainda jovem, o vulcanismo era muito intenso e, grande quantidade de gases aprisionados abaixo da crosta foram eliminados para atmosfera. Com o esfriamento gradual da Terra, o processo diminuiu, mas continua nos vulcões e chaminés hidrotermais submarinos, onde o calor pode ter sido uma razoável fonte de energia para a biossíntese de substâncias orgânicas a partir de moléculas dos gases liberados (BRACK, 1998).

É proposto que a atmosfera primitiva era composta de metano (CH_4), amônia (NH_3), hidrogênio molecular (H_2) e vapor de água (H_2O). O oxigênio molecular (O_2) não estaria presente na atmosfera bilhões de anos atrás (antes do surgimento dos primeiros organismos), pois é resultado da fotossíntese. Adicionalmente, observou-se que o oxigênio reage facilmente com substâncias orgânicas, oxidando-as, o que impediria o acúmulo das moléculas prébióticas que, por fim, resultariam na primeira forma de vida (MILLER, 1955; BRACK, 1998).

Por mais 500 milhões de anos os organismos viveram evitando o ambiente oxidante, adaptando-se bioquimicamente a essa nova realidade através da produção de enzimas protetoras de espécies altamente reativas como os radicais oxigenados. Enquanto isso, a concentração do oxigênio aumentava na troposfera. Finalmente, os organismos hoje ditos aeróbios foram cada vez mais se adaptando ao aumento da concentração de oxigênio na atmosfera, até que nestes últimos 500 milhões de anos eles saíram da água para povoar a terra.

seca. Resumidamente, foram necessários mais de um bilhão de anos para que esses organismos se adaptassem ao maior impacto ambiental que a Terra já vivenciou, ou seja, a mudança da uma atmosfera redutora para altamente oxidante como esta em que vivemos nos dias atuais, contendo em torno de 21% de oxigênio (JARDIM, 2011).

O nitrogênio é um componente vital em biomoléculas essenciais como proteínas e ácidos nucleicos, pigmentos e outros metabolitos secundários (van OIJEN; LEVY, 2004). Na biosfera, o ciclo do nitrogênio ocorre entre os estados de oxidação $+5$ e -3 produtos de muitas espécies que constituem o ciclo biogeoquímico do nitrogênio. Este ciclo envolve uma série de reações de oxirredução nas quais os procariotos desempenham o papel principal (RICHARDSON; WATMOUGH, 1999). Mais de 99% do nitrogênio da superfície da Terra está disponível na forma de gás N_2 , que deve ser reduzido a amônio, a fim de ser assimilado pelos organismos para a síntese de proteínas (FENNEL et al., 2005).

Na evolução do ciclo do nitrogênio, um retorno surgiu quando a fotossíntese aeróbica levou à produção de oxigênio livre, pois, sob condições anóxicas, o amônio oceânico teria sido relativamente estável; mas, com concentrações de oxigênio aumentadas no oceano, juntamente com os processos de nitrificação-desnitrificação, teriam fornecido um caminho para a perda de nitrogênio fixado pelos oceanos (FENNEL et al., 2005). Assim, quando o oxigênio livre se tornou disponível, a amônia pode ser convertida em nitrato, que pode ser rapidamente reduzida para gás N_2 , diminuindo a quantidade de nitrogênio biodisponível no mar. A perda de nitrogênio fixado teria resultado em um estado de baixa disponibilidade de nitrogênio no oceano, e representou uma barreira para a oxidação do planeta (BJERRUM; CANFIELD, 2002).

1.1.4 O ciclo do nitrogênio

O nitrogênio é um elemento fundamental para a manutenção da vida por fazer parte da constituição de proteínas, ácidos nucleicos, peptideoglicanos, aminoácidos e outras biomoléculas (YOUNG, 1992). O nitrogênio é o gás mais abundante do planeta e, em sua forma molecular (N_2) constitui quatro quintos da atmosfera terrestre (NELSON; COX, 2002). A contribuição deste elemento para a massa total dos sistemas vivos é menor somente que as respectivas contribuições de carbono, hidrogênio e oxigênio. Mas, em geral, os compostos de nitrogênio solúveis e biologicamente úteis são escassos nos ambientes naturais e, por essa

razão, a amônia, os aminoácidos e os nucleotídeos são empregados de maneira muito econômica pela maioria dos organismos (YOUNG, 1992; NELSON; COX, 2002).

A entrada do nitrogênio nos ecossistemas está comumente associada à decomposição de matéria orgânica. No entanto, ambientes marinhos que acumulam matéria orgânica biodegradável, como os manguezais, ocorrem altas taxas de fixação biológica de nitrogênio (HOLGUIN et al., 2001). A capacidade de um microrganismo fixar nitrogênio, em associação ou não com as plantas, está ligada à presença e atividade do complexo enzimático conhecido como nitrogenase (RAYMOND et al., 2004).

Apenas alguns procariotos são capazes de fixar nitrogênio atmosférico; entre eles destacam-se as cianobactérias, que habitam os solos e as águas salgadas e doces, outras espécies de bactérias de vida livre no solo, e ainda bactérias simbiontes, que vivem nos nódulos de raízes de plantas leguminosas. Para que ocorra a conversão do nitrogênio atmosférico em formas químicas úteis para os organismos vivos, os processos metabólicos dos organismos funcionam de forma interdependente e de maneira a recuperar e reempregar o nitrogênio biologicamente disponível. Esse conjunto de processos constitui o vasto ciclo do nitrogênio (NELSON; COX, 2002).

O primeiro passo no ciclo do nitrogênio é a fixação (redução) do nitrogênio atmosférico por bactérias fixadoras de nitrogênio, que produzem amônia (NH_3^- ou amônio NH_4^+ na solução do solo). Embora a amônia possa ser empregada pela maioria dos organismos vivos, são abundantes as bactérias do solo que obtêm energia para seu metabolismo por meio da oxidação da amônia em nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-); assim praticamente toda amônia que atinge o solo é transformada em matéria orgânica, ou em nitrato. Esse processo é conhecido por nitrificação. No entanto, deve-se destacar que muitas bactérias e vegetais podem produzir e utilizar o nitrato, transformando-o pela ação de nitrato e nitrito redutases, gerando o amônio que é empregado na síntese de aminoácidos e posteriormente de proteínas. Com a morte dos organismos, a degradação microbiológica de suas proteínas devolve a amônia ao solo, no processo chamado de amonificação (NELSON; COX, 2002; GUERRERO et al., 1981).

A natureza desenvolveu múltiplos mecanismos para gerar nitrito e nitrato. É provável que seu acúmulo na Terra primitiva tenha permitido a exploração de novos nichos, ajudando a impulsionar a diversificação microbiana. Especificamente, a presença destes compostos permitiu o desenvolvimento de diversas vias metabólicas existentes, que desempenham um papel crítico no ciclo de nitrogênio atual (VLAEMINCK et al., 2009).

Durante a evolução e a proliferação da vida, a introdução dos compostos oxidados nitrito e nitrato em um ambiente relativamente reduzido pode ter gerado impactos tremendos. O nitrito e o nitrato são altamente biodisponíveis devido à sua boa solubilidade e cargas negativas (sobre uma escala de valores de pH). Esses atributos contribuíram para o potencial do nitrato em servir como uma forma de nitrogênio possível para crescimento, sendo esta capacidade generalizada entre as bactérias e arqueias, e mais tarde entre os eucariotos (RICHARDSON et al., 2001; STOLZ; BASU, 2002). Além disso, graças aos elevados números de oxidação de nitrogênio na forma de nitrito (+3) e nitrato (+5), uma série de novas espécies redox podem ter sido geradas. Este impulso dado para o desenvolvimento de várias espécies autotróficas e heterotróficas com vias dissimilatórias permitem que o nitrogênio seja oxidado para servir como receptor de elétrons na ausência de oxigênio livre (ZUMFT, 1997; STOLZ; BASU, 2002).

Um processo alternativo e descoberto recentemente tem mudado a visão global do ciclo de nitrogênio. Neste processo denominado anammox (oxidação anaeróbica de amônio), alguns organismos heterotróficos podem oxidar amônio e utilizar nitrito como aceptor de elétrons, liberando gás nitrogênio (MULDER et al., 1995; STROUS et al., 1999; THAMDRUP; DALSGAARD, 2002; KUYPERS et al., 2006). Há estimativas que o processo anammox represente entre 20 e 70% da produção total de N_2 em sedimentos com baixo conteúdo orgânico e baixa disponibilidade de oxigênio. Sob uma diferente perspectiva, a contribuição marinha do processo anammox vem sendo calculada entre 30 a 50% de todo nitrogênio existente (JETTEN et al., 2005; DALSGAARD et al., 2003). Por se tratar de um fenômeno anaeróbio, este tipo de reação é predominante em ambientes com limitadas concentrações de oxigênio, como por exemplo, profundezas marinhas, e áreas de manguezal, que possuem seus sedimentos ricos em matéria orgânica e frequentemente inundados pela maré.

1.1.5 Fixação de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) envolve a redução do nitrogênio atmosférico N_2 a amônia, etapa essencial no ciclo do nitrogênio bioquímico (ZEHR et al., 2003). Esta característica é exclusivamente procariótica, intermediada por micro-organismos diazotróficos, que transformam o nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3) de duas maneiras distintas, na associação de bactérias com as plantas, ou em bactérias de vida livre (DIALLO et al., 2004).

Esta característica exclusivamente procariótica tem sido encontrada esporadicamente, em diferentes cepas e espécies, com representantes entre Cyanobacteria, Proteobacteria, Clostridia e Actinomycetes, bem como várias arqueias (JOHNSTON; LI; LESLYE, 2005; ZHER et al., 2003). A capacidade de um micro-organismo fixar nitrogênio está associada à presença e atividade do complexo enzimático altamente conservado conhecido como nitrogenase, que apresenta como centro funcional a combinação das proteínas codificadas pelos genes chamados *nif* (RAIMOND et al., 2004; PEREIRA et al., 2011; ZHER et al., 2003). Entre eles estão os genes *nif* *nifD*, *nifH* e *nifK*, que são todos codificadores das proteínas do complexo nitrogenase (SARITA et al., 2008). O complexo nitrogenase é composto por duas unidades básicas: uma ferro-proteína, que coleta a força redutora e a energia; e uma proteína ferro-molibdênio, que coleta e reduz o substrato (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A filogenia obtida a partir de genes *nif* mostrou ser similar à obtida pela filogenia baseada no gene 16S RNAr e, por isso, o gene *nif*, passou a ser utilizado para a caracterização da diversidade de bactérias diazotróficas (ZEHR et al., 2003). Dessa forma, pode-se basear um estudo da comunidade fixadora de nitrogênio na detecção, quantificação e análise da diversidade de tal gene (TAKETANI et al., 2009; PEREIRA et al., 2011).

A fixação biológica de nitrogênio é economicamente importante para a produção de nitrogênio fixado em muitos *habitats* terrestres e aquáticos (ARP, 2000). Porém, embora a enzima nitrogenase apresente-se amplamente distribuída entre linhagens procarióticas, a maioria dos organismos não pode fixar nitrogênio, mas sim obtê-lo na forma de NH_4^+ (ou nitrogênio orgânico) a partir do ambiente, ou a partir da redução de nitrato (NO_3) para NH_4^+ , por meio da redução assimilatória do nitrato (CANFIELD et al., 2005; CANFIELD et al., 2010). Nos ambientes marinhos, a fixação de nitrogênio tem sido historicamente subestimada, porém estudos recentes tem mostrado que nestes locais as taxas da fixação de nitrogênio são similares ou até superiores (WARD, 2007; CARPENTER; CAPONE, 2008). Em manguezais, um estudo recente com o gene *nifH* detectou bactérias fixadoras de nitrogênio, que estão afiliadas a uma vasta gama de táxons, como Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Firmicutes, além de detectar este gene em bactérias anaeróbicas redutoras de sulfato (DIAS et al., 2012b), revelando a diversidade e a importância desta via em sedimentos de manguezais.

1.1.6 Nitrificação

A nitrificação é essencial para o funcionamento de ecossistemas aquáticos e terrestres. Trata-se de um processo chave do ciclo do nitrogênio onde há a oxidação de amônia para nitrato, processo que ocorre em duas etapas: inicialmente ocorre a oxidação de amônia para nitrito; e posteriormente ocorre a oxidação do nitrito para nitrato. Cada etapa deste processo é realizada por micror-organismos distintos: As bactérias oxidadoras de amônia (AOB) (TESKE et al., 1994,) ou arqueias oxidadoras de amônia (AOA) (FRANCIS et al., 2005; TREUSCH et al., 2005) e bactérias oxidadoras de nitrito (NOB), como *Nitrobacter* (PROSSER, 1989).

A oxidação da amônia é considerada o passo limitante da velocidade da nitrificação na maioria dos sistemas, pois o nitrito raramente acumula-se no meio ambiente. A nitrificação pode afetar positivamente ou negativamente a retenção do nitrogênio num sistema, dependendo das condições ambientais. O amônio é altamente volátil e, portanto, facilmente perdido em alguns sistemas. Em tais casos, a nitrificação pode facilitar a retenção de nitrogênio por oxidação de amônia em formas de nitrogênio menos voláteis (De BOER et al., 1990; De BOER et al., 1992; PROSSER, 1989).

Até muito recentemente, os organismos conhecidos como capazes de realizar a nitrificação estavam estritos a dois filos: Proteobacteria e Nitrospira, que parecem evoluído a partir de um antepassado fotossintético, divergindo antes que a capacidade de nitrificar se desenvolvesse em vários grupos (TESKE et al., 1994). Os nitrificantes conhecidos eram somente bactérias que compreendiam dois grupos funcionalmente distintos: as que oxidam amônio em nitrito (bactérias oxidadoras amônia, AOB) e aquelas que oxidam o nitrito em nitrato (bactérias oxidadoras de nitrito, NOB). Um novo grupo aeróbico de nitrificantes oxidadores de amônia foi recentemente descoberto, com a detecção de genes amônio oxidantes, aparentemente de origem arqueana, em bibliotecas metagenômicas ambientais (SCHLEPER et al., 2005), e posteriormente verificada com o cultivo enriquecido de uma linhagem de archaea (arqueia amônio oxidante, AOA), que oxida amônia em nitrito, por uma via aparentemente semelhante a conhecida em AOB (KÖNNEKE et al., 2005). Assim, atualmente parece provável que a AOA são muito mais abundantes do que AOB em sistemas marinhos (WÜCHTER et al., 2006), sendo também predominantes em solos (LEININGER et al., 2006). Estes procariotos já têm sido detectados em sedimentos de manguezais e suas contribuições para a nitrificação nestes locais têm sido cada vez melhor compreendidas. Li et al. (2011) compararam a presença de bactérias e arqueias oxidadoras de amônia em

sedimentos de manguezal em diferentes profundidades, e sugerem que a abundância de AOB é maior que AOA, especialmente na proximidade com plantas, o que pode indicar o papel mais importante da AOB sobre a nitrificação nestes locais. Os autores observaram ainda que existe uma forte correlação entre a abundância do gene *amoA* e sua relação com a amônia, salinidade, pH dos sedimentos amostrados, indicando que arqueias amônio oxidantes seriam mais suscetíveis aos fatores ambientais. Ainda assim, muitos estudos precisam ser realizados para o entendimento da presença dos micro-organismos AOB e AOA, sobretudo em ambientes de manguezal.

1.1.7 Desnitrificação

Entre as diferentes vias de redução de nitrato microbianas, a desnitrificação bacteriana é mais amplamente descrita (BERKS et al., 1995; CABELLO et al., 2004; HERMANN et al., 2000; MOURA; MOURA, 2001; PHILIPPOT, 2002; SHAPLEIGH, 2006; WALLENSTEIN et al., 2006). Esta via é vital no ciclo do nitrogênio, emitindo nitrogênio molecular da biosfera para atmosfera (ZUMFT, 1997).

A ‘característica desnitrificação’ é filogeneticamente distribuída entre bactérias, arqueias e eucariotos. No entanto, até agora, a maior parte dos organismos isolados e estudados pertencem ao filo Proteobacteria (Divisões Alfa, Beta, Gama e Epsilon) (CABELLO et al., 2004;. GREEN et al., 2010; HAYATSU et al., 2008; HEYLEN et al., 2006;. JONES et al., 2008; KERN; EINSLE; SIMON, 2009; RISGAARD-PETERSEN et al., 2006). Resumidamente, a desnitrificação é um processo respiratório (CONRADO; STUART, 1998), no qual o nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO), e óxido nitroso (N_2O), sucessivamente, são reduzidos a gás nitrogênio (N_2). Esta via é considerada a maior causa de perda de nitrogênio na agricultura, contribuindo para produção de N_2O , gás que tem potencial de efeito estufa. Esta transformação é ainda utilizada para remover o excesso de nitrogênio da água (TIEDJE, 1982).

No total, sete enzimas são responsáveis por catalisar as quatro etapas redutoras da desnitrificação (ZUMFT, 1997; PHILIPPOT, 2002); a redução do nitrato para nitrito é catalisada pelas redutases Nar ou Nap, e constituem a primeira etapa desta via, embora não seja exclusiva para desnitrificação. A etapa que define a desnitrificação é a redução do NO_2^- solúvel ao gás NO, catalisada por uma das duas nitrito redutases, NirK ou NirS. A etapa posterior é a redução do NO a N_2O pelas oxido nítrico redutases cNor ou qNor, codificadas

por duas variantes do mesmo gene, o *norB* (ZUMFT, 2005). A etapa final da desnitrificação é a conversão do N_2O para N_2 . A única enzima conhecida por catalisar esta reação é a óxido nítrico redutase Nos. Esta etapa efetivamente encerra o ciclo do nitrogênio, onde o gás N_2 pode agora ser novamente convertido a óxidos de nitrogênio solúveis por meio da ação de organismos fixadores de nitrogênio e nitrificantes (KRAFT et al., 2010). Em bactérias, a desnitrificação é um processo alternativo a respiração oxigênica, em condições de baixo teor de oxigênio ou anóxicas. Tal como em respiração aeróbica, a reação é dividida ao longo dos compartimentos periplasmático e citoplasmático, o que permite a geração de uma força motriz de prótons através da membrana bacteriana, explorada para a síntese de ATP (KRAFT et al., 2010).

O estudo da diversidade destas bactérias é ainda um tanto quanto confuso. Bactérias estreitamente relacionadas podem não compartilhar esta característica, bem como bactérias alocadas de maneira distante taxonomicamente podem possuir habilidades idênticas quanto a desnitrificação (CLAYS-JOSSERAND et al., 1999). Além disso, quanto à distribuição de genes desnitrificantes, genes estreitamente relacionados podem ser encontrados em organismos distantemente relacionados. Isto sugere que os genes para desnitrificação têm sido perdidos e herdados durante a evolução (PHILIPPOT, 2002). Estudos comparando filogenias dos genes *nar*, *nir*, *nor*, e *nos* de bactérias isoladas evidenciaram que estes genes funcionais são mais ou menos incongruentes quando comparados com o 16S RNAr (HEYLEN et al., 2006; DANDIE et al., 2007). A transferência horizontal de genes tem sido proposta como a maior causa desta baixa correlação entre a filogenia do 16S RNAr com estes genes funcionais (KRAFT et al., 2010). Este fato levou a crítica do uso de genes desnitrificantes como marcadores moleculares, ao invés do 16S RNAr, para análises da estrutura da comunidade e abundância de organismos desnitrificantes no meio ambiente. Também tem sido proposto que *nir* e *nor* seriam geneticamente ligados em certos grupos (ZUMFT 1997; PHILIPPOT, 2002; HEYLEN et al., 2006). No entanto, várias destas propostas são inconclusivas e as reivindicações permanecem, em grande parte, especulativas (HUELSENBECK; HILLIS 1993).

Bactérias desnitrificantes têm sido detectadas em uma gama de ambientes, sendo a maioria dos estudos focados em solos agriculturáveis, como por exemplo, em solos aráveis na Alemanha (KLEINEIDAM et al., 2010), ou ainda em solos utilizados para cultivo de arroz e soja no Japão (TAGO et al., 2011). Já em sedimentos de manguezais, alguns trabalhos tem avaliado as taxas geradas pela desnitrificação, como Fernandes et al. (2012), que compararam

os processos de desnitrificação e anammox em sedimentos de manguezais coletados em Goa, na Índia; ou ainda em sedimentos de manguezal localizado no México, onde os autores Rivera-Monroy e Twilley (1996) avaliaram a desnitrificação utilizando nitrogênio marcado ^{15}N . No entanto, pouca informação está disponível sobre a diversidade destas bactérias em sedimentos de manguezais; particularmente no Brasil, que possui uma importante extensão de áreas de manguê.

1.1.8 Bactérias oxidadoras anaeróbicas de amônio - anammox

A via anammox (oxidação anaeróbica de amônio) consiste na oxidação de amônia a dinitrogênio com a utilização de nitrito comoceptor final de elétrons (MULDER et al., 1995; STROUS et al., 1999; OP DEN CAMP et al., 2007). Este processo é mediado por bactérias da ordem *Planctomycetales* (STROUS et al., 1999), sendo atualmente conhecidos cinco gêneros, todos candidatos e não cultivados (*Candidatus Scalindua*, *Brocadia*, *Kuenenia*, *Anammoxoglobus* e *Jettenia*) (SCHMID et al., 2005; HUMBERT et al., 2009; JETTEN et al., 2010).

No entanto, a diversidade destas bactérias está ainda sendo revelada, o que torna a lista de grupos relacionado a anammox crescente e dinâmica em cada nova publicação nesta área. Estas bactérias eram desconhecidas até a década de 1990, e foram consideradas em 1997 como “litotróficas perdidas na natureza”. Segundo o autor, essa rota metabólica era reconhecida por ser termodinamicamente possível, mas os microrganismos quimioautotróficos nunca haviam sido encontrados (BRODA, 1997). Atualmente, bactérias que promovem o processo anammox têm sido detectadas também em água doce e em vários ecossistemas marinhos, como em zonas subóxicas do Mar Negro (KUYPERS et al., 2003; SCHMID et al., 2003). Estima-se que cerca de 50% da produção de N_2 marinho seja formado a partir do processo anammox (STROUS et al., 2004).

Essas bactérias, assim como todo o Filo *Planctomycetes*, apresentam características incomuns, como a presença de um compartimento membranóide denominado ‘anammoxossoma’. Esta estrutura parece não conter qualquer ribossomo ou cromossomo, mas ser composta de citoplasma com inclusões densas de elétrons (diâmetro 20 nm), com preenchimento e função ainda desconhecidos. As membranas internas destas bactérias são compostas principalmente de lipídeos também diferenciados, chamados de laderanos, o que parece ser mais uma característica exclusiva das bactérias que fazem tal processo

(SINNINGHE-DAMSTÉ et al., 2002). Estas bactérias apresentam um crescimento lento e/ou com interação com outros microrganismos (SLIEKERS et al., 2003). Os oxidantes anaeróbios de amônio são sempre dependentes de uma fonte próxima de nitrito. Em biorreatores com oxigênio limitado (SLIEKERS et al., 2003), muitas vezes grupos de bactérias anammox são encontradas perto de aglomerados aeróbicos oxidantes (bactérias amônio oxidantes) ou associadas a arqueias amônio oxidantes, que convertem o amônio em nitrito e consomem o oxigênio inibitório para estas bactérias anammox (MULDER et al., 1995; KUYPERS et al., 2003; KUENEN, 2008).

Assim, o *habitat* de bactérias anammox exige a simultânea presença de amônio e nitrito, que pode ser encontrado perto ou nas interfaces aeróbia e anaeróbia de sedimentos e corpos d'água. Portanto, assume-se a existência de dois caminhos possíveis para a conversão de nitrato em N_2 por bactérias anammox. O N_2 poderia ser produzido pela desnitrificação clássica via nitrito, óxido nítrico e óxido nitroso; ou pela redução dissimnatória de nitrato, onde o nitrato seria primeiramente reduzido a nitrito e, posteriormente, à amônia através da nitrito redutase, como descrito para muitas bactérias entéricas (COLE, 1996; SIMON, 2002). Neste contexto, o amônio poderia então ser combinado com o nitrito para formar N_2 através de uma via usual anammox (KUENEN, 2008).

O estudo do processo anammox alcançou um marco importante em 2006, quando o genoma de uma bactéria capaz de realizar o processo anammox (*Candidatus* K. stuttgartiensis) foi publicado (STROUS et al., 2006), mesmo com a inexistência de uma cultura pura, sendo este um dos únicos casos onde há publicação de um genoma bacteriano sem que se tenha obtido a culturabilidade do organismo. Estas bactérias vinham sendo descritas como sendo especialistas em realizar apenas a oxidação anaeróbica do amônio. No entanto, com o desenrolar do genoma de *Candidatus* K. stuttgartiensis, combinado com os últimos estudos experimentais (como por exemplo KARTAL et al., 2007), tem sido demonstrado que bactérias promotoras de anammox, além de produzir N_2 por meio da oxidação da amônia e utilização de nitrito como receptor final de elétrons, podem também apresentar um metabolismo muito parecido com o processo de desnitrificação. Estas bactérias são também capazes de converter nitrato em amônia via nitrito, utilizando o nitrato para produção de N_2 . Portanto, sob condições limitadas de amônio, tais bactérias seriam capazes de produzir o amônio que necessitam. Consequentemente, a oxidação dos ácidos orgânicos acoplada à redução de nitrato por estes organismos poderia ser uma valiosa estratégia de

sobrevivência, de maneira independente de outros microrganismos para a produção de nitrito e amônio (JETTEN et al., 2005).

Há ainda muitos questionamentos sobre o funcionamento do processo anammox, como detectar este processo e estas bactérias, e em quais ecossistemas estão presentes, entre outros. Contudo, acredita-se que a biodiversidade das bactérias promotoras de anammox pode aumentar à medida que se realizam estudos voltados a estas bactérias em novos *habitats* (JETTEN et al., 2005). Em manguezais, alguns trabalhos tem detectado a presença de bactérias anammox, bem com avaliado as taxas envolvidas neste processo, como por exemplo Meyer, Risgaard-Petersen e Allen (2005) e Rivera-Monroy et al. (1996), que compararam os processos anammox e desnitrificação em sedimentos de manguezais, evidenciando a importância desta via para estes locais.

1.1.9 Redução Dissimilatória de Nitrato a Amônia – DNRA

Mais de trinta anos atrás Cole e Brown (1980) concluíram que a significância da redução dissimilatória de nitrato a amônia nos solos anaeróbicos era desconhecida. Recentemente, com a utilização de técnicas de com nitrogênio marcado (^{15}N) e a quantificação das taxas brutas de DNRA, a hipótese de que “DNRA pode ser muito mais importante do que foi estimado” (STEVENS et al., 1998) parece ser confirmada. Alguns estudos tem concluído que DNRA é um importante, se não um consumidor dominante de nitrato em muitos ecossistemas (RÜTTING et al., 2011).

Assume-se que a redução dissimilatória do nitrato a amônia (DNRA) ocorre quando o carbono orgânico de um determinado ambiente é limitante (COLE; BROWN, 1980). Para que ocorra DNRA, o nitrito é reduzido a amônio e oito elétrons são transferidos. Primeiramente ocorre a redução do nitrato para nitrito (complexo enzimático NapAB). No entanto a nitrito redutase, NarGHI, pode também estar presente no mesmo organismo (RICHARDSON et al., 2001;. SIMON, 2002). A redução total do nitrito a amônia é catalisada pelo complexo enzimático NrfA (nitrito redutase pentaheme citocromo c), sem que haja a liberação de qualquer intermediário (EINSLE et al., 2000; EINSLE et al., 2002). No entanto, assume-se como intermediários prováveis o óxido nítrico (NO), hidroxilamina (NH_2OH), ou ainda o óxido nitroso (N_2O) sejam gerados como subproduto da DNRA. Assim, nem todo N_2O liberado estaria sendo produzido pela desnitrificação, como geralmente se assume (CRUZ-GARCIA et al., 2007; VERMEIREN et al., 2009).

Durante muito tempo foi aceito que a maior parte do nitrato na natureza era essencialmente respirado via desnitrificação, não havendo relatos robustos sobre a ocorrência da DNRA. Estudos recentes com a utilização de nitrogênio marcado indicaram que DNRA tem um impacto importante no ciclo do nitrogênio. Por exemplo, Silver et al. (2001) contabilizaram que até 75% da quantidade de nitrato consumido em solos úmidos de florestas tropicais pelo processo de DNRA. Incubações com ^{15}N -nitrato mostraram que a DNRA ocorre em condições oxidas e não é inibido pelo oxigênio (MORLEY; BAGGS, 2010). Contudo, o papel dos organismos realizando DNRA em ambientes terrestres e aquáticos, o nicho ecológico e as condições que favorecem esta via de respiração de nitrato ainda estão a serem estudados. Sabe-se, porém, que a relação entre os doadores de elétron disponíveis, o tipo de doador de elétrons e o potencial redox no ambiente são fatores que podem selecionar o processo de redução do nitrato predominante (AKUNNA et al., 1993; KASPAR, 1983; TIEDJE et al., 1982).

A capacidade de realizar DNRA é filogeneticamente generalizada. Verificou-se que o gene funcional *nrfA* ocorre em diversos grupos de bactérias: Gama, Delta, Epsilon Proteobacteria (SMITH et al., 2007) e em membros de Bacteroidetes (MOHAN et al., 2004). Este gene foi purificado e caracterizado a partir de muitos organismos diferentes, como por exemplo *Escherichia coli* (KAJIE; ANRAKU, 1986; LIU; PECK, 1981), *Desulfovibrio desulfuricans* (LIU; PECK, 1981), *Wolinella succinogenes* (BLACKMORE et al., 1986; LIU et al., 1983) e *Vibrio fischeri* (LIU et al., 1988). Comparando-se com outras vias para redução de nitrato, como desnitrificação e anammox, ainda poucos estudos abordaram a distribuição e diversidade de genes funcionais para DNRA (KRAFT et al., 2010). A aplicação de *nrfA* como um gene marcador é difícil, principalmente porque existem apenas algumas sequências disponíveis nos bancos de dados, que provêm de coleções de culturas, sendo na maioria oriundas de agentes patogênicos (provavelmente não relevantes na natureza). Desta forma, o isolamento de espécies ambientalmente importantes para a via DNRA é um passo importante para a obtenção de mais sequências do gene *nrfA* (MOHAN et al., 2004; KRAFT et al., 2010).

Se a desnitrificação e o processo anammox fecham o ciclo do nitrogênio reciclando nitrato à dinitrogênio, a redução dissimilatória de nitrato fecha o ciclo realizando a reciclagem de nitrato à amônia. Contrastando com a desnitrificação e o processo anammox, este processo não remove o nitrogênio do *habitat*, mas perpetua sua disponibilidade para os produtores primários (OTTE et al., 1999). Pouco se sabe sobre a presença de bactérias DNRA em

sedimentos de manguezais, porém, em um trabalho publicado por Fernandes et al. (2012) os autores recomendam que o processo DNRA seja fortemente considerado em estudos futuros envolvendo ciclo de nitrogênio e ecossistema manguezal.

Referências

AKUNNA, J.C.; BIZEAU, C.; MOLETTA, R. Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon-sources - glucose, glycerol, acetic-acid, lactic-acid and methanol. **Water Research**, Oxford, v. 27, p. 1303–1312, 1993.

ANDREOTE, F.D.; JIMENEZ, D.J.; CHAVES, D.; DIAS, A.C.F.; LUVIZOTTO, D.M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELA, C.C.; LOPEZ, M.V.; BAENA, S.; TAKETANI, R.G.; SOARES, I.M. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **Plos One**, Oxford, v.7, p. e38600, 2012.

ARP, D.J. The nitrogen cycle. In TRIPLETT, E.W. (Ed.). **Prokaryotic nitrogen fixation**. Wymondham: Horizon Scientific Press, 2000. p. 1–14.

BERKS, B.C.; FERGUSON, S.J.; MOIR, J.W.B.; RICHARDSON, D.J. Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics**, Dresden, v. 1232, p. 97–173, 1995.

BJERRUM, C.J.; CANFIELD, D.E. Ocean productivity before about 1.9 Gyr ago limited by phosphorus adsorption onto iron oxides. **Nature** London, v. 417, p. 159–162, 2002

BLACKMORE, R.; ROBERTON, A.M.; BRITTAIN, T.; The purification and some equilibrium properties of the nitrite reductase of the bacterium *Wollinella uccinogenes*. **Biochemical Journal**, Portland, v. 233, p.547–552, 1986.

BRACK, A. **The molecular origins of life**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 418p.

BRODA, E. Two kinds of lithotrophs missing in nature. **Zeitschrift fur Allgemeine Mikrobiologie**, Berlin, v. 17, p. 491-493, 1977.

CABELLO, P.; ROLDAN, M.D.; MORENO-VIVIAN, C. Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. **Microbiology**, Reading, v. 150, p. 3527–3546, 2004.

CANFIELD, D.; GLAZER, A. N.; FALKOWSKI, P. D. The evolution and future of earth's nitrogen cycle. **Science**, Washington, v. 330, p. 192–196, 2010.

CANFIELD, D.E.; KRISTENSEN, E.; THAMDRUP, B. **Aquatic geomicrobiology**. New York: Academic Press, 2005. 643p.

CARPENTER, E.J.; CAPONE, D.G. Nitrogen fixation in the marine environment. In CARPENTER, E.J.; CAPONE, D.G.; RUETER, J. **Nitrogen in the marine environment**. Oxford: Elsevier, 2008. p. 141–181.

COLE, J. Nitrate reduction to ammonia by enteric bacteria: redundancy, or a strategy for survival during oxygen starvation? **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 136, p. 1–11, 1996.

COLE, J.A.; BROWN, C.M. Nitrite reduction to ammonia by fermentative bacteria – short circuit in the biological nitrogen cycle. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 7, p. 65–72, 1980.

CONRADO, M.V.; STUART, J.F. Definition and distinction between assimilatory, dissimilatory and respiratory pathways. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 29, p. 664–666, 1998.

CRUZ-GARCIA, C.; MURRAY, A.E.; KLAPPENBACH, J.A.; STEWART, V.; TIEDJE, J.M. Respiratory nitrate ammonification by *Shewanella oneidensis* MR-1. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 189, p. 656–662, 2007.

CUNHA-LIGNON, M.; MENGHINI, R.P.; SANTOS, L.C.M.; NIEMEYER-DINÓLA, C.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Estudos de caso nos manguezais do Estado de São Paulo (Brasil): aplicação de ferramentas com diferentes escalas espaço-temporais. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, Faro, v. 9, n. 1, p. 79-91, 2009.

CURY, J. C. **Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado por petróleo**. 2002. 84p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

DALSGAARD, T.; CANFIELD, D.E.; PETERSEN, J.; THAMDRUP, B.; GONZÁLEZ, J.A. N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. **Nature**, London, v. 422, p. 606-608, 2003.

DANDIE, C.E.; BURTON, D.L.; ZEBARTH, B.J.; TREVORS, J.T.; GOYER, C. Analysis of denitrification genes and comparison of nosZ, cnorB and 16S rDNA from culturable denitrifying bacteria in potato cropping systems. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 30, p. 28–138, 2007.

DeBOER, W.; KLEIN-GUNNEWIEK, P.J.A.; TROELSTRA, S.R. Nitrification in Dutch heathland soils II. Characteristics of nitrate production. **Plant and Soil**, London, v. 127, p. 193–200, 1990.

De BOER, W.; TIETEMA A.; KLEIN-GUNNEWIEK, P.J.A.; LAANBROEK, H.J. The chemolithotrophic ammonium-oxidizing community in a nitrogen-saturated acid forest soil in relation to pH dependent nitrifying activity. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, p. 229–234, 1992.

DIALLO, M.D.; WILLEMS, A.; VLOEMANS, N.; COUSIN, S.; VANDEKERCKHOVE, T. T.; DE LAJUDIE, P.; NEYRA, M.; VYVERMAN, W.; GILLIS, M.; VAN DER GUCHT, K. Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N₂-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *Raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 6, p. 400–415, 2004.

DIAS, A.C.F.; 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**, Wageningen, v. 9, n. 8, p. 541-551, 2010.

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

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**, Oxford, v. 25, p. 1305–1311, 2009.

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

DUKE, N. C.; MEYNECKE, J. O.; DITTMANN, S. A world without mangroves? **Science**, Washington, v. 317, p. 41–42, 2007.

EINSLE, O.; MESSERSCHMIDT, A.; HUBER, R.; KRONECK, P.M.H.; NEESE, F. Mechanism of the six-electron reduction of nitrite to ammonia by cytochrome c nitrite reductase. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 124, p. 11737–11745, 2002.

EINSLE, O.; STACH, P.; MESSERSCHMIDT, A.; SIMON, J.; KROGER, A.; HUBER, R.; KRONECK, P.M.H. Cytochrome c nitrite reductase from *Wolinella succinogenes* – structure at 1.6 angstrom resolution, inhibitor binding, and heme-packing motifs. **Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 275, p. 39608–39616, 2000.

FASANELLA, C.C.; DIAS, A.C.F.; RIGONATO, J.; FIORE, M.F.; SOARES, 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**, Dordrecht, v. 223, p. 4233-4243, 2012.

FENCHEL, T.; FINLAY, B.J. **Ecology and evolution in anoxic worlds**. Oxford: University Press, 1995. 276 p.

FERNANDES, S.O.; BONIN, P.C.; MICHOTEY, V.D.; GARCIA, N.; LOKABHARATHI, P.A. Nitrogen-limited mangrove ecosystems conserve N through dissimilatory nitrate reduction to ammonium. **Scientific Reports**, London, v. 2, p. 1-5, 2012.

FRANCIS, C.A.; ROBERTS, K.J.J.; BEMAN, M.; SANTORO, A.E.; OAKLEY, B.B. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 102, p. 14683–14688, 2005.

GIRI, C.; ZHU, Z.; TIESZEN, L.L.; SINGH, A.; GILLETTE, S.; KELMELIS, J.A. Mangrove forest distributions and dynamics (1975–2005) of the tsunami-affected region of Asia. **Journal of Biogeography**, London, v. 35, p. 519–528, 2008.

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

GUERRERO, M.G.; VEGA, J.M.; LOSADA, M. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. **Annual Review of Plant Physiology**, Genamics JournalSeek, v. 32, p. 169–204, 1981.

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

HERMANN, B.; GÜNTHER, J.; MICHAEL, S.; BESS, B.W.; KARL-PAUL, W. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, p. 673–690, 2000.

HEYLEN, K.; VANPARYS, B.; WITTEBOLLE, L.; VERSTRAETE, W.; BOON, N.; DE VOS, P. Cultivation of denitrifying bacteria: optimization of isolation conditions and diversity study. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 72, p. 2637–2643, 2006.

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

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

HUELSENBECK, J.P.; HILLIS, D.M. Success of phylogenetic methods in the 4-taxon case. **Systematic Biology**, Oxford, v. 42, p. 247–264, 1993.

HUMBERT, S.; TARNAWSKI, S.; FROMIN, N.; MALLET, M. P.; ARAGNO, M.; ZOPFI, J. Molecular detection of *anammox* bacteria in terrestrial ecosystems: distribution and diversity. **The ISME Journal**, New York, v. 4, p. 450–454, 2009.

JARDIM, W.F.; CHAGAS, A.P. A Química ambiental e a hipótese Gaia: uma nova visão sobre a vida na Terra? **Química Nova**, São Paulo, v. 15, p. 73–76, 1992.

JENNERJAHN, T.C.; ITTEKOT, V. Relevance of mangroves for the production and deposition of organic matter along tropical continental margins. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 89, p. 23–30, 2002.

JETTEN, M.S.M.; OP DEN CAMP, H.J.M.; KUENEN, J.G.; STROUS, M. Description of the order Brocadiales. In KRIEG, N.R.; LUDWIG, W.; WHITMAN, W.B.; HEDLUND, B.P.;

PASTER, B.J.; STALEY, J.T.; WARD, N.; BROWN, D. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Heidelberg: Springer, 2010. v. 4, p. 506–603.

JETTEN, M.; SCHMID, M.; VAN DE PAS-SCHNOONEN, K.; SINNINGHE DAMSTÉ, J. STROUS, M. *Anammox* organisms: enrichment, cultivation, and environmental analysis. **Methods in Enzymology**, Berkely, v. 397, p. 34-57, 2005.

JONES, C.M.; STRES, B.; ROSENQUIST, M.; HALLIN, S. Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 25, p. 1955–1966, 2008.

JOHNSTON, A.W.B.; LI YOUGUO; LESLEY, O. Metagenomic marine nitrogen fixation--feast or famine? **Trends in Microbiology**, Amsterdam, v. 13, n. 9, p. 416–420, 2005.

KAJIE, S.I.; ANRAKU, Y. Purification of a hexaheme cytochrome-c552 from *Escherichia coli* K12 and its properties as a nitrite reductase. **European Journal of Biochemistry**, Barcelona, v. 154, p. 457–463, 1986.

KARTAL, B.; RATTRAY, J.; VAN NIFTRIK, L.; VAN DE VOSSENBERG, J.L.C.M.; SCHMID, M.C.; WEBB, R.I.; SCHOUTEN, S.; FUERST, J.A.; DAMSTÉ, J.S.; JETTEN, M.S.; Strous, M. *Candidatus Anammoxoglobus propionicus*: a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 30, p. 39–4, 2007.

KASPAR, H.F. Denitrification, nitrate reduction to ammonium, and inorganic nitrogen pools in intertidal sediments. **Marine Biology**, Berlin, v. 74, p. 133–139, 1983.

KERN, M.; EINSLE, O.; SIMON, J. Variants of the tetrahaem cytochrome c quinol dehydrogenase NrfH characterize the menaquinol-binding site, the haem c-binding motifs and the transmembrane segment. **Biochemical Journal**, Portland, v. 414, p. 73–79, 2008.

KLEINEIDAM, K.; SHARMA, S.; KOTZERKE, A.; HEUER, H.; THIELE-BRUHN, S.; SMALLA, K.; WILKE, B.M.; SCHLOTTER, M. Effect of sulfadiazine on abundance and diversity of denitrifying bacteria by determining *nirK* and *nirS* genes in two arable soils. **Microbial Ecology**, New York, v. 60, p. 703–707, 2010.

KRAFT, B.; STROUS, M.; TEGETMEYER, H.E. Microbial nitrate respiration – genes, enzymes and environmental distribution. **Journal of Biotechnology**, London, v. 155, n.1, p. 104-117. .1-14, 2010.

KUENEN, J.G. *Anammox* bacteria: from discovery to application. **Nature Reviews in Microbiology**, London, v. 6, p. 320-326, 2008.

KUYPERS, M.M.M.; LAVIK, G.; THAMDRUP, B. Anaerobic ammonium oxidation in the marine environment. In: NERETIN, L.N. (Ed.). **Past and present marine water column anoxia**. Berlin: Springer, 2006. p. 311-366.

KUYPERS, M.M.M.; SLIEKERS, A.O.; LAVIK, G.; SCHMID, M.; JORGENSEN, B.B.; KUENEN, J.G.; SINNINGHE DAMSTÉ, J.S.; STROUS, M.; JETTEN, M.S.M. Anaerobic

ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. **Nature**, London, v. 422, p. 608–611, 2003.

LEININGER, S.; URICH, T.; SCHLOTTER, M.; SCHWARK, L.; QI, J.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I.; SCHUSTER, S.C.; SCHLEPER, C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. **Nature**, London, v. 442, p. 806–809, 2006.

LI, M.; CAO, H.; HONG, Y.; GU, J.D. Spatial distribution and abundances of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in mangrove sediments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 89, p. 1243–1254, 2011.

LEWIS, W.M. Jr. The thermal regime of Lake Lanao (Philippines) and its theoretical implications for tropical lakes. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 18, p. 200–217, 1973.

LIU, M.C.; PECK, H.D. Jr. The isolation of a hexaheme cytochrome from *Desulfovibrio desulfuricans* and its identification as a new type of nitrite reductase. **The Journal of Biology Chemistry**, Maryland, v. 256, p. 13159–13164, 1981.

LIU, M.C.; BAKEL, B.W.; LIU, M.Y.; DAO, T.N. Purification of *Vibrio fischeri* nitrite reductase and its characterization as a hexaheme c-type cytochrome. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Maryland, v. 262, p. 259–265, 1988.

LIU, M.C.; LIU, M.Y.; PAYNE, W.J.; PECK, H.D.; LEGALL, J. Wollinella succinogenes nitrite reductase – purification and properties. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 19, p. 201–206, 1983.

LIU, M.C.; PECK, H.D.; ABOU-JAOUDE, A.; CHIPPAUX, M.; LEGALL, J.A reappraisal of the role of the low potential c-type cytochrome (Cytochrome c552) in NADH-dependent nitrite reduction and its relationship with a co-purified NADH oxidase in *Escherichia coli* K-12. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 10, p. 333–337, 1981.

MANINI, E.; FIORDELMONDO; GAMBI, C.; PUSCEDDU, A.; DANOVARO, R. Benthic microbial loop functioning in coastal lagoons: a comparative approach. **Oceanologica Acta**, Genamics JournalSeek, v. 26, p. 27–38, 2003.

MARTIN; W.R.; SAYLES, F.L. The recycling of biogenic material at the seafloor. In MACKENZIE, F.T. (Ed.). **Treatise on geochemistry**. Oxford: Elsevier Science, 2007. v. 7: Sediments, diagenesis, and sedimentary rocks, p. 37–65.

MEYER, R.L.; RISGAARD-PETERSEN, N.; ALLEN, D.E. Correlation between anammox activity and microscale distribution of nitrite in a subtropical mangrove sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 6142–6149, 2005.

MILLER, S.L. Production of some organic compounds under possible primitive Earth conditions. **Journal of the American Chemical Society**, New York, v. 77, p. 2351–2361, 1955.

MOHAN, S.B.; SCHMID, M.; JETTEN, M.; COLE, J. Detection and widespread distribution of the *nrfA* gene encoding nitrite reduction to ammonia, a short circuit in the biological

nitrogen cycle that competes with denitrification. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 49, p. 433–443, 2004.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MORLEY, N.; BAGGS, E.M. Carbon and oxygen controls on N₂O and N₂ production during nitrate reduction. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 1864–1871, 2010.

MOURA, I.; MOURA, J.J.G. Structural aspects of denitrifying enzymes. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 5, p. 168–175, 2001.

MULDER, A.; VAN DE GRAAF, A.A.; ROBERTSON, L.A.; KUENEN, J.G. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. **FEMS Microbiology and Ecology**, Amsterdam, v. 16, p. 177–184, 1995.

NEALSON, K.H.; BERELSON, W. Layered microbial communities and the search for life in the universe. **Geomicrobiology Journal**, London, v. 20, p. 451–462, 2003.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. Tradução: A.A. Simões e W.R.N. Lori. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 639–640.

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

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

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 Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 77, p. 57–68, 2011.

PHILIPPOT, L. Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Structure and Expression**, Oxford, v. 1577, p. 355–376, 2002.

PROKOPENKO, M.G.; SIGMAN, D.M.; BERELSON, W.M.; HAMMOND, D.E.; BARNETT, B.; CHONG, L.; TOWNSEND-SMALL, A. Denitrification in anoxic sediments supported by biological nitrate transport. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, Oxford, v. 75, p. 7180–7199, 2011.

PROSSER, J.I. Autotrophic nitrification in bacteria. **Advances in Microbial Physiology**, Oxford, v. 30, p. 125–181, 1989.

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

RICHARDSON, D.J.; WATMOUGH, N.J. Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, Oxford, v. 3, p. 207–219, 1999.

RICHARDSON, D.J.; BERKS, B.C.; RUSSELL, D.A.; SPIRO, S.; AND TAYLOR, C.J. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Birkhäuser, v. 58, p. 165–178, 2001.

RISGAARD-PETERSEN, N.; LANGEZAAL, A.M.; INGVARSDSEN, S.; SCHMID, M.C.; JETTEN, M.S.M.; OP DEN CAMP, H.J.M.; DERKSEN, J.W.M.; PINA-OCHOA, E.; ERIKSSON, S.P.; PETER NIELSEN, L.; PETER REVSBECH, N.; CEDHAGEN, T.; VAN DER ZWAAN, G.J. Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer. **Nature**, London, v. 443, p. 93–96, 2006.

RIVERA-MONROY; V.H.; TWILLEY, R.R. The relative role of denitrification and immobilization in the fate of inorganic nitrogen in mangrove sediments (Terminos Lagoon, Mexico). **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 41, n. 2, p. 284–296, 1996.

RÜTTING, T.; BOECKX, P.; MÜLLER, C.; KLEMEDTSSON, L. Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle. **Biogeosciences**, London, v. 8, p. 1779–1791, 2011.

SALGADO-LABOURIAU, M.L. **História ecológica da Terra**. São Paulo: Edgard Blücher, 1994. 308 p.

SARITA, S.; PRIEFER, U. B.; PRELL, J.; SHARMA, P. K. Diversity of *nifH* gene amplified from rhizosphere soil DNA. **Current Science**, Bangalore, v. 94, p. 109–114, 2008.

SCHLEPER, C.; JURGENS, G.; JONUSCHEIT, M. Genomic studies of uncultivated archaea. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 479–488, 2005.

SCHMID, M.C.; WALSH, K.; WEBB R.I.; RIJSTRA, W.I.C.; VAN DE PASSCHOONEN, K.T.; VERBRUGGEN, M.J.; HILL, T.; MOFFERT, B.; FUERST, J.A.; SCHOUTEN, S.; SINNINGHE DAMSTÉ, J.S.; HARRIS, J.; SHAW, P.; JETTEN, M.S.M.; STROUS, M. *Candidatus* “*Scalindua brodae*”, sp. Nov.; *Candidatus* “*Scalindua wagneri*”, sp. Nov.; two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 26, p. 529–538, 2003.

SCHMID, M.C.; MAAS, B.; DAPENA, A.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.; VAN DE VOSSENBERG, J.; KARTAL, B.; VAN NIFTRIK, L.; SCHMIDT, I.; CIRPUS, I.; KUENEN, J.G.; WAGNER, M.; SINNINGHE DAMSTÉ, J.S.; KUYPERS, M.; REVSBECH, N.P.; MENDEZ, R.; JETTEN, M.S.M.; STROUS, M. Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (*anammox*) bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1677–1684, 2005.

SCHOPF, J.W. **Earth’s earliest biosphere: its origin and evolution**. New Jersey: Princeton University Press, 1983. 544 p.

SHAPLEIGH, J. The denitrifying Prokaryotes. In DWORKIN, M. (Ed.), **The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria**. New York: Springer-Verlag, 2006. p. 769–792. (Ecophysiology and Biochemistry, 2).

SILVER, W.L.; HERMAN, D.J.; FIRESTONE, M.K. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium in upland tropical forest soils. **Ecology**, New York, v. 82, p. 2410–2416, 2001.
SIMON, J. Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 26, p. 285–309, 2002.

SINNINGHE-DAMSTÉ, J.S.; STROUS, M.; RIJPSMA, W.I.C.; HOPMANS, E.C.; GEENEVASEN, J.A.; VAN DUIN, A.C.T.; VAN NIFTRIK, L.A.; JETTEN, M.S.M. Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. **Nature**, London, v. 419, p. 708–712, 2002.

SLIEKERS, A.O.; THIRD, K.; ABMA, W.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. CANON and ANAMMOX in a gas-lift reactor. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 218, p. 339–344, 2003.

SMITH, C.J.; NEDWELL, D.B.; DONG, L.F.; OSBORN, A.M. Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 73, p. 3612–3622, 2007.

STOLZ, J.F.; BASU, P. Evolution of nitrate reductase: molecular and structural variations on a common function. **Chemical Biochemistry**, London, v. 3, p.198–206, 2002.

STROUS, M.; JETTEN, M.S.M. Anaerobic oxidation of methane and ammonium. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 58, p. 99–117, 2004.

STROUS, M.; FUERST, J.A.; KRAMER, E.H.;M.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.T.; WEBB, R.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. Missing lithotroph identified as new planctomycete. **Nature**, London, v. 40, p. 446–449, 1999.

TAGO, K.; ISHII, S.; NISHIZAWA, T.; OTSUKA, S.; SENOO, K. Phynogenetic and functional diversity of denitrifying bacteria isolated from various rice paddy and rice soybean rotation fields. **Microbes and Environments**, Tagajo, v. 26, p. 30–35, 2011.

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 Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology**, Dordrecht, v. 96, p. 343–354, 2009.

TESKE, A.; ALM, E.; REGAN, J.M.; TOZE, S.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D.A. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 176, n. 6, p. 623–630, 1994.

THAMDRUP, B., DALSGAARD, T. Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1312–1318, 2002.

TREUSCH, H.; LEININGER, S.; KLETZIN, A.; SCHUSTER, S.C.; KLENK, H.P.; SCHLEPER, C. Novel genes for nitrite reductase and Amorelated proteins indicate a role of

uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 7, p. 1985–1995, 2005.

TIEDJE, J.M.; SEXSTONE, A.J.; MYROLD, D.D.; ROBINSON, J.A. Denitrification – ecological niches, competition and survival. **Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology**, Dordrecht, v. 48, p. 569–583, 1982.

van OIJEN, M.; LEVY, P.E. Nitrogen metabolism and plant adaptation to the environment - the scope for process-based modelling. In AMÂNCIO, S.; STULEN, I.D.H.J. (Ed.). **Nitrogen acquisition and assimilation in higher plants**. Amsterdam: Kluwer Academic, 2004. p. 133-147.

VERMEIREN, J.; VAN DE WIELE, T.; VERSTRAETE, W.; BOECKX, P.; BOON, N. Nitric oxide production by the human intestinal microbiota by dissimilatory nitrate reduction to ammonium. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, New York, e284718, p.1-10, 2009.

VLAEMINCK, S.E.; TERADA, A.; SMETES, B.F.; van der LINDEN, D.; BOON, N.; VERSTRAETE, W.; CARBALLA, M. Nitrogen removal from digested black water by one-stage partial nitrification and anammox. *Environmental Science Technology*, v.43, n. 3, p. 5035-5041, 2009.

WALLENSTEIN, M.D.; MYROLD, D.D.; FIRESTONE, M.; VOYTEK, M. Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. **Ecological Applications**, Nova York, v. 16, p. 2143–2152, 2006.

WARD, B.B. Nitrogen cycling in aquatic environments. In: HURST, C.J.; CRAWFORD, R.L.; GARLAND, J.L.; LIPSON, D.A.; MILLS, A.L.; STETZENBACH, L.D. **Manual of environmental microbiology**. New York: American Society for Microbiology, 2007. p. 511-522.

WESLAWSKI J.M.; SNELGROVE, P.V.R.; LEVIN, L.A.; AUSTEN, M.C.; KNEIB, R.T.; ILIFFE, T.M.; GAREY, J.R.; HAWKINS, S.J.; WHITLATCH, R.B. Part I. Ecosystem processes and the sustainable delivery of goods and services. COVICH, A.P. 4. Marine sedimentary biota as providers of ecosystem goods and services. In: WALL, D.H. (Ed.). **Sustaining biodiversity and ecosystem services in soils and sediments**. Washington: Island Press, 1994. p.73-98.

YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen fixing bacteria. In: STACEY, G.; BURRIS, R.; EVANS, H. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p. 43–86.

ZEHR, J.P.; JENKINS, B.D.; SHORT, S.M.; STEWARD, G.F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 5, n. 7, p. 539–554, 2003.

ZHOU, H.W.; LUANC, T.G.; ZOUB, F.; TAM, N.F.Y. Different bacterial groups for biodegradation of three- and four-ring PAHs isolated from a Hong Kong mangrove sediment. **Journal of Hazard Materials**, Amsterdam, v. 152, p. 1179–1185, 2008.

ZUMFT, W.G. Cell biology and molecular basis of denitrification. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 61, p. 533-616, 1997.

_____. Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme–copper oxidase type. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Oxford, v. 99, p. 194–215, 2005.

2 TRANSFORMAÇÕES DO NITROGÊNIO EM SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS

Resumo

O ecossistema manguezal é um bioma costeiro tropical, localizado na zona de transição entre a terra e o mar, e é caracterizado pela inundação periódica que confere a este ambiente características únicas e específicas. Estes locais possuem grande quantidade de matéria orgânica acumulada, cuja decomposição torna o nitrogênio e outros nutrientes disponíveis no início da cadeia trófica. Uma das formas do nitrogênio, o nitrato, desempenha um papel essencial na natureza. Para bactérias, o nitrato é ao mesmo tempo uma fonte de nitrogênio e umceptor de elétrons na ausência de oxigênio livre. Assim, alguns processos podem competir pelo nitrato, como por exemplo os processos de desnitrificação, redução dissimilatória de nitrato a amônio (DNRA) e oxidação anaeróbica de amônio (anammox). O estudo e a comparação destas três vias compõem os objetivos deste trabalho, acessando adicionalmente o efeito da contaminação dos manguezais sobre tais transformações. Para tanto, foram analisadas as bases genéticas para ocorrência de tais processos (metagenômica), a expressão de tais genes nos sedimentos analisados (metatranscriptômica), e a funcionalidade de tais processos (incubações com nitrogênio marcado ^{15}N), buscando o entendimento das transformações pelas quais o nitrogênio/nitrato passa preferencialmente neste ambiente. As análises de DNA e RNA mostraram a presença e a expressão dos genes para ocorrência de tais transformações, com destaque para os genes relacionados a desnitrificação (*nirS*, *nirK*, *nosZ*, *norB* e *narG*) na análise metagenômica, e a expressão de genes relacionados ao processo de anammox na metatranscriptômica (principalmente o gene *hao*). As incubações com nitrogênio marcado demonstraram a maior ocorrência da desnitrificação, seguida do processo de DNRA e a baixa taxa de oxidação anaeróbica de amônio. Todos estes processos mostraram-se alterados de acordo com a contaminação dos manguezais, sendo a área impactada com óleo a que mostrou menores valores de desnitrificação, anammox e DNRA. Tais resultados descrevem de forma inédita a transformação do nitrato em manguezais, e indica os efeitos da degradação do ambiente sobre este importante ciclo biogeoquímico para a manutenção do ecossistema mangue.

Palavras-chave: Isótopos marcados; Metagenômica; Metatranscriptômica

Abstract

Mangrove ecosystem is a coastal tropical biome, located in transition zone between land and sea, characterized by flooding period that gives to this biome unique and specific environment conditions. These places have a large amount of organic matter accumulated, which makes nitrogen decomposition and other nutrients available at the beginning of the trophic chain. One form of nitrogen, nitrate, plays an essential role in nature. For bacteria, nitrate is both a nitrogen source and an electron acceptor in the absence of free oxygen. Thus, some processes may compete for nitrate such as denitrification processes, dissimilatory nitrate reduction to ammonia (DNRA) and anaerobic ammonium oxidation (anammox). The comparison of these three pathways composes the goals of this study, accessing, additionally, the effect of mangrove contamination related with such transformations. Therefore, we analyzed the genetic basis for the occurrence of such processes (metagenomics), the expression of such genes analyzed sediments (metatranscriptomics), and the functionality of such processes (incubations with ^{15}N labeled nitrogen), trying to understand the transformations which the nitrogen/nitrate is preferentially in this environment. DNA and

RNA analyses showed the presence and expression of genes for the occurrence of such transformations, especially genes related to denitrification (*nirS*, *nirK*, *nosZ*, *norB* and *narG*) in metagenomic analysis, and expression of genes related to anammox process in metatranscriptomic analysis (mainly *hao* genes). Incubations with labeled nitrogen demonstrated higher occurrence of denitrification, followed by DNRA process and low rate of anaerobic ammonium oxidation. All these processes were altered according mangroves contamination, and the impacted area with oil showed lower values of denitrification, anammox and DNRA. These results describe an unprecedented transformation of nitrate in mangroves, and indicate effects of environmental degradation from environment to this important biogeochemical cycle for maintaining the mangrove ecosystem.

Keywords: Isotope-labeled; Metagenomic; Metatranscriptomic

2.1 Introdução

Os manguezais ocorrem em uma grande variedade de condições ambientais, e estão localizados principalmente a margens de baías, enseadas, barras, desembocaduras de rios, lagunas e reentrâncias costeiras, onde exista o encontro de águas de rios com do mar (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2000; SCHAEFFER-NOVELLI; CINTRÓN-MOLERO, 1999a). Assim, os manguezais são essenciais para a manutenção do nível do mar e proteção da costa (DUKE et al., 2007).

A comunidade microbiana presente nos sedimentos de manguezais é fortemente influenciada pela biogeografia, propriedades antropogênicas e ecológicas, incluindo a cadeia alimentar do ecossistema, ciclagem de nutrientes, e a presença de compostos orgânicos e inorgânicos no sedimento (GHOSH et al., 2010). Estes sedimentos diferem dos solos comuns, principalmente devido à sua baixa disponibilidade de oxigênio, salinidade, e característica de potencial redox altamente redutora, o que torna a matéria orgânica difícil de degradar, limitando a disponibilidade de nutrientes (HOLGUIN et al., 2001; FERREIRA et al., 2010).

Considerando este acúmulo de matéria orgânica e as características bioquimicamente redutoras, este ecossistema torna-se um local interessante para se estudar as transformações de nitrato/nitrito no ciclo do nitrogênio. Sugere-se que exista uma forte competição entre os microrganismos e plantas para utilizar estas formas disponíveis de nitrogênio. O nitrato presente em sedimentos deriva da degradação de compostos orgânicos (RIVERA-MONROY; TWILLEY, 1996); sendo posteriormente, alvo de vários processos microbianos, como as vias desnitrificação, DNRA e anammox.

A desnitrificação consiste na completa redução de nitrato a N_2 , numa cascata de reações realizada por organismos distintos, onde a presença e a atividade de um conjunto de genes são necessárias (TIEDJE, 1988). As principais enzimas envolvidas nesta atividade são as nitrito e nitrato redutases (codificadas por um conjunto de genes, como *narG*, *nirK* e *nirS*) (REYNA et al., 2010, GLOCKNER et al., 1993); óxido nítrico (NO) redutases (codificadas pelo operon *nor*), e óxido nitroso (N_2O) redutases (codificadas pelo gene *nosZ*) (THROBACK et al., 2004; CHON et al., 2009). Este processo pode ser realizado por microrganismos anaeróbicos facultativos, os quais estão filogeneticamente encontrados em todos os domínios filogenéticos (*Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*) (FRANCIS et al., 2007).

Os organismos podem ainda realizar a redução dissimilatória de nitrato a amônio (DNRA) por meio das vias citoplasmática e periplasmática, ambas realizadas com sistemas enzimáticos característicos, como os codificados pelo operon *nrf* (MOHAN; COLE, 2007). A via DNRA é conhecida como catalisada primeiramente por bactérias fermentativas obrigatórias e facultativas, observadas previamente em lodo anaeróbico, sedimentos anóxicos e em rúmen (TIEDJE et al., 1982; BONIN, 1996; NIJBURG et al., 1997).

A terceira possibilidade de concorrência pelo consumo de nitrato/nitro seria a ocorrência da oxidação de anaeróbica de amônia (anammox), que combina a presença de nitrito e amônio, com produção de água e N_2 como produtos finais (STROUS; JETTEN, 2004; KRAFT et al., 2010). As enzimas hidrazina-hidrolase estão envolvidas nesta via (sintetizadas pelo gene *hh*) (STROUS et al., 2006), como também a enzima hidroxilamina oxidorreductase (produto do gene *hao*), e a enzima hidrazina-oxidante (codificada pelo gene *hzor*) (SHIMAMURA et al., 2007). Desde a descrição do processo anammox (STROUS et al., 1999), várias bactérias foram identificadas como capazes de realizar essa transformação, todas pertencentes à ordem dos *Planctomycetales*, distribuídos em um clado monofilético com uma grande distância evolutiva de outros Planctomycetes. Até o momento, os gêneros descritos como organismos anammox são todos candidatos e ainda não cultivados, como *Brocadia*, *Kuenenia*, *Scalindua*, *Anammoxglobus* e *Jettenia* (JETTEN et al., 2009; KUENEN, 2008; QUAN et al., 2008; STROUS; JETTEN, 2004).

O emprego de técnicas isotópicas em trabalhos de pesquisa utilizando o nitrogênio marcado tem proporcionado a elucidação de muitos dos aspectos envolvidos no ciclo deste elemento (TRIVELIN; RODRIGUÊS; VICTÓRIA, 1996; TRIVELIN et al., 2002). Naturalmente, ocorrem dois isótopos estáveis de nitrogênio, ^{14}N e ^{15}N (^{15}N , isótopo estável mais pesado do nitrogênio). Estes isótopos apresentam abundância natural de 99,63 e 0,37%

em átomos ^{14}N e ^{15}N , respectivamente (LIDE, 1997). A existência do isótopo pesado do ^{15}N possibilita a produção de compostos marcados ou enriquecidos, caracterizados por apresentarem abundância isotópicas acima da natural. Esta vantagem destaca o ^{15}N como um dos isótopos estáveis mais utilizados como ferramenta de pesquisa (LIDE, 1997).

Para pesquisas envolvendo a via anammox, esta metodologia vem sendo frequentemente utilizada (TRIMMER et al., 2003; RISGAARD-PETERSEN et al., 2004). O método baseia-se geralmente em Incubações com nitrito ou nitrato marcados e sua subsequente formação de gás $^{29}\text{N}_2$ ($^{14}\text{N}^{15}\text{N}$), que indica a combinação da molécula marcada com um amônio não marcado. Caso haja a liberação de $^{30}\text{N}_2$ ($^{15}\text{N}^{15}\text{N}$), temos a ocorrência da desnitrificação, onde N proveniente apenas no nitrato/nitrito marcados, inseridos no sistema, dão origem ao nitrogênio gasoso. Utilizando tais incubações com ^{15}N , são possíveis avaliações tanto para sedimentos intactos sem perturbação, como para ambientes perturbados, além de sistemas artificiais (BRANDSMA et al., 2011).

Juntamente com a estimativa de tais atividades, a base genética para a ocorrência de tais processos deve ser avaliada. Neste ponto, temos que a evolução da biologia molecular tem levado a avanços nos estudos da microbiologia ambiental e da ecologia do solo. Métodos moleculares baseados em genes ribossomais e relacionados a funções específicas, têm sido conduzidos para analisar a comunidade microbiana e a estrutura diversidade genética em vários ambientes. No entanto, tais métodos ainda não refletem integralmente a diversidade e a taxonomia microbiana com suas possíveis funcionalidades nos diferentes ambientes. Para isto, métodos de sequenciamento direto de ácidos nucleicos, baseados em plataformas de alto rendimento, atendem melhor a tal objetivo, como as metodologias de metagenômica e metatranscriptômica, desenvolvidas na plataforma 454 FLX da Roche ou nos equipamentos da Illumina. Essas novas plataformas possuem como características comuns um poder de gerar informação muitas vezes maior que o sequenciamento de Sanger, com uma grande economia de tempo e custo por base para o sequenciamento (CARVALHO et al., 2010).

Enquanto a metagenômica fornece informações sobre o conteúdo genético de uma comunidade microbiana, a metatranscriptômica promete revelar as atividades reais dos genes presentes nesta comunidade, em um determinado tempo e lugar (MEYER et al., 2008; MITRA et al., 2011; OVERBEEK et al., 2005). O sequenciamento de alto rendimento metagenômico de DNA já tem sido aplicados para revelar comunidades microbianas na água do mar (GILBERT et al., 2008), solo (URICH et al., 2008) e sedimentos de manguezais

(ANDREOTE et al., 2012). No entanto, poucos estudos metatranscriptômicos tem sido aplicadas para as comunidades microbianas da água marinha.

Assim, neste estudo foi realizado o *screening* de três conjuntos de dados metagenômicos e metatranscriptômicos originados de sedimentos de manguezais, na busca por evidências da ocorrência de genes relacionados às transformações de nitrato, como os genes relacionados a desnitrificação (*narG*, *nirS*, *nirK*, *nosZ* e *norB*); processo anammox (*hh*, *hzo* e *hao*), e o gene indicador para via DNRA (*nrfA*). Adicionalmente, buscando quantificar essas transformações, técnicas que utilizam nitrogênio marcado ^{15}N foram aplicadas para comparar as taxas em que estes processos ocorrem nos sedimentos dos manguezais amostrados.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e métodos

2.2.1.1 Descrição dos locais de coleta

Os manguezais amostrados neste estudo estão localizados na cidade de Bertioga, Estado de São Paulo, Brasil. Apesar da localização na mesma cidade, estes manguezais apresentam condições diferenciadas de conservação. Um destes manguezais foi afetado por contaminação de óleo em 1983, quando um volume de 35 milhões de litros de óleo foi derramado dentro da área de manguezal. Este manguezal é claramente dividido em duas sub regiões, separadas por um pequeno córrego que cruza o manguezal. Na área próxima a terra (área nomeada BrMgv02, coordenadas 23°53'49'S, 46°12'28'W), o efeito do petróleo ainda está presente, mesmo depois de 28 anos do derramamento, onde a vegetação nativa ainda está em regeneração. Na área próxima ao mar (BrMgv01, coordenadas 23°53'49'S, 46°12'28'W), não é possível observar os efeitos do derramamento, possivelmente devido a drenagem do óleo promovida pelo fluxo de água. Adicionalmente, um terceiro local foi amostrado (BrMgv03, coordenadas 23°54'06'S, 45°15'03'W), uma área de manguezal localizada próxima ao centro da cidade, sofrendo os efeitos do lixo depositado no mar próximo a área (Figura 2.1).

No Estado de São Paulo as florestas de manguezais são compostas por principalmente três espécies de árvores: *Avicennia shaueriana*, *Laguncularia racemosa*, e *Rhizophora mangle*, mas para a área altamente afetada pelo óleo a vegetação está claramente prejudicada, sendo composta por uma baixa densidade de plantas, com ausência de *R. mangle*. Para o

manguezal BrMgv01, as três espécies são encontradas. outras espécies são mais abundantes nestes locais. Na terceira área, uma composição similar de vegetação é observada, mas também é possível encontrar outras espécies além das tipicamente presentes nos manguezais.

A coleta as amostras foi realizada no verão (janeiro de 2011). Em cada uma destas três regiões descritas acima, amostras foram coletadas por meio de uma amostrador de aço cilíndrico (7 cm de diâmetro x 20 cm de profundidade). No total, nove amostras foram coletadas, considerando as repetições coletadas em cada área (3 manguezais x 3 repetições). Cada uma destas 9 amostras foi originada de 3 subamostras retiradas em um raio de 0,5 m em cada ponto amostrado.

Figura 2.1 - Descrição dos pontos de coleta na cidade de Bertiooga, estado de São Paulo. Oil Mgv: manguezais contaminados com derramamento de petróleo; Ant Mgv: manguezal que sofre contaminação da cidade, modificado de Dias et al. 2011

Buscando informações sobre análises físico-químicos das áreas estudadas, vale ressaltar os dados encontrados por Dias et al. (2011), em um estudo realizado nas mesmas

áreas de manguezais selecionadas para este trabalho. Ainda, para uma maior compreensão sobre a contaminação nas áreas estudadas, foi feito contato com a Dra. Daniella Vilela Lima, que realizou a análise de hidrocarbonetos nestas mesmas áreas em seu doutorado defendido em 2012 (LIMA, 2012) (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Análises físico-químicas (fonte: DIAS et al., 2011); concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (ng.g^{-1} peso seco) (fonte: LIMA, 2012) nas amostras de sedimento dos manguezais estudados

(continua)

Análises	Manguezais		
	BrMgv01	BrMgv02	BrMgv03
Composição física			
Areia:siltre:argila (%)	34:60:6	52:38:10	63:33:5
Umidade(%)	65,16	58,98	76,06
Condutividade (ms)	8,98	11,50	10,70
Dados químicos			
pH	6,9	6,6	6,9
Matéria orgânica (%)	10,86	11,89	10,53
Nitrogênio (N) (%)	0,13	0,38	0,30
Fósforo (P) (%)	0,13	0,15	0,08
Potássio (K) (%)	0,09	0,14	0,08
Cálcio (Ca) (%)	0,27	0,32	0,22
Magnésio (Mg) (%)	0,20	0,29	0,18
Enxofre (S) (%)	0,31	0,34	0,23
Sódio (Na) (mg/kg)	5,33	8,80	4,71
Hidrocarbonetos			
1-Naftaleno	4,70	2,31	5,49
2-Metilnaftalenos	1,30	1,92	7,76

Tabela 2.1 - Análises físico-químicas (fonte: DIAS et al., 2011); concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (ng.g^{-1} peso seco) (fonte: LIMA, 2012) nas amostras de sedimento dos manguezais estudados

(continuação)

Análises	Manguezais		
	BrMgv01	BrMgv02	BrMgv03
Hidrocarbonetos			
3-Bifenilo	1,30	1,30	1,70
4-Etilnaftalenos	2,60	2,60	2,60
5-Dimetilnaftalenos	2,60	8,26	6,31
6-Acenaftaleno	3,70	3,70	3,70
7-Acenaftaleno	1,30	1,30	1,30
8-Trimetilnaftalenos	2,53	3,76	1,94
9-Fluoreno	1,30	1,60	1,30
10-Metilfluorenos	1,76	5,05	1,44
11-Dibenzotiofeno	1,30	1,58	1,30
12-Fenantreno	2,60	3,01	2,90
13-Antraceno	1,10	1,56	1,13
14-Dimetilfluorenos	1,30	5,76	1,30
15-Metildibenzotiofenos	1,30	1,30	1,30
16-Metilfenantrenos	2,49	5,73	3,09
17-Dimetildibenzotiofenos	1,30	1,88	1,30
18-Dimetilfenantrenos	3,46	10,68	2,55
19-Fluoranteno	8,68	8,60	8,57
20-Pireno	7,27	10,81	6,37
21-Metilfluorantenos	3,82	34,45	2,90
22-Reteno	1,30	1,72	1,30
23-Metilpireno	3,92	36,34	2,26
24-Benzo(c)fenantreno	1,20	1,20	1,25
25-Benzo(a)antraceno	4,89	5,06	4,40
26-Criseno	5,07	49,41	4,83
27-Metilcriseno	8,78	119,22	6,35
28-Dimetilcrisenos	7,96	145,60	2,66

Tabela 2.1 - Análises físico-químicas (fonte: DIAS et al., 2011); concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (ng.g^{-1} peso seco) (fonte: LIMA, 2012) nas amostras de sedimento dos manguezais estudados

Análises	Manguezais		
	BrMgv01	BrMgv02	BrMgv03
Hidrocarbonetos			
29-Benzo(b)fluoranteno	5,38	7,96	5,35
30-Benzo(j)fluoranteno	4,11	6,86	2,99
31-Benzo(k)fluoranteno	5,10	6,05	3,57
32-Benzo(e)pireno	6,02	35,02	5,61
33-Benzo(a)pireno	4,72	4,73	4,82
34-Perileno	110,36	37,58	23,80
35-Indeno[1,2,3-c,d]pireno	38,89	15,30	2,94
36-Dibenzo(a,h)antraceno	7,65	11,07	2,78
37-Benzo(b)criseno	4,29	1,33	1,45
38-Benzo(g,h,i)perileno	27,85	39,92	13,11
39-Coroneno	10,89	5,50	5,41
Σ-HPAs	316,09	647,03	161,13

Nesta análise, a concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos foi determinada nas amostras de sedimento, indicando a presença de tais contaminantes em maior quantidade na área BrMgv02.

2.2.1.2 Sequenciamento de DNA ambiental

O sequenciamento do DNA ambiental foi realizado previamente por Andreote et al., (2012). Resumidamente, para cada um dos manguezais utilizados, 0,3 gramas de sedimento homogeneizado foram submetidas a extração de DNA com uso do kit Power Soil DNA Isolation kit (MoBio[®] Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA). Depois das extrações, todas amostras de DNA para cada manguezal foram agrupadas (aprox. $20 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ de DNA de cada extração - para um total de $100 \mu\text{l}$), e o DNA foi concentrado com centrífuga *speed vacuum* (3,000 rpm for 30 min) para um volume final de $10 \mu\text{l}$. Um espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) foi usado para obter uma acurada quantificação

da extração e para mensurar outros parâmetros importantes para a qualidade do DNA, como a razão entre a absorbância para 260/280 nm e 260/230 nm. Estas amostras de DNA ambiental provenientes sedimento de manguezais brasileiros foram submetidas a pirosequenciamento usando 454 GS FLX tecnologia titanium na Roche Applied Sciences (Indianapolis, IN, USA). Um quarto de uma placa foi utilizado para cada área de manguezal (BrMgv01 a BrMgv04, sendo neste trabalho somente consideradas as amostras BrMgv01 a BrMgv03, todas oriundas de manguezais da cidade de Cananéia).

As sequências obtidas foram selecionadas quanto a qualidade usando um mínimo de comprimento de 30 bp, qualidade *cut-off* ≥ 20 . As sequências ‘limpas’ foram enviadas para o servidor metagenômico RAST (MG-RAST) e números públicos de acesso foram criados: 4451033.3, 4451034.3 e 4451035.3 para os manguezais BrMgv01, BrMgv02 e BrMgv03, respectivamente.

2.2.1.3 Seleção de genes relacionados ao ciclo do nitrogênio

Para a detecção de genes alvo, coleções de sequências de proteínas selecionadas para cada gene funcional de interesse foram usadas para realizar a pesquisa tBLASTn contra as leituras (*reads*) metagenômicas (com *E-value cut-off* 0.001).

Todos os *reads* identificados relacionados com genes funcionais. Os *reads* selecionados para este estudo estão envolvidos nas vias de transformação do nitrogênio, desnitrificação (genes *nirS*, *nirK*, *nosZ*, *norB* e *narG*); anammox (genes *hh*, *hao* e *hzo*) e DNRA (*nrfA*). Estes genes foram selecionados devido a sua importância no ciclo do nitrogênio, com destaque para o processamento do nitrito/nitrato, e devido ao uso destes genes como biomarcadores funcionais.

A seleção das sequências utilizadas nesta abordagem foi realizada em três etapas. Primeiro, foi feita a extração de sequências de proteínas de todos os genomas procarióticos sequenciados disponíveis no NCBI (FTP://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/Bacteria). No segundo passo, as sequências semelhantes a esses genomas foram recuperadas por tBLASTn e adicionado à base de dados. No terceiro passo, sequências de proteínas disponíveis (putativas) de genes alvo funcionais de procariotos não cultivados foram recuperados a partir dos bancos de dados UniProt (<http://www.uniprot.org>) e FunGene ([http://fungene.cme.msu.edu / index.spr](http://fungene.cme.msu.edu/index.spr)). Para reduzir a redundância, as sequências obtidas foram agrupadas em 90% de identidade utilizando o software *uclust* (EDGAR, 2010), sendo apenas as sequências *seeds* dos

agrupamentos resultantes adicionadas à base de dados de validação dos genes. *Reads* metagenômicos selecionados a partir da busca tBLASTn inicial foram validados por BLASTp (sem corte de *E-value*) contra a base de dados de validação, incluindo as sequências selecionadas. Um *read* foi considerado como 'validado' se um *hit* com uma sequência marcada (do gene funcional esperado) apresentou-se entre os 50 primeiros resultados observados. Assim, as sequências identificadas como relacionada a estes genes/enzimas de interesse foram extraídas a partir de dados metagenômicos e submetidas a uma pesquisa BLASTp, onde foi possível determinar a filiação taxonômica destas sequências (nível de Classe).

Todas as inferências sobre a abundância de sequências associadas com cada processo ou em cada grupo taxonômico foram realizadas com base na taxa de ocorrência normalizada, determinada dividindo-se o número de sequências observadas pelo número total de leituras de cada conjunto de dados metagenômico.

2.2.1.4 Mapeamento metabólico das transformações do nitrogênio em sedimentos de manguezais - dados metagenômicos

A anotação no subsistema metabolismo do nitrogênio foi feita no servidor MG-RAST. Tal análise fornece vários métodos para acessar aos diferentes tipos de dados, incluindo reconstruções filogenéticas e metabólicas, e tem a capacidade de comparar o metabolismo e as anotações de um ou mais metagenomas (URICH et al., 2008; MEYER et al., 2008). Assim, as principais transformações de nitrogênio foram analisadas nos três conjuntos de dados dos manguezais com base nos mapas KEGGs (KANEHISA; GOTO, 2000) (<http://www.genome.jp/KEGG>).

Os mapas resultantes desta análise indicam a abundância de genes codificantes de proteínas envolvidas em cada passo da ciclagem do nitrogênio nos metagenomas analisados. Esta informação foi obtida utilizando BLASTX contra o banco de dados do NCBI-NR (*cut-off* de *E-value* de $1e-5$), seguindo os parâmetros usados por Andreote et al. (2012).

2.2.1.5 Sequenciamento de RNA ambiental

Esta metodologia foi conduzida pela aluna de mestrado Luana Lira Cadete, que tem seu trabalho focado na metatranscriptômica de sedimentos de manguezais. Resumidamente, as amostras de RNA foram extraídas a partir de do sedimento de manguezais (kit de

isolamento de RNA total PowerSoil®, MoBio Labs, Inc. Solana Beach, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. A eficiência da extração foi determinada por gel e eletroforese, e avaliação do RNA no BioAnalyzer (Roche). Uma vez observada a qualidade da extração, e a obtenção da quantidade necessária para o sequenciamento (cerca de 100ng por amostra), tal sequenciamento foi realizado no equipamento Illumina HiScan, sob terceirização (Laboratório de Multiusuários Centralizado, Genômica Funcional Aplicada à Agropecuária e Agroenergia). Cada *dataset* foi composto de aproximadamente 140.500 Mb sequências de RNA, de tamanho médio de 100 pb, sendo aproximadamente 68%, 63% e 23% destas sequências oriundas de RNA ribossomal para as áreas BrMgv01, BrMgv02 e BrMgv03, respectivamente. Os conjuntos de dados utilizados foram enviados ao servidor MG-RAST e estão sob os números públicos de acesso 4505537.3, 4505538.3 e 4505539.3 para os manguezais BrMgv01, BrMgv02 e BrMgv03, respectivamente.

2.2.1.6 Mapeamento metabólico das transformações do nitrogênio em sedimentos de manguezais - dados metatranscriptômicos

Após o sequenciamento, a análise das sequências de RNA foi realizada de acordo com a metodologia usada para DNA (descrição detalhada no item 2.2.1.4). Assim, a expressão de genes envolvidos nas principais transformações do nitrogênio foram analisadas em três conjuntos de dados com base nos mapas KEGGs (KANEHISA; GOTO, 2000).

2.2.1.7 Determinação das taxas de desnitrificação, anammox e DNRA por meio de incubações com ^{15}N marcado

Para as incubações com nitrogênio marcado, as amostras de sedimento foram coletadas nos 3 pontos descritos no item 2.2.1.1, com 3 repetições em cada ponto. Esta etapa foi desenvolvida no laboratório de Fitness Group, no Instituto Max Planck de Microbiologia Marinha (Bremen, Alemanha), sob a supervisão do Prof. Dr. Ir. Marc Strous.

Taxas potenciais para as vias anammox e desnitrificação foram estimadas pelo método de Thamdrup e Dalsgaard (2002), modificado de acordo com Risgaard-Petersen et al., (2004). Para tanto, foram preparados sacos/bolsas para incubação (tamanho 20 cm x 20 cm), produzidos a partir de uma única folha de plástico polietileno com uso de um selador térmico. Os sacos de plástico foram preparados com uma saída de vidro encaixada juntamente com 2

vedações. A abertura do orifício foi selada com uma tampa de borracha (HANSEN et al., 2000) (Figura 2.2).

Figura 2.2 - Bolsa (ou saco de incubação) utilizada nas incubações do sedimento com nitrogênio marcado, produzido a partir de única folha de plástico polietileno selada com uso de um selador térmico

Dentro dos sacos, 300 ml de água do mar artificial (Red Sea Salt, Arcádia, Alemanha) foram misturados com 100 ml de sedimento fresco (buscando a uma concentração final de salinidade em torno de 0,6% (média), conforme salinidade encontrada para as três áreas utilizadas (Tabela 2.2). Todas as bolhas foram excluídas manualmente. O total de nove sacos/bolsas foram preparados(as) (3 repetições x 3 manguezais). As incubações foram iniciadas 12 horas após esta preparação, a fim de permitir o desenvolvimento de condições anaeróbicas. A adição de nitrato marcado e amônio não marcado para o volume de 400 ml (nas seguintes concentrações finais de 0,1 mM $\text{Na}^{15}\text{NO}_3^-$ e 0,5 mM $^{14}\text{NH}_4$) iniciou o tempo de incubação (primeira coleta = 0 hora). As amostras líquidas foram recolhidas gentilmente com seringa e acondicionadas em *exetainers* (Exetainers, UK), preparados com 0,2 ml de cloreto de mercúrio (HgCl_2), usado para parar a atividade biológica no interior do frasco. As amostras foram coletadas em triplicatas em períodos de 0; 1,5; 3; 4,5 e 6 horas. Os *exetainers* foram submetidos a adição de 1,5 ml de *headspace* com injeção de gás argônio, usando uma seringa. A ocorrência dos processos anammox e desnitrificação foi estimada através da quantificação

de concentrações de tipos de isótopos de N_2 marcados ($^{14}N^{15}N$ e $^{15}N^{15}N$) determinado por espectrometria de massa de razão isotópica (sistema IRMS, Finigan MAT, Bremen, Alemanha). Os valores para produção de $^{29}N_2$ e $^{30}N_2$ foram utilizados de acordo com equação descrita por Thamdrup e Dalsgaard (2002), com o objetivo de calcular as taxas totais para as vias anammox e desnitrificação (em $\mu\text{mol } ^{29}N_2/\text{L/h}$ e $\mu\text{mol } ^{30}N_2/\text{L/h}$).

Para quantificar a redução dissimilatória de nitrato a amônio (DNRA), as taxas de consumo foram calculadas utilizando o método de redução de cloreto de vanádio. Taxas de DNRA foram estimados subtraindo o consumo de nitrato e nitrito (NO_x^-) das amostras, utilizando as mesmas amostras (*exetainers*) utilizadas para a determinação das taxas $^{29}N_2$ e $^{30}N_2$ para anammox e desnitrificação. As leituras foram realizadas nos mesmos tempos considerados, em triplicado para cada tempo de incubação. As concentrações de NO_x^- em cada tempo foram estimadas com um analisador de NO_x^- (NOx analisador modelo 42c, Thermo Environmental Instruments Inc., Bremen, Alemanha) de acordo com Hendrix e Braman (1989), onde uma curva com valores conhecidos de nitrato de potássio (KNO_3) foi utilizada para corrigir os valores obtidos. As leituras foram realizadas em partes por bilhão (ppb). Os valores de consumo NO_x^- foram transformados em $\text{nmol NO}_x^- \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, e o valor total para o consumo NO_x^- para cada área de manguezal foi obtido levando em consideração os valores obtidos para cada hora de incubação (cálculo de inclinação).

Ainda, para dar suporte às taxas obtidas nestas duas metodologias, a determinação das concentrações de amônio, nitrito e nitrato foram monitoradas ao longo das incubações. A quantificação do amônio foi realizada nas amostras de sedimentos, utilizando o método espectrofotométrico Standard (SOLÓRZANO 1969; CROMPTON, 2005). Devido às baixas concentrações de nitrato e nitrito, estes compostos não foram detectados por métodos colorimétricos. Assim, a concentração de nitrato/nitrito foi realizada somente com fitas específicas (Quantofix® *test strips*, Macherey Nagel, Germany).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Avaliação metagenômica dos genes relacionados às transformações do nitrogênio em sedimentos de manguezais

O número total de *reads* obtidos para cada metagenoma usado neste estudo foi de 249.993 para BrMgv01 (tamanho médio de 235,2 bases, 55.75% de conteúdo GC), 231,233

para BrMgv02 (tamanho médio de 238,2 bases, 54,64% de conteúdo GC), 214,921 para BrMgv03 (tamanho médio das bases 247,9, 56,36% de teor de GC).

Ainda, nesta etapa do trabalho foi usada a metodologia de comparação dos dados do metagenoma contra o banco de dados dos genes de interesse, organizado como descrito no item 2.2.1.3. Dentro do número de *reads* validados, foram selecionados apenas os *reads* normalizados. Os valores normalizados para a ocorrência destes genes indicam diferenças entre as três áreas de manguezal analisadas (Tabela 2.2).

Ainda, nesta etapa do trabalho foi usada a metodologia de comparação dos dados do metagenoma contra o banco de dados dos genes de interesse, organizado como descrito no item 2.2.1.3. Dentro do número de *reads* validados, foram selecionados apenas os *reads* normalizados. Os valores normalizados para a ocorrência destes genes indicam diferenças entre as três áreas de manguezal analisadas (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Número total de sequências avaliadas, descritas para cada área de manguezal estudada; *reads* normalizados para as três vias analisadas (*reads* para 100.000 sequências)

Manguezais	Sequências consideradas		Reads normalizados		
	Número total	Reads validados	Desnitrificação	Anammox	DNRA
BrMgv01	249.993	123	10,80	1,60	0,80
BrMgv02	231.233	85	4,76	1,73	0,86
BrMgv03	214.921	115	10,70	5,12	0,93

Todos os genes funcionais detectados relacionados ao ciclo do nitrogênio foram validados; o número de *reads* observados para cada área estudada está descrito na tabela abaixo, bem como os genes selecionados neste estudo (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 - Todos os genes relacionados ao ciclo do nitrogênio detectados, divididos por área estudada. Os genes selecionados para maiores estudos neste trabalho encontram-se evidenciados em negrito

(continua)

Genes	Número de <i>reads</i>		
	BrMgv01	BrMgv02	BrMgv03
<i>nasC</i>	21	16	24
<i>nirB</i>	19	13	9
<i>narG</i>	16	3	12
<i>narH</i>	13	9	7
<i>napA</i>	9	7	8
<i>nirA</i>	7	1	2
<i>narI</i>	5	5	8
<i>narI</i>	5	5	8
ATPtp	4	7	2
<i>nirS</i>	4	2	3
<i>hh</i>	3		6
<i>narK</i>	3	3	5
<i>norB</i>	3	3	1
<i>norC</i>	3	1	5
NASA	2	1	-
<i>nasB</i>	2	-	1
<i>nirK</i>	2	-	4
<i>nosZ</i>	2	3	3
<i>nrfA</i>	2	2	2
<i>hzo</i>	1	3	3
<i>nirD</i>	1	1	3
<i>nrfD</i>	1	1	1
<i>hao</i>	-	1	2
<i>napB</i>	-	-	1
<i>napCnirT</i>	-	-	2
<i>norExZ</i>	-	3	-

Tabela 2.3 - Todos os genes relacionados ao ciclo do nitrogênio detectados, divididos por área estudada. Os genes selecionados para maiores estudos neste trabalho encontram-se evidenciados em negrito

(conclusão)

Genes	Número de <i>reads</i>		
	BrMgv01	BrMgv02	BrMgv03
<i>nrfC</i>	-	-	1
Total	123	85	115

Esta abordagem selecionou um total de 86 sequências relacionadas com as transformações de nitrogênio; sendo 61 relacionados com a desnitrificação, 19 com anammox, e 6 com DNRA (Tabela 2.4). Estes números indicam a ocorrência de organismos relacionados com estas transformações específicas em sedimentos manguezais, sobretudo na via desnitrificação, onde foi observado um maior número de *reads* detectados.

Tabela 2.4 – Número de *reads* encontrados para os genes envolvidos nas três vias analisadas, para os três manguezais amostrados

Manguezais	Vias metabólicas (genes)								
	Desnitrificação					Anammox			DNRA
	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	<i>nosZ</i>	<i>narG</i>	<i>norB</i>	<i>hao</i>	<i>hh</i>	<i>hzo</i>	<i>nrfA</i>
BrMgv01	2	4	2	16	3	0	3	1	2
BrMgv02	-	2	3	3	3	2	6	3	2
BrMgv03	4	3	3	12	1	1	0	3	2

Comparando a quantidade relativa de genes envolvidos na desnitrificação, a área denominada BrMgv02 (11 *reads* no total) mostrou uma baixa abundância em relação as demais. O número relativo de genes envolvidos na via anammox revelou ser maior na área denominada BrMgv01 (27 *reads* no total), embora com pouca diferença com a área BrMgv03 (23 *reads* no total).

A baixa quantidade de sequências recuperadas impede a inferências sobre possíveis diferenças na ocorrência de genes específicos nessas bases de dados. A inferência mais forte que pode ser considerada é a grande abundância de sequências recuperadas com filiação ao gene *narG*, possivelmente envolvidas na redução de nitrato nestes sedimentos (Figura 2.3).

Figura 2.3 - Genes relacionados ao ciclo do nitrogênio detectados nos *reads* metagenômicos. Os *reads* selecionados para este estudo estão envolvidos nas vias: desnitrificação (genes: *nirK*, *nosZ*, *norB*, *narG*, como também consideramos o gene *nirS*); anammox (genes *hh*, *hao* e *hzo*) e DNRA (*nrfA*), em cada manguezal analisado

Observações mais específicas podem ser alcançadas mediante a afiliação taxonômica de sequências, que indicam primeiramente, a baixa diversidade de grupos observada para sequências relacionadas às vias anammox e DNRA. Sequências dos genes *hh*, *hao* e *hzo* foram principalmente afiliadas a Planctomycetes, com exceção de 1 *read* para BrMgv02, identificado como gene *hao*, afiliado com Betaproteobacteria; e dois outros *reads* no BrMgv03, também para *hao*, afiliados com Deltaproteobacteria. O gene *hao* também é importante em outras bactérias oxidadores de amônia, como bactérias do gênero *Nitrosomonas* (BERGMANN et al., 2005). No geral, estes dados corroboram com o que se é conhecido atualmente, onde a capacidade de realizar a via anammox (observados, por exemplo, com a detecção de genes específicos, como *hh*, *hao* e *hzo*) é encontrada em poucas bactérias autotróficas anaeróbicas, alocadas na ordem Planctomycetales (SCHMID et al., 2000, 2003).

Reads identificados como genes *nrfA*, associados com a via DNRA, foram taxonomicamente filiados na classe Gammaproteobacteria. Porém a capacidade para realizar DNRA é amplamente distribuída entre bactérias: Tiedje (1988) listou vários gêneros de bactérias do solo, anaeróbios obrigatórios (*Clostridium*) ou facultativos (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*) ou aeróbios (*Bacillus*, *Pseudomonas*), associados ao processo de DNRA. Além destes gêneros, recentemente foi demonstrado que várias espécies de rizóbios estão associados também a esta via (POLCYN; PODESZWA, 2009). Assim, pouco se pode inferir sobre a afiliação de tais genes a grupos específicos bacterianos.

Em contrapartida, os genes relacionados com a desnitrificação foram filogeneticamente distribuídos em grupos distintos, dependendo da área de manguezal analisado. Entre as classes encontradas, Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria apresentaram maior destaque. De acordo com Brettar et al. (2001), em ecossistemas marinhos, uma variedade de grupos de bactérias taxonomicamente independentes são capazes de realizar desnitrificação, e destas, 96% bactérias desnitrificantes cultiváveis pertencem à Gammaproteobacteria (BRETTAR et al., 2001). Jones e seus colaboradores (2008) reanalisaram dados de sequências disponíveis publicamente dos genes *nirS*, *nirK*, *norB*, e *nosZ*, e encontraram a predominância de sequências de Proteobacteria (Alphaproteobacteria 32%; Betaproteobacteria 28% e Gammaproteobacteria 28%). Além disso, em ecossistemas estuarinos de manguezais em Taiwan, Lei e Chfe (2006) observaram que a maioria das bactérias desnitrificantes estão associadas à Gammaproteobacteria. Em nosso estudo, além de Gammaproteobacteria, outros grupos também foram observados. No BrMgv01 por exemplo, a predominância de sequências relacionadas com a Alphaproteobacteria, Bacteroidetes e Gamaproteobacteria foi importante, seguidas pela abundância de genes relacionados com a Betaproteobacteria. Para BrMgv02 a afiliação com Bacteroidetes não foi observada, mas os grupos Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria permanecem como dominantes para os genes relacionados com a desnitrificação. Já em BrMgv03, os grupos com maior dominância foram Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria, seguidos Betaproteobacteria e Bacilli, (Figura 2.4).

Além de envolvida no processo de desnitrificação, a redução do nitrito para óxido nítrico por meio da nitrito redutase *cd1* (*NirS*) também está associada com bactérias promotoras de anammox (STROUS et al., 2006; KARTAL et al., 2011); porém, esta via não está completamente entendida para estas bactérias. Assim, neste estudo, este gene foi

considerado como parte da via desnitrificação, onde seu papel está bem mais sedimentado dentro do ciclo do nitrogênio.

Figura 2.4 - Afiliação taxonômica para os genes envolvidos na desnitrificação, *nirK*, *nirS*, *norB*, *nosZ* e *narG*, em cada área de manguezal analisada

A capacidade realizar desnitrificação é amplamente dispersa entre procariotos. Esta distribuição polifilética levantou a possibilidade da ocorrência da transferência de genes horizontal (THG), sendo este um fator importante a ser considerado na evolução da desnitrificação (JONES et al., 2008). Com relação à ocorrência diferencial de grupos taxonômicos nas três áreas avaliadas, a literatura colabora o que foi observado, uma vez que em locais com condições ambientais variáveis, como gradiente de concentração do nitrogênio inorgânico dissolvido, teor de matéria orgânica, oxigênio dissolvido e potencial redox, a distribuição de genes desnitrificantes ocorre com maiores flutuações (DONG et al., 2009; REYNA et al., 2010).

A microbiologia de sedimentos de manguezais tem sido acessada por diferentes métodos. Até o momento, está claro que os filos *Acidobacteria*, *Chloroflexi* e *Planctomycetes* são membros importantes na comunidade destes locais. Uma série de estudos tem indicado que o bioma mangue é um *hotspot*, onde a combinação única de parâmetros ambientais conduz à composição de comunidades microbianas específicas (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001).

2.3.2 Mapeamento metabólico das transformações do nitrogênio em sedimentos de manguezais

O sequenciamento direto do DNA e RNA das amostras de sedimento forneceu informações valiosas sobre a detecção e a expressão dos genes presentes nos organismos residentes nos sedimentos dos manguezais estudados. Com a afiliação das sequências na base de dados KEGG foi possível mapear as transformações biogeoquímicas relacionadas ao ciclo do nitrogênio (Figura 2.5). Nesta comparação a afiliação das sequências foi diferente da realizada no item anterior, por não termos acesso aos bancos de dados desenvolvidos para os genes de interesse (material disponível no grupo do Dr. Marc Strous).

A anotação de sequências relevantes para o metabolismo do nitrogênio revelou a presença de genes envolvidos principalmente com a redução de nitrato e óxido nítrico, oxidação da hidroxilamina e fixação biológica do nitrogênio. Uma comparação entre os dados originados do metagenoma e do metatranscriptoma foi realizada, permitindo observar a detecção mais abundante de tais genes nos dados de origem metatranscriptômica. Por exemplo, para a enzima Hao, 4, 18 e 60 *reads* foram detectados em BrMgv01, BrMgv02 e BrMgv03 (dados metatranscriptoma) respectivamente, contra apenas 1 *read* detectado em BrMgv01 (dados metagenoma). Para a enzima Nar, foram observados resultados semelhantes: 2 e 92 *reads* foram detectados em BrMgv02 e BrMgv03 (dados metatranscriptoma) apenas contra uma leitura em BrMgv01 (dados metagenoma). As enzimas Nor e Nir foram detectadas em BrMgv02 (metatranscriptoma), com 16 e 23 *reads* respectivamente. Pode-se portanto inferir, que o metabolismo do nitrogênio é um processo que ocorre de forma intensa nos manguezais, o que é esperado devido à grande importância da mineralização e do processamento de tal componente na manutenção do ecossistema. É possível ainda, notar que BrMgv02 (manguezal com maior contaminação) apresentou um maior número de genes expressos envolvidos no ciclo do nitrogênio. Também foi possível notar a importância da desnitrificação neste ambiente, pois as enzimas Nor e Nar foram detectadas com expressivo número de *reads*. Genes codificantes da enzima Hao também apresentaram detecção importante nestas áreas de manguezal, principalmente nas amostras BrMgv02 e BrMgv03, onde hidroxilamina está sendo oxidada a N_2 , um passo final da via anammox. É ainda preciso considerar a importância da fixação de nitrogênio em áreas de manguezal, principalmente em BrMgv02, o único que revelou a atividade da enzima Nif. Interessantemente, não foi observada a presença de RNAs afiliados ao processo de DNRA.

Figura 2.5 - Análise funcional dos dados metagenômicos (círculos) e metatranscriptômicos (quadrados). Cada item representa um papel funcional que está identificado pelo número de *reads* atribuídos em cada conjunto de dados para o metabolismo do nitrogênio. As caixas indicam a característica KEGG identificada, e os valores expressos em números indicam o a quantidade de sequências a partir de cada metagenoma ou metatranscriptoma afiliado com a função KEGG

De forma geral, com base em tais análises temos a clara evidência de que a base metabólica observada no metagenoma apresenta-se funcional (ao nível transcricional) nos manguezais estudados, onde ganha destaque a confirmação da desnitrificação como um processo importante, e a possível ocorrência de anammox, representada nesta análise pela alta abundância dos genes *hh* e *hao*.

2.3.3 Determinação da ocorrência da desnitrificação, anammox e DNRA

A fim de obter uma visão sobre o real funcionamento dos processos indicados pelos dados metagenômicos e metatranscriptômicos, foram realizados os estudos com compostos nitrogenados marcados (^{15}N). Esta tentativa foi previamente relatada por Thamdrup e Dalsgaard (2002), que estudou a produção de nitrogênio em sedimentos marinhos. Estudos

semelhantes foram realizados também em sedimentos de manguezal de rios em Queensland, Australia (MEYER et al., 2005), e com amostras de sedimento coletadas na Lagoa de Camarão no Vietnam (AMANO et al., 2011). O emprego desta metodologia com o isótopo estável marcado ^{15}N obteve, pela primeira vez, a confirmação do processo anammox (van de GRAAF et al., 1995), e continua a ser o método mais frequentemente utilizado para quantificar esta atividade.

Previamente as incubações, uma caracterização inicial determinou as quantidades naturais de amônia/amônio nos manguezais estudados: 147,74 mM em BrMgv01, 90,03 mM em BrMgv02 e 183,65 mM em BrMgv03. Estes valores indicam a menor quantidade de tal elemento no BrMgv02.

Além disto, para maior entendimento da presença compostos nitrogenados neste ambiente, antes de iniciar a incubação e durante todos os tempos de coleta de amostras, foi realizada a determinação de nitrato e nitrito, e os resultados encontram-se na tabela abaixo.

Tabela 2.6 - Determinação de nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) com uso de fitas Quantofix® (Macherey Nagel, Alemanha)

Determinação semiquantitativa de nitrato e nitrito							
Tempo de incubação	Manguezais	BrMgv01		BrMgv02		BrMgv03	
		NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻
		10 mg/l	-	10 mg/l	-	25 mg/l	-
	Início	10 mg/l	-	25 mg/l	-	25 mg/l	-
	0h	10 mg/l	-	25 mg/l	-	25 mg/l	-
	1,5h	25 mg/l	-	25 mg/l	-	25 mg/l	-
	3h	25 mg/l	-	25 mg/l	-	25 mg/l	-
	4,5h	25 mg/l	-	25 mg/l	-	10 mg/l	-
6h	10 mg/l	-	10 mg/l	-	25 mg/l	-	

Os resultados do presente estudo revelaram o predomínio de desnitrificação sobre a possível via anammox nas três áreas de manguezais estudadas (Figura 2.6). As taxas obtidas para a via desnitrificação foram: $49,83 \pm 4,72 \text{ nmol } ^{30}\text{N}_2 \text{ cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ em BrMgv01; $10,94 \pm 2,90 \text{ nmol } ^{30}\text{N}_2 \text{ cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ em BrMgv02 e $70,52 \pm 2,75 \text{ nmol } ^{30}\text{N}_2 \text{ cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ em BrMgv03. Para anammox

os valores observados foram: $2,40 \pm 0,43 \text{ nmol}^{29}\text{N}_2 \text{ cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ em BrMgv01, $0,66 \pm 0,18 \text{ nmol}^{29}\text{N}_2 \text{ cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ em BrMgv02 e $2,03 \pm 0,093 \text{ nmol}^{29}\text{N}_2 \text{ cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ em BrMgv03 (Figura 2.7).

Figura 2.6 - Experimentos com isótopos marcados. **a.** valores potenciais para anammox $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$; **b.** desnitrificação $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$, demonstrados para as 6 horas de incubação. As barras indicam erro padrão.

As taxas indicam que os valores observados para desnitrificação foram muito superiores aos valores observados para anammox, cerca de 20 vezes maior para BrMgv01, 16,5 vezes maior para BrMgv02 e 34,5 vezes maior para BrMgv3.

Figura 2.7 - Relação entre as taxas potenciais para anammox e para desnitrificação. Taxas obtidas para anammox $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$: 2,40±0,43 BrMgv01, 0,66±0,18 BrMgv02 e 2,03±0,093 BrMgv03, taxas dadas em $\text{nmol}^{29}\text{N}_2 \text{ cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Taxas obtidas para desnitrificação $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$: 49,83±4,72 BrMgv01; 10,94±2,90 BrMgv02 e 70,52±2,75, taxas são dadas em $\text{nmol}^{30}\text{N}_2 \text{ cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$. As barras indicam erro padrão.

A predominância de desnitrificação sobre anammox foi relatada anteriormente por Amano et al. (2011), estudando sedimento de manguezal em Haiphong, Vietnam. Considerando as condições ambientais dos manguezais, pode-se indicar que tal predominância seja esperada, uma vez que a alta demanda por aceptores finais de elétrons faz do nitrato um alvo a receber elétrons. Adicionalmente, esta mais rápida resposta de tal processo pode estar relacionada a maior diversidade de organismos capazes de promover o processo de desnitrificação em relação ao anammox, processo este realizado por um grupo restrito de bactérias. No entanto, destaca-se em tal análise a primeira evidência da ocorrência da oxidação anaeróbica do amônio em sedimentos de manguezais brasileiros, o que abre uma série de questões sobre os organismos promotores de tal metabolismo na condição ambiental particular de tais sedimentos. Para melhor visualização das taxas obtidas neste estudo comparadas a taxas obtidas em estudos anteriores, a Figura 2.8 deve ser consultada.

Figura 2.8 - Comparação das taxas obtidas e desnitrificação. **a.** anammox ^{29}N ; **b.** desnitrificação ^{30}N . Valores apresentados para sedimento de Logan River, Queensland, Austrália obtidos por Meyer; Risgaard-Petersen; Allen, 2005; valores apresentados para sedimento de manguezal em Haiphong, Vietnam, obtidos por Amano et al., 2011

Estas bactérias (promotoras de anammox) são responsáveis por uma parte significativa da perda de nitrogênio fixado nos oceanos, fato que as tornam importantes agentes no ciclo global do nitrogênio (van de VOSSSENBERG et al., 2012). A alta concentração de NO_3^- é fator que favorece a ocorrência do processo de anammox. De acordo com Dalsgaard et al. (2005), em sedimentos inorgânicos ricos em matéria orgânica e nutrientes, a desnitrificação é mais sensível à carga de carbono orgânico do que a via anammox. Sob condições de alto teor de matéria orgânica, uma maior demanda por receptor de elétrons é criada (ou seja, NO_2^- e NO_3^-), e uma fração menor do NO_3^- é liberado como NO_2^- . Em tais circunstâncias, bactérias promotoras de anammox podem não ser capazes de competir com a desnitrificação, quando a disponibilidade de doador de elétrons para desnitrificação permanecer alta. Tal fenômeno pode estar ocorrendo em sedimentos de manguezais, que têm considerável teor de carbono orgânico. Além disso, bactérias desnitrificantes apresentam uma taxa de crescimento muito maior (DALSGAARD et al., 2005), considerando que bactérias anammox podem levar de

180-280 dias para apresentar produtividade máxima em 80% de sua população total (KARTAL et al., 2012), o que lhes confere uma vantagem competitiva sobre bactérias anammox em ambientes flutuantes (DALSGAARD et al., 2005).

Ainda, pode-se sugerir que esta predominância da desnitrificação sobre a via anammox pode estar relacionada à disponibilidade de NO_2^- (TRIMMER et al., 2003; MEYER et al., 2005), uma vez que NH_4^+ é raramente limitante em sedimentos (RISGAARD-PETERSEN et al., 2003; MEYER et al., 2005). Neste trabalho, a presença de NO_2^- nos sedimentos utilizados não pode ser detectada (Tabela 2.1) durante todo o período de incubação dos sedimentos.

Além disso, observando a comparação da taxa total obtida para cada via, distinções podem ser também observadas entre as áreas de manguezal. Ambas, anammox e desnitrificação foram suprimidas na área afetada óleo (BrMgv02) (Figura 2.7). A obtenção das taxas para $^{29}\text{N}_2$ foi de cerca de três vezes maior para as áreas BrMgv01 e BrMgv03 quando comparadas a BrMgv02. Há indícios da relação destas taxas com a quantidade de amônia NH_4^+ detectada nas amostras. Observou-se que em BrMgv03 a maior quantidade de NH_4^+ detectada (183,65 mM), seguido por BrMgv01 (147,74 mM) e a menor quantidade foi detectada em BrMgv2 (90,03 mM). Este decréscimo na quantidade de amônio pode estar relacionado a vários parâmetros, dentre os quais destaca-se a menor ciclagem da matéria orgânica em tal área, possivelmente devido as limitações impostas pela contaminação do óleo, como uma menor oxigenação do sedimentos promovida pela menor densidade de plantas. Assim sendo, em tal ambiente a matéria orgânica se torna mais recalcitrante e pode levar a uma diminuição na quantidade de compostos minerais disponíveis.

A presença de enxofre também deve ser considerada nestas áreas. Porcentagens de 31, 34 e 23% (Tabela 2.2) foram observados para BrMgv01, BrMgv02 e BrMgv03 respectivamente. Assim, os efeitos do enxofre para processo anammox deve ser considerados, principalmente em BrMgv02, que apresentou a maior porcentagem deste elemento, juntamente com as menores taxas para ambos os processos. Autores sugerem que a ocorrência da via anammox pode ser limitada pela ocorrência de matéria orgânica com alto teor de sulfeto (LYIMO et al., 2002; KUYBERS et al., 2006). Autores sugerem ainda, que em sedimentos, o sulfeto pode desempenhar inibição irreversível também na oxidação aeróbia do amônio (JOYE; HOLLIBAUGH, 1995; DOLLHOPF et al., 2005). Assim, na ausência de oxigênio livre, bactérias redutoras de sulfato podem produzir sulfeto de hidrogênio, o qual é

difundido na água e no solo, e pode inibir outras reações biogeoquímicas (ZOBELL; MORITA, 1959).

O segundo experimento foi realizado a fim de quantificar a ocorrência da via DNRA, com base num método que quantifica o consumo de compostos de durante NO_x^- o mesmo período de incubação. A redução dissimilatória de nitrato a amônio é uma via microbiana anaeróbica, que (sugere-se) ocorre em ambientes altamente redutores, o que permite manter o metabolismo anaeróbico sustentado, como ocorre em ambientes inundados (TIEDJE, 1988). Assim, a via DNRA foi tida como ausente da maioria das representações do ciclo biogeoquímico terrestre (SCHLESINGER, 1997).

Neste trabalho, que as leituras iniciais para determinação de NO_x^- (98,86 partes por bilhão (ppb) para BrMgv01, 89,87 ppb para BrMgv02 e 118,39 ppb para BrMgv03) foram consideradas 100% de NO_x^- inicial, e as leituras nos tempos seguintes foram calculadas quanto a porcentagem de consumo. Adicionalmente, foi realizado o cálculo para o valor médio de consumo NO_x^- e, os resultados indicam que a área BrMgv03 apresentou o maior consumo de NO_x^- , $-13,24 \text{ nmol NO}_x^- \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, ou cerca 63,63% de consumo. Para BrMgv02, o consumo observado foi $-9,76 \text{ nmol NO}_x^- \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, ou 47,67% de consumo. Ainda, para BrMgv02, a menor taxa de consumo bruto foi observada, $-8,36 \text{ nmol NO}_x^- \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, ou 39,53%, de consumo. Estes resultados indicam que o consumo mais importante de NO_x foi observado para a área BrMgv03, seguido por BrMgv01 e, por último, BrMgv02.

Figura 2.9 - **a.** Média do consumo NO_x^- (NO_3^- NO_2^-), pra cada hora de incubação, determinado para as três áreas de manguezal. Os valores médios calculados para o consumo NO_x^- foram: $-9,76 \text{ nmol NO}_x^- \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ BrMgv01; $-8,76 \text{ nmol NO}_x^- \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ BrMgv02; e $-13,24 \text{ nmol NO}_x^- \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ BrMgv03. **b.** Porcentagem do consumo NO_x^- (NO_3^- NO_2^-), determinada para as três áreas de manguezal.

Em sistemas de manguezais, estima-se que 55% da perda de nitrogênio (nas formas de NO, N₂O ou N₂) podem ocorrer por meio da desnitrificação (CHIU et al., 2004). Contudo, a via anammox pode representar até 67% da remoção do nitrogênio em sedimentos marinhos, utilizando diretamente NH₄⁺ e NO₂⁻ sob condições anaeróbicas (THAMDRUP; DALSGAARD, 2002). Embora a desnitrificação apresente papel significativo na ecologia das áreas com sedimentos, atenuando o excesso de nitrato do sistema, não se pode excluir o fato que a produção de N₂ total em ecossistemas de manguezal seja reflexo de um processo de co-ocorrência das vias anammox e desnitrificação (FERNANDES et al., 2011).

Durante muito tempo o nitrito NO₂⁻ e não nitrato NO₃⁻ foi tipo como substrato necessário para a ocorrência do processo de oxidação anaeróbica do amônio (DALSGAARD et al., 2003; RISGAARD-PETERSEN et al., THAMDRUP; DALSGAARD, 2002; TRIMMER et al., 2003). Porém, pesquisas recentes sugerem que algumas bactérias anammox cultivadas em biorreatores podem transformar NO₃⁻ em NO₂⁻ quando cotam com doadores de elétrons apropriados (GUVEN et al., 2005). Ainda assim, bactérias marinhas anammox, em contraste com suas concorrentes bactérias desnitrificantes, parecem exigir um fornecimento contínuo de NO_x⁻ (NO₃⁻ e NO₂⁻) para manter seu aparato enzimático ativo (RISGAARD-PETERSEN et al., 2005). Desta forma, visto que é considerado que o amônio NH₄⁺ raramente é limitante nos sedimentos, a disponibilidade de NO₂⁻ estaria sendo o maior controlador da ocorrência da via e da abundância de bactérias anammox ativas (MEYER et al., 2005). Assume-se, ainda, que a atividade e a abundância destas bactérias anammox estão fortemente relacionadas a atividade de outros grupos bacterianos, uma vez que o nitrito é produzido como intermediário em ambas vias nitrificação e desnitrificação (MEYER et al., 2005). Com base neste contínuo avanço no conhecimento do processo de anammox, pode-se sugerir que outros organismos além dos grupos descritos estejam relacionados a esta transformação. Desta forma, explorar a diversidade de *Planctomycetes* em amostras de ambientes pouco estudados torna-se interessante, na possível descrição de novos grupos bacterianos capazes de promover tal transformação.

De maneira geral, os resultados deste capítulo indicam a grande importância da desnitrificação no processamento de nitrogênio nos sedimentos de manguezais, e indicam a possível ocorrência do processo de anammox. Em relação ao processo de DNRA, outras abordagens serão necessárias para verificar a sua ocorrência preferencial em detrimento dos outros dois processos, e na busca dos genes relacionados a sua base genética de ocorrência.

2.4 Conclusões do capítulo

Os conjuntos de dados metagenômicos e metatranscripômicos indicaram a presença e a expressão de genes relacionados às vias desnitrificação, anammox e DNRA nas áreas estudadas. Há uma clara relação entre estes resultados e os obtidos a partir das incubações, por exemplo, na área BrMgv02 observa-se tanto uma menor abundância de genes envolvidos na via desnitrificação, como a menor taxa para este tipo de transformação do nitrogênio.

Apesar da maior taxa do processo anammox ter sido obtida na área BrMgv01, há pouca diferença entre esta taxa e a encontrada na área BrMgv03. Os dados metagenômicos e metatranscriptômicos para a área BrMgv03 revelam de forma mais explícita a ocorrência dos genes relacionados a esta via. Na análise metagenômica, o número de genes envolvidos via anammox obteve afiliação primordial ao filo *Planctomycetes*. Nesta área também foi detectado um número expressivo de sequências afiliadas ao gene *hao* nos dados de metatranscriptoma.

O presente estudo revelou que a desnitrificação é a via mais ativa na transformação do nitrato/nitrito nos sedimentos dos manguezais de Bertioga. Adicionalmente, os resultados indicam a possível ocorrência da via anammox, embora não tão intensa. As duas transformações tiveram suas taxas altamente afetadas pela presença de contaminantes, sendo suprimidas na área afetada pelo petróleo (BrMgv02).

O consumo NO_x^- , relacionado com a atividade DNRA, revelou uma linha semelhante à observada para as taxas obtidas para desnitrificação e anammox, onde o manguezal BrMgv03 apresentou o maior consumo, e o BrMgv02 o menor. No início desta análise, observou-se a maior disponibilidade de NO_x^- para a área BrMgv02, indicando que nestes locais o nitrato e nitrito estariam sendo consumidos com maior dificuldade, provavelmente por todas as vias consideradas neste trabalho. A possível via DNRA parece estar ocorrendo de maneira a responder a contaminação por petróleo presente nestes locais, uma vez que o maior consumo NO_x^- foi observado para a área com menor contaminação (BrMgv03), e o menor consumo foi observado para a área mais afetada por este contaminante (BrMgv02).

Referências

AMANO, T.; YOSHINAGA, I.; YAMAGISHI, T.; VAN THUOC, C.; THE THU, P.; UEDA, S.; KATO, K.; SAKO, Y.; SUWA, Y. Contribution of anammox bacteria to benthic nitrogen cycling in a mangrove forest and shrimp ponds (Haiphong, Vietnam). **Microbes and Environments**, Tagajo, v. 26, p. 1-6, 2011.

ANDREOTE, F.D.; JIMÉNEZ, D.J.; CHAVEZ, D.; DIAS, A.C.F.; LUVIZOTTO, D.M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELLA, C.C.; LOPEZ, M.V.; BAENA, S.; TAKETANI, R.G.; MELO, I.S. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **Plos One**, Oxford, v. 7, n. 6, p. e38600, 2012.

BERGMANN, D.J.; HOOPER, A.H.; M. KLOTZ. Structure and sequence conservation of genes in the hao cluster of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria: evidence for their evolutionary history. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 9, p. 5371-82, 2005.

BONIN, P. Anaerobic nitrate reduction to ammonium in two strains isolated from coastal marine sediment: a dissimilatory pathway. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 19, p. 27–38, 1996.

BRANDSMA, J.; VAN DE VOSSENBERG, J.; DISGAARD-PETERSEN, N.; SCHMID, M.C.; ENGSTROM, P.; EURENIUS, K.; HULTH, S.; JAESCHKE, A. ABBAS, B.; HOPMANS, E.C.; STROUS, M.; SCHOUTEN, S.; JETTEN, M.S.M.; SINNINGHE DAMSTÉ, J.S. A multi proxy study for anaerobic ammonium oxidation in marine sediments of the Gullmar Fjord, Sweden. **Environmental Microbiology Reports**, London, v. 3, p. 360-366, 2011.

BRETTAR, I.; MOORE, E.R.B.; HOSFLE, M.G. Phylogeny and abundance of novel denitrifying bacteria from the water column of the central Baltic Sea. **Microbial Ecology**, New York, v. 42, p. 295-305, 2001.

CARVALHO, M.C.C.G.; SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 735-744, 2010.

CHIU, C.Y.; LEE, S.C.; CHEN, T.H.; TIAN, G. Denitrification associated N loss in mangrove soil. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Cham, v. 69, p. 185-189, 2004.

CHON, K.; CHANG, J.; LEE, E.; LEE, J.; RYU, J.; CHO, J. Abundance of denitrifying genes coding for nitrate (*narG*), nitrite (*nirS*), and nitrous oxide (*nosZ*) reductases in estuarine versus wastewater effluent-fed constructed wetlands, **Ecological Engineering**, Oxford, v. 37, p. 64–96, 2009.

CROMPTON, T.R. **Analysis of seawater: a guide for the analytical and environmental chemist**. New York: Springer- Verlag, 2005. 456 p.

DALSGAARD, T.; CANFIELD, D.E.; PETERSEN, J.; THAMDRUP, B.; ACUÑA-GONZÁLEZ, J. N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. **Nature**, London, v. 422, p. 606-608, 2003.

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**, Landsberg, v. 11, p. 1466-1476, 2011.

DOLLHOPF, S.L.; HYUN, J.H.; SMITH, A.C.; ADAMS, H.J.; O'BRIEN, S.; KOSTKA, J.E. Quantification of ammonium-oxidizing bacteria and factors controlling nitrification in salt

marsh sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 240–246, 2005.

DONG, L.F.; SMITH, C.J.; PAPASPYROU, S.; STOTT, A.; OSBORN, A.M.; NEDWELL, D.B: Changes in benthic denitrification, nitrate ammonification, and anammox process rates and nitrate and nitrite reductase gene abundances along an estuarine nutrient gradient (the Clone Estuary, United Kingdom). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 3171–3179, 2009.

DUKE, N.C.; MEYNECKE, J.O.; DITTMANN, S. A world without mangroves? **Science**, Washington, v. 317, p. 41–42, 2007.

EDGARD, R.C. UCLUST: Extreme high-speed clustering, alignment and database search.. v. 1, 579 p., 2010. Disponível em:
http://www.drive5.com/uclust/uclust_userguide_1_1_579.html - Acesso em: 15/06/2011.

FERNANDES, S.O.; LOKA-BHARATHI; P.A. Nitrate levels modulate denitrification activity in tropical mangrove sediments (Goa, India). **Environmental Monitoring and Assessment**, New York, v. 173, p. 117–125, 2011.

FERREIRA, T.O.; OTERO, X.L.; SOUZA JR, V.S.; VIDAL-TORRADO, P.; MACÍAS, F.; FIRME, L.P. Spatial patterns of soil attributes and components in a mangrove system in Southeast Brazil (São Paulo). **Journal of Soil and Sediments**, Landsberg, v. 10, p. 995–1006, 2010.

FRANCIS, C.A.; BEMAN, J.M.; KUYPERS, M.M. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. **The ISME Journal**, New York, v. 1, p. 19–27, 2007.

FRIAS-LOPEZ, J.; SHI, Y.; TYSON, G.W.; 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 Sciences of the USA**, Washington, v. 105, p. 3805–3810, 2008.

GHOSH, A.; DEY, N.; BERA, A.; TIWARI, A.; SATHYANIRANJAN, K.B. CHAKRABARTI, K.; CHATTOPADHYAY, D. Culture independent molecular analysis of bacterial communities in the mangrove sediment of Sundarban, India. **Saline Systems**, London, v. 6, p. 1–11, 2010.

GILBERT, J.A.; FIELD, D.; HUANG, Y.; EDWARDS, R.; LI, W. et al., Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities. **PLoS One**, Oxford, v. 3, p. e3042, 2008.

GLOCKNER, A.; JUNGST, A.; ZUMFT, W. Copper containing nitrite reductases from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in mutationally cytochrome cd1-free background (NirS[−]) of *Pseudomonas stutzeri*, **Archives in Microbiology**, Cham, v. 160, p. 2136–2141, 1993.

GUVEN, D.; DAPENA, A.; KARTAL, B.; SCHMID, M.C.; MAAS, B.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.; SOZEN, S.; MENDEZ, R.; OP DEN CAMP, H.J.M.; JETTEN, M.S.M.;

- STROUS, M.; SCHMIDT, I. Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1066–1071, 2005.
- HANSEN, J.W.; THAMDRUP, B.; JØRGENSEN, B.B. Anoxic incubation of sediment in gas-tight plastic bags: A KALLMEYER; FERDELMAN, T.G.; WEBER, A.; FOSSING, H.; JØRGENSEN, B.B. Sulfate reduction cold Cr-II method for biogeochemical process studies. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf, v. 208, p. 273-282, 2000.
- HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, P. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 33, p. 265-278, 2001.
- JETTEN, M.S.; VAN NIFTRIK L.; STROUS, M.; KARTAL, B.; KELTJENS, J.T.; OP DEN CAMP, H.J.M. Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Madison, v. 44, p. 65–84, 2009.
- JONES, C.M.; STRES, B.; ROSENQUIST, M.; HALLIN, S. Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 25, p. 1955–1966, 2008.
- JOYE, S.B.; HOLLIBAUGH, J.T. Sulfide inhibition of nitrification influences nitrogen regeneration in sediments. **Science**, Washington, v. 270, p. 623–625, 1995.
- KANEHISA, M.; GOTO, S.; KAWASHIMA, S.; OKUNO, Y.; HATTORI, M. The KEGG resource for deciphering the genome. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, p. D277–D280, 2004.
- KARTAL B.; MAALCKE, W.J.; DE ALMEIDA, N.M.; CIRPUS, I.; GLOERICH, J.; GEERTS, W.; DEN CAMP, H.J.M.O.; HARHANGI, H.R.; JANSSEN-MEGENS, E.M.; FRANCOIS, K.; STUNNENBERG, H.G.; KELTJENS, J.T., JETTEN; M.S.M., STROUS, M. Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. **Nature**, London, v. 429, n. 7371, p. 127-130, 2011.
- KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B.L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. **Advances in Marine Biology**, Oxford, v. 40, p. 81-251, 2001
- KRAFT, B.; STROUS, M.; TEGETMEYER, H.E. Microbial nitrate respiration: genes, enzymes and environmental distribution. **Journal of Biotechnology**, Oxford, v. 155, n.1, p. 104-117, 2010.
- KUENEN, J.G. *Anammox* bacteria: from discovery to application. **Nature Reviews in Microbiology**, London, v. 6, p. 320-326, 2008.
- KUYPERS, M.M.M.; LAVIK, G.; THAMDRUP, B. Anaerobic ammonium oxidation in the marine environment. In: NERETIN, L.N. (Ed.). **Past and present marine water column anoxia**. Berlin: Springer, 2006. p. 311-366.
- LIDE, D.R. (Ed.). **CRC handbook of chemistry and physics**. 7th ed. Boca Raton: CRC Press, 1997. 2336 p.

LIMA, D.V. **Análise da diversidade, abundância e estrutura funcional da comunidade microbiana de três manguezais do Estado de São Paulo, Brasil.** São Paulo: USP, Instituto de Ciências Biomédicas, 2012. 210 p.

LIN, Y.T.; SHIEH, W.Y. *Zobellella denitrificans* gen. nov., sp. nov. and *Zobellella taiwanensis* sp. nov., denitrifying bacteria capable of fermentative metabolism. **International Journal for Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 1209–1215, 2006.

LYIMO, T.J.; POL, A.; OP DEN CAMP, H.J. Sulfate reduction and methanogenesis in sediments of Mtoni mangrove forest, Tanzania. **Ambio**, Cambridge, v. 31, p. 614–616, 2002.

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

MEYER, R.L.; RISGAARD-PETERSEN, N.; ALLEN, D.E. Correlation between anammox activity and microscale distribution of nitrite in a subtropical mangrove sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 6142–6149, 2005.

MITRA, S.; RUPEK, P.; RICHTER, D.C.; URICH, T.; GILBERT, J.A.; MEYER, F.; WILKE, A.; HUSON, D.H. Functional analysis of metagenomes and metatranscriptomes using SEED and KEGG. **BMC Bioinformatics**, Colorado, v. 12, p. 2-8, 2011.

MOHAN, S.B.; COLE, J.A. The dissimilatory reduction of nitrate to ammonia by anaerobic bacteria. In: BOTHE, H.; FERGUSON, S.; NEWTON, W.E. (Ed.). **Biology of the nitrogen cycle**. Amsterdam: Elsevier, 2004. p. 93–106.

NIJBURG, J.W.; COOLEN, M.J.L.; GERARDS, S.; KLEIN GUNNEWIEK, P.J.A.; LAANBROEK H.J. Effects of nitrate availability and the presence of *Glyceria maxima* on the composition and activity of the dissimilatory nitratereducing bacteria community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 931–937, 1997.

OVERBEEK, R.; BEGLEY, T.; BUTLER, R.M.; CHOUDHURI, J.V.; CHUANG, H.Y.; COHOON, M.; CRÉCY-LAGARD, V.; DIAZ, N.; DISZ, T.; EDWARDS, R.; FONSTEIN, M.; FRANK, E.D.; GERDER, S.; GLASS, E.M.; GOESMANN, A.; HANSON, A.; REUYL, D.I.; JENSEN, R.; JAMSHIDI, N.; KRAUSE, L.; KUBAL, M.; LARSEN, N.; LINKE, B.; McHARDY, A.C.; MEYER, F.; NEUWEGER, H.; OLSEN, G.; OLSON, R.; OSTERMAN, A.; PORTNOY, V.; PUSCH, G.D.; RODIONOV, D.A.; RUCKERT, C.; STEINER, J.; STEVENS, R.; THIELE, I.; VASSIEVA, O.; YE, Y.; ZAGNITKO, O.; VONSTEIN, V. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, n. 17, p. 5691-5702, 2005.

POLCYN, W.; PODESZWA, J.: Coordinate induction of dissimilatory ammonification and fermentative pathways in rhizobia. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 96, p. 79–87, 2009.

QUAN, Z.X.; RHEE, S.K.; ZUO, J.E.; YANG, Y.; BAE, J.W.; PARK, J.R.; LEE, S.T.; PARK, Y.H. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic

ammonium-oxidizing (anammox) reactor. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 10, p. 3130–3139, 2008.

REYNA, L.; WUNDERLIN, D.A.; GENTI-RAIMONDI, S. Identification and quantification of a novel nitrate-reducing community in sediments of Suquia River basin along a nitrate gradient, **Environmental Pollution**, Oxford, v. 158, p. 1608–1614, 2010.

RISGAARD-PETERSEN, N.; MEYER, R.L.; REVSBECH, N.P. Denitrification and anaerobic ammonium oxidation in sediments: effects of microphytobenthos and NO₃-. **Aquatic Microbial Ecology**, Berlin, v. 40, p. 67-76, 2005.

RISGAARD-PETERSEN, N.; NIELSEN, L.P.; RYSGAARD, S.; DALSGAARD, T.; MEYER, R.L. Application of the isotope pairing technique in sediments where anammox and denitrification coexist. **Limnology and Oceanography Methods**, Waco, v. 1, p. 63–73, 2003.

RIVERA-MONROY, V.H.; TWILLEY, R.R. The relative role of denitrification and immobilization in the fate of inorganic nitrogen in mangrove sediments (Términos Lagoon, Mexico). **Limnology and Oceanography Methods**, Waco, v. 41, p. 284–296. 1996.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G. Brazilian mangroves: a historical ecology. **Jornal Ciência e Cultura**, Campinas, v. 51, p. 274-286, 1999.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; SOARES, M.L.; De-ROSA, M.T. Brazilian mangroves. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, Ontario, v. 3, p. 561-570, 2000.

SCHLESINGER, W.H. **Biogeochemistry**: an analysis of global change. San Diego: Academic Press, 1997. 588 p.

SCHMID, M.; TWACHTMANN, U.; KLEIN, M.; STROUS, M.; JURETSCHKO, S.; JETTEN, M.; METZGER, J.W.; SCHLEIFER, K.H. WAGNER, M. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. **Systematic and Applied Microbiology**, Oxford, v. 23, p. 93–106, 2000.

SCHMID, M.; WALSH, K.; WEBB R.I.; RIJPSTRA, W.I.C.; VAN DE PASSCHOONEN, K.T.; VERBRUGGEN, M.J.; HILL, T.; MOFFERT, B.; FUERST, J.A.; SCHOUTEN, S.; SINNINGHE DAMSTÉ, J.S.; HARRIS, J.; SHAW, P.; JETTEN, M.S.M.; STROUS, M. *Candidatus* “Scalindua brodae”, sp. Nov.; *Candidatus* “Scalindua wagneri”, sp. Nov.; two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, p. 529-538, 2003.

SHIMAMURA, M.; NISHIYAMA, T.; SHIGETOMO, H.; TOYOMOTO, T.; KAWAHARA, Y.; FURUKAWA, K.; FUJII, T. Isolation of a multiheme protein with features of a hydrazine-oxidizing enzyme from an anaerobic ammonium-oxidizing enrichment culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 1065–1072, 2007.

SOLÓRZANO, L. Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. **Limnology and Oceanography Methods**, Waco, v. 14, p. 799–801, 1969.

STROUS, M.; JETTEN, M.S.M. Anaerobic oxidation of methane and ammonium. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 58, p. 99–117, 2004.

STROUS, M.; PELLETIER, E.; MANGENOT, S. Deciphering the evolution and metabolism of an *anammox* bacterium from a community genome. **Nature**, London, v. 440, p. 790-794, 2006.

STROUS, M.; FUERST, J.A.; KRAMER, E.H.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.T.; WEBB, R.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. Missing lithotroph identified as new planctomycete. **Nature**, London, v. 40, p. 446-449, 1999.

THAMDRUP, B.; DALSGAARD, T. Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1312–1318, 2002.

THROBÄCK, I.N.; ENWALL, K.; JARVIS, A.; HALLIN, S. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 49, p. 401–417, 2004.

TIEDJE, J.M. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In ZEHNDER, A.J.B. (Ed.). **Biology of anaerobic microorganisms**. New York: John Wiley, 1988. p. 179-244.

TIEDJE, J.M.; SEXSTONE, A.J.; MYROLD, D.D.; ROBINSON, J.A. Denitrification – ecological niches, competition and survival. **Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology**, Wageningen, v. 48, p. 569–583, 1982.

TRIMMER, M.; NICHOLLS, J.C.; DEFLANDRE, B. Anaerobic ammonium oxidation measured in sediments along the Thames estuary, United Kingdom. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 6447-6454, 2003.

TRIVELIN, P.C.O.; RODRIGUÊS, J.C S.; VICTÓRIA, R.L. Utilização por soqueira de cana-de-açúcar de início de safra do nitrogênio da aquamônia-¹⁵N aplicado ao solo em complemento à vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 89-99, 1996.

TRIVELIN, P.C.O.; BENDASSOLLI, J.A.; CARNEIRO JUNIOR, F.; MUROAKA, T. Sulfur utilization by rice and crotalaria juncea from sulfate 34S applied to the soil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, p. 205-207, 2002.

URICH, T.; LANZEN, A.; QI, J.; HUSON, D.H.; SCHLEPER, C.; SCHUTER, S.C. Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the meta-transcriptome. **PLoS One**, Oxford, v. 3, n. 6, p. e2527, 2008.

VAN DE GRAAF, A.A.; MULDER, A.; DE BRUIJN, P.; JETTEN, M.S.M.; ROBERSTON, L.A.; KUENEN, J.G. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. **and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1246–1251, 1995.

VAN DE VOSSENBERG, J.; WOEBKEN, D.; MAALCKE, W.J.; WESSELS, H.J.; DUTILH, B.E.; KARTAL, B.; JANSSEN-MEGENS, E.M.; ROESELERS, G.; YAN, J.; SPETH, D.; GLOERICH, J.; GEERTS, W.; VAN DER BIEZEN, E.; PLUK, W.;

FRANCOIS, K.J.; RUSS, L.; LAM, P.; Malfatti, S.A.; TRINGE, S.G.; HAAJER, S.C.; OP DEN CAMP, H.J.; STUNNENBERG, H.G.; AMANN, R.; KUYPERS, M.M.; JETTEN, M.S.M. The metagenome of the marine anammox bacterium '*Candidatus Scalindua profunda*' illustrates the versatility of this globally important nitrogen cycle bacterium. **Environmental Microbiology**, Washington, e22568606, 2012. online:doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02774.x

ZOBELL, C.E.; MORITA, R.Y. Deep-sea bacteria. **Galathea Report**, Copenhagen, v. 1, p. 139-154, 1959.

3 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE *Planctomycetes* EM SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS

Resumo

Bactérias pertencentes ao filo *Planctomycetes* são ainda pouco estudadas, apresentam difícil cultivo devido ao seu crescimento lento e/ou dependente da interação com outros micro-organismos. Dentro desse grupo são encontrados micro-organismos pertencentes a gêneros descritos como capazes de realizar a oxidação anaeróbica de amônio (anammox), uma importante transformação do nitrogênio em ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio, como os sedimentos de manguezais. Ainda, este grupo aloca outros gêneros cultiváveis, não relacionados com o processo anammox. Muitos questionamentos envolvem este filo, tais como o modo de detecção destas bactérias, sua ocorrência, e a diferenciação que as torna capazes de promover o processo anammox nos diferentes ambientes. Para um maior entendimento sobre os organismos deste grupo presentes nos sedimentos de manguezais, as análises independentes de cultivo representam uma poderosa ferramenta, oferecendo informações por meio do sequenciamento de genes marcadores (16S DNAr) ou por meio da visualização *in situ* dos grupos alvo. Nesta etapa do trabalho, buscou-se a análise de sequências, obtidas por pirosequenciamento do gene 16S RNAr relacionadas ao filo *Planctomycetes*, bem como a detecção destes organismos por meio da técnica FISH, a partir de amostras de sedimento de manguezais da cidade de Bertioga (Estado de São Paulo). Foi possível observar, de acordo com a filogenia, que há uma tendência de agrupamento das sequências com *Planctomycetes* não relacionados com o processo anammox. Por meio da técnica FISH, pode-se confirmar a detecção de tais organismos, bem como visualizar a sua baixa frequência na comunidade. Assim, pode-se inferir que os *Planctomycetes* encontrados nos sedimentos de manguezais podem, além de participar das transformações do nitrogênio, estar envolvidos em outros processos, como por exemplo, a degradação de compostos orgânicos, ou derivados da contaminação presente na área BrMgv02. Este foi o primeiro estudo detalhado sobre este grupo bacteriano em sedimentos de manguezais, comprovando sua ocorrência, e relacionando sua frequência com variáveis ambientais.

Palavras-chave: Anammox; Pirosequenciamento; FISH

Abstract

Bacteria belonging to *Planctomycetes* phylum are still poorly studied, they have difficult cultivation due to its slow growth and/or dependent on the interaction with other micro-organisms. Within this group are found microorganisms described as able to perform anaerobic ammonium oxidation (anammox), a major transformation of nitrogen in environments with low oxygen availability, as sediment from mangroves. Still, this group allocates cultivable other genera, not related to the anammox process. Many questions surround this phylum, such as the mode of detection of these bacteria, their occurrence, and differentiation that makes them capable of promoting anammox process in different environments. For a better understanding of this organisms group present in mangroves sediments, growing independent analyzes represent a powerful tool, providing information through the sequencing of marker genes (16S rDNA) or through *in situ* visualization of the

target groups. At this stage, we analyzed sequences obtained by 16S rRNA pyrosequencing related to the Planctomycetes phylum, as well as the detection of these organisms by FISH technique, from mangrove sediment samples from the city of Bertioga (São Paulo State). It was observed, according to the phylogeny, that there is a tendency for sequences clustering with unrelated anammox-planctomycetes. By FISH technique, we can confirm the detection of such organisms, as well as view their low frequency in the community. Thus, it can be inferred that Planctomycetes found in sediments mangrove may, besides participating in nitrogen transformation, it can be involved in other processes such as the degradation of organic compounds, derivatives of contamination present in the BrMgv02. This was the first detailed study of this bacterial group in mangrove sediments, proving its occurrence, its frequency, and relating to environmental variables.

Keywords: Anammox; Pyrosequencing; FISH

3.1 Introdução

Embora a primeira observação microscópica de um planctomycete tenha ocorrido em 1924, quando eram chamados de ‘planktonic-mycetes’, um organismo deste filo só foi obtido em cultura pura em 1973 (STALEY, 1973). Até 1997, estas bactérias consideradas como ‘litotróficas perdidas na natureza’ e, a partir de 1999, com o reconhecimento dos Planctomycetes como responsáveis por este processo anammox (oxidação anaeróbica de amônia), as discussões sobre a divisão deste grupo tem se alterado frequentemente (STROUS et al., 1999).

Atualmente, estes organismos tem sido detectados, principalmente, em água marinha (DeLONG et al., 1993; VERGIN et al., 1998), em sedimentos de sistemas marinhos (LLOBET-BROSSA et al., 1998; RUSCH et al., 2003; MUSAT et al., 2006), e em colunas d’água e sedimentos de água doce (NEEF et al., 1998; MISKIN et al., 1999; KALYUZHNYAYA et al., 2004, 2005). No Brasil, uma espécie resistente ao NaCl foi encontrada na Lagoa Vermelha (lagoa hipersalina), no Rio de Janeiro (SCHLESNER, 1989).

Apesar do recente isolamento de um membro deste grupo, este filo continua a ser considerado o menos representado em coleções de culturas microbianas (WINKELMANN; HARDER, 2009). Até o momento, o filo *Planctomycetes* é composto de duas classes: *Planctomycetacia* e *Phycisphaerae*. A classe *Planctomycetacia* está organizada em uma ordem (*Planctomycetales*) e uma família (*Planctomycetaceae*), com nove gêneros aceitos (*Planctomyces*, *Pirellula*, *Blastopirellula*, *Rhodopirellula*, *Gemmata*, *Isosphaera*, *Singulisphaera*, *Schlesneria*, *Zavarzinella*) (SCHLESNER et al., 2004; WARD et al., 2006; KULICHEVSKAYA et al., 2008, 2009). A classe *Planctomycetacia* também está constituída

de cinco gêneros candidatos (*Candidatus* Kuenenia, *Candidatus* Brocadia, *Candidatus* Scalindua, *Candidatus* Anammoxoglobus, *Candidatus* Jettenia) (KARTAL et al., 2007; KRIEG et al., 2010; HU et al., 2010) sendo estes últimos relacionados a ocorrência da via anammox. A classe *Phycisphaerae* é a mais recente aceita em *Planctomycetes*, e está composta somente pela espécie, *Phycisphaera mikurensis*, isolada de uma alga marinha *Porphyra* sp. (FUKUNAGA et al., 2009).

Este grupo está alocado no superfilo PCV (*Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*), um clado monofilético que tem sido frequentemente discutido como originado entre *Eukarya* e *Bacteria*, devido as suas características que as diferenciam das outras bactérias (FORTERRE, 2011). Entre estas características, destacam-se a ausência de peptidoglicano e proteínas em suas paredes celulares, resistência a muitos antibióticos (FUERST; SAGULENKO, 2011); crescimento lento e/ou dependente da interação com outros micro-organismos (SLIEKERS et al., 2003); além da presença de um compartimento membranóide denominado anammoxosome, formado por lipídeos laderanos (SINNINGHE-DAMSTÈ et al., 2002).

Há ainda muitos questionamentos sobre o funcionamento do processo anammox, principalmente sobre como detectar este processo e estas bactérias, e em quais ecossistemas estão presentes. Contudo, acredita-se que a biodiversidade das bactérias anammox pode aumentar à medida que se realizam estudos voltados a estas bactérias em novos ambientes (JETTEN et al., 2005; STROUS et al., 1999). Neste sentido, a aplicação de técnicas baseadas na detecção e análise de ácidos nucleicos presentes em amostras ambientais é fundamental nos estudos de diversidade microbiana, principalmente por ocorrer de maneira independente do cultivo (RANJARD et al., 2000), como na técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH), que vem sendo utilizada com sucesso para a rápida identificação de bactérias, visualizadas diretamente nas amostras (AMANN et al., 1995; WAGNER et al., 1993).

A técnica de FISH se baseia no estudo de sequências de genes como o 16S RNAr (LINDREA et al., 1999), onde sondas sintetizadas são capazes de hibridizar com células bacterianas formando ligações estáveis (híbridos via pontes de hidrogênio entre nucleotídeos complementares). Se não existir complementaridade entre a sequência de oligonucleotídeos da sonda e a região 16S RNAr do ribossomo, não ocorre hibridização estável e os oligonucleotídeos são lavados da amostra (LINDREA et al., 1999). A técnica marca as células a partir de sondas que possuem uma molécula de corante único fluorescente ligado a região 5'. Os corantes mais frequentemente utilizados são: fluoresceína (Fluos), tetrametilrodamina,

texas red, Cy3, Cy5 e Cy7 (AMANN et al., 1995). Devido à sua relativa estabilidade, o fluorocromo Cy3 tornou-se o marcador mais usual, melhorando as gamas de detecção de FISH em amostras ambientais (GLÖCKNER et al., 1996). Assim, com esta identificação e quantificação, em combinação com outras técnicas, promove a caracterização de populações microbianas em ambientes complexos (AMANN, et al., 1995; WAGNER et al., 1993), com populações microbianas mistas, ou de microrganismos não cultiváveis, como os sedimentos de manguezais (CLEARY et al., 2012).

No presente trabalho, esta técnica permitiu a confirmação de dados obtidos por pirosequenciamento de DNA ambiental, auxiliando na visualização das bactérias relacionadas ao grupo *Planctomycetes in situ* nas amostras analisadas. Neste sentido, tais organismos foram selecionados por representarem um importante grupo de bactérias com grande potencial de atividade nos ciclo biogeoquímicos em manguezais. O objetivo deste capítulo consiste na detecção e análise de organismos afiliados a *Planctomycetes* por meio de análises de sequências destes organismos obtidas por pirosequenciamento e pela técnica de hibridização fluorescente *in situ*, obtidas a partir de amostras de sedimento de manguezais do Estado de São Paulo.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Seleção de sequências afiliadas à *Planctomycetes*

Resumidamente, para o pirosequenciamento do gene 16S RNAr de bactérias, foi realizada uma reação de amplificação a partir do DNA ambiental extraído de cada área estudada. A amplificação da região V4 (270-300pb) em bactérias foi feita utilizando os *primers* 520F (5' – AYTGGGYDTAAAGNG - 3') e uma mistura de *primers* reversos 820R (5' – TACCRGGGTHCTAATCC - 3', 5' – TACCAGAGTATCTAATTC - 3', 5' – CTACDSRGGTMTCTAATC - 3', e 5' – TACNVGGGTATCTAATCC - 3'); que visou resgatar o maior número de grupos bacterianos possíveis dentro das amostras analisadas, conforme sugerido no site *Ribosomal Data Project* (<http://rdp.cme.msu.edu>). Em tais *primers* foram adicionados adaptadores A e B, conforme o manual do fabricante (equipamento Roche, EUA). Adicionalmente, o *forward primer* utilizado para cada amostra recebeu uma *tag* de identidade composta de 6 a 8 bases, para identificar a origem de cada uma das sequências obtidas.

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em reações de 50 µL, contendo 5,0 µL de tampão 10X (Invitrogen), 3,75 µL de 25mM MgCl₂, 4,0µL de dNTP

2,5mM, 0,6 μL de 5 U μL^{-1} de *Taq* DNA Polimerase recombinante, 0,5 μL de cada um dos quatro primer reversos e 1 μL do primer forward (10 pmoles μL^{-1}) e 1 μL de DNA (aproximadamente 50 ng). A amplificação foi realizada com 3 minutos a 95°C; 30 ciclos de 45 segundos a 95°C, 1 minuto e 45 segundos a 57°C e 1 minuto a 72°C; com extensão final de 4 minutos a 72°C. O produto da PCR de cada uma das amostras foi verificado e quantificado em gel de agarose 1%. Posteriormente os produtos foram enviados para Helixa (Campinas, São Paulo, Brasil), onde foram purificados (beads AMPure-Agencourt), quantificados novamente (Picogreen, Invitrogen) e submetidos ao pirosequenciamento em equipamento GS FLX Titanium series.

Nesta análise foram avaliadas duas repetições de cada uma das áreas; BrMgv01, BrMgv02 e BrMgv03. A análise inicial das sequências foi feita usando o *Pyrosequencing Pipeline* do *Ribosomal Database Project* (<http://pyro.cme.msu.edu>), onde foi feita inicialmente uma triagem inicial, que separou as sequências de cada uma das amostras com base em suas *tags* de identificação. Neste processo as sequências de baixa qualidade foram removidas, os parâmetros utilizados foram os sugeridos pelo site; somente houve alteração no tamanho mínimo das sequências (150pb). As sequências foram alinhadas e agrupadas em *datasets*, que foram submetidos à afiliação taxonômica usando o *RDP Classifier* (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>), *confidence threshold* utilizado: 50%). A partir daí, as sequências afiliadas ao filo Planctomycetes foram extraídas e utilizadas nas análises posteriores.

3.2.2 Separação em UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais)

Um total de 333 sequências foram afiliadas ao grupo *Planctomycetes*, referente as duas repetições de cada manguezal. Estas sequências foram separadas por área de manguezal de origem (considerando as duas repetições para cada manguezal) e submetidas a determinação de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) no programa Mothur (SCHLOSS et al., 2009), com base na similaridade de 97% para a formação dos grupos. Do número total de UTOs obtidas, buscou-se utilizar somente as UTOs com duas ou mais sequências, com o intuito de comparar a distribuição dos grupos mais importantes de sequências, formando a partir destes os diagramas de *Venn*, com objetivo de visualizar a distribuição destas UTOs compartilhadas e exclusivas nos três manguezais.

3.2.3 Análises filogenéticas

As sequências afiliadas ao filo *Planctomycetes*, e alocadas em UTOs contendo mais de cinco sequências foram estudadas detalhadamente em relação a sua filogenia. Para tanto, as sequências representativas de cada UTO foram utilizadas na composição da filogenia. Esta análise realizada pelo software MEGA 5 (KUMAR et al., 2008), onde as UTOs foram comparadas às sequências selecionadas neste estudo: sequências de *planctomycetes* descritos ou não como responsáveis pela via anammox, além de clones destes organismos obtidos em trabalhos com estudo da filogenia deste grupo. Estas sequências foram obtidas nas bases de dados do NCBI e RDP, a partir do número de acesso citado nos artigos consultados (por exemplo: LONGFORD et al., 2007; WOEBKEN et al., 2007; BAE et al., 2010; BORIN et al., 2013). A árvore filogenética foi construída com base no alinhamento realizado pelo *Muscle* (EDGAR, 2004), posteriormente convertido 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 foi determinada pela análise de *bootstrap*, feita com base em 1000 sub-amostragens na matriz de distância. Sequências distantemente relacionadas à *Planctomycetes*, como sequências identificadas como *Escherichia coli*, foram utilizadas como out-group nestas filogenias.

3.2.4 Hibridização fluorescente *in situ* (Fluorescence *in situ* Hybridization FISH)

Para aplicação da técnica de hibridização foi utilizado o protocolo previamente estabelecido *Standard FISH* (MANZ et al., 1992; ALFREIDER et al., 1996; GLÖCKNER, et al., 1996), disponibilizado no banco de dados Silva (<http://www.arb-silva.de>). Resumidamente, esta técnica foi realizada por meio das etapas de: *i*) fixação da amostra fresca para preservação da integridade e diversidade presente na amostra; *ii*) preparação da amostra - otimização e diluições; *iii*) hibridação com as respectivas sondas para detecção das sequências-alvo; *iv*) lavagem para remoção de sondas não-ligadas e excesso de sais; *v*) montagem, visualização e documentação dos resultados (MOTER; GÖBEL, 2000). Além das sondas escolhida para detecção de *Planctomycetes* PLA46 S-P-Planc-0046-a-A-18, NEEF et al., 1998), controles positivos e negativos foram necessários para confirmação dos resultados. Assim sendo, a sonda EUB 338 (S-D-Bact-0338-a-A-18, AMANN et al., 1990) foi utilizada como controle positivo (visualização de bactérias totais) e a sonda NON-EUB (controle negativo; WALLNER et al., 1993) foi utilizada para controlar a ligação não específica da sonda EUB338, onde a não fluorescência deve ser observada (DAIMS et al., 1999; WALLNER et al., 1993). Assim, além da coloração com fluorocromo DAPI (4,6-diamidino-

2-phenilindole) para confirmação da presença de células (coloração do material genético), uma mesma amostra foi visualizada para fluorescência da sonda alvo (marcada fluoróforo cy3) e com sonda para bactérias totais (fluoróforo TRITC - rodamina). As células foram consideradas planctomycetes-positivas quando no mesmo local houve coloração por DAPI e sonda específica PLA46. Por fim, as visualizações foram fotodocumentadas (3.3a-f).

Tabela 3.1 – Descrição das sondas utilizadas

Sonda	Alvo	Sequencia 3' – 5'	Marcação	Referência
Pla46	Planctomycetales	GACTTGCATGCCTAATCC	Cy3	NEEF et al., 1998
EUB338	Maioria das bactérias	GCTGCCTCCCGTAGGAG	FITC Rodamina	AMANN et al., 1990
NON-EUB	Bactérias totais	ACTCCTACGGGAGGCAGC	Cy3	AMANN et al., 1990

As lâminas contendo as amostras hibridizadas foram observadas por microscopia óptica de fluorescência, inicialmente em microscópio Olympus BX40, presente no Laboratório de Microbiologia do Solo ESALQ/USP, com filtros para DAPI, cy3 e rodamina. Posteriormente, as lâminas contendo material de interesse foram observadas em microscópio de fluorescência Zeiss-Axiophot, com filtros para DAPI e Cy3. A captura das imagens foi pelo *software* de captura de imagens Axio Vision Release 4.6.3, aumento de 400x.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Seleção de sequências afiliadas à *Planctomycetes*

A análise com os dados gerados pelo pirosequenciamento do gene 16S RNAr, afiliadas dentro do domínio *Bacteria*, indicaram como principais representantes desta comunidade os filos *Proteobacteria* (média para os três manguezais: 39,67%); *Firmicutes* (17,55%); *Bacteroidetes* (12,34%); *Chloroflexi* (7,15%); e *Acidobacteria* (5,20%). A porcentagem de sequências afiliadas ao filo *Planctomycetes* foram de 0,99%, 2,07% e 0,77% para os manguezais BrMgv01a, BrMgv02a e BrMgv03a, respectivamente; e 1,27%; 1,84 e 1,09% para os manguezais BrMgv01b, BrMgv02b e BrMgv03b, respectivamente,

representando uma média geral de 1,34% (Figura 3.1). Comparando a ocorrência deste grupo nos sedimentos de manguezais com outros tipos de solos, temos que estes ocorrem um dentro da variação observada dentre as amostras já estudadas (0 a 7,8%) (JANSSEN, 2006).

Figura 3.1 - Abundância relativa dos filos bacterianos presentes nos sedimentos de manguezais nas diferentes áreas estudadas. As sequências do gene 16S RNAr foram submetidas a afiliação taxonômica usando a ferramenta *RDP Classifier*. Em destaque, na cor preta, o filo *Planctomycetes*.

Com relação às repetições (*a* e *b* de cada manguezal), pode-se concluir que estas foram bem consistentes, onde apenas foram observadas flutuações na abundância relativa dos grupos, sem alterar o ranqueamento de abundância das áreas estudadas. Em relação à diferenciação entre as áreas de manguezal estudadas, pode-se observar que apesar das diferenças nas frequências observadas para todas as repetições, as duas repetições para BrMgv02 apresentam uma maior porcentagem de afiliação para este grupo.

3.3.2 Separação em UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais)

Um total de 333 sequências foram afiliadas à *Planctomycetes* por meio da ferramenta *RDP Classifier* (42; 107 e 39 sequências para as áreas BrMgv01a, BrMgv02a e BrMgv03a, respectivamente; e 48; 46 e 51 para as áreas BrMgv01b, BrMgv02b e BrMgv03b, respectivamente). A análise conjunta destas sequências resultou na formação de 186 UTOs, com sequências com pelo menos 97% de similaridade.

Das 186 UTOs, buscou-se desconsiderar aquelas que possuíam apenas uma sequência. Assim, as UTOs com duas ou mais sequências totalizaram 56 UTOs, que hospedam 203 sequências (13; 70 e 23 sequências para as áreas BrMgv01a, BrMgv02a e BrMgv03a, respectivamente; e 30; 34 e 33 para as áreas BrMgv01b, BrMgv02b e BrMgv03b, respectivamente). Assim, diagramas de *Venn* foram gerados no início da análise, com 186 UTOs, e o obtido após a eliminação de UTOs com sequências únicas, conforme figura abaixo.

Figura 3.2 - Diagramas de *Venn* construídos a partir da separação dos grupos taxonômicos operacionais (UTOs). **a.** Diagrama de *Venn* contendo todas as UTOs geradas à 97%. **b.** Diagrama de *Venn* contendo somente as UTOs (97%) com 2 ou mais sequências

Foi possível observar que, apesar da diminuição das sequências utilizadas nesta análise, somente as UTOs com sequências únicas para cada manguezal foram eliminadas. Assim, as UTOs que são comuns à um ou mais manguezais não se alteram. Este efeito de diminuição de grupos exclusivos quando se restringe a análise para UTOs contendo maiores números de sequência foi previamente observado para a análise da comunidade de fungos nos

mesmos manguezais (FASANELLA, 2012). Pode-se também observar que a combinação dos manguezais BrMgv01 e BrMgv02, considerados contaminados, apresentam maior número de UTOs em comum, 8 UTOs, quando comparados as outras duas combinações possíveis (BrMgv01-BrMgv03 ou BrMgv02-BrMgv03). Somente uma única UTO foi encontrada para as três áreas. A área BrMgv02 evidenciou maior número de sequencias, como também maior número de UTOs totais (67 UTOs) e UTOs com apenas duas ou mais sequências (18 UTOs). Nesta área ocorreu também o maior numero de sequências exclusivas (49 UTOs), indicando a ocorrência de organismos diferentes daqueles presentes nas demais áreas estudadas. Algo parecido foi descrito anteriormente para o grupo das cianobactérias, que apresentaram uma grande diversidade de UTOs exclusivas nesta mesma área, quando comparada a outros manguezais do Estado de São Paulo (RIGONATO et al., 2012). Isto indica que a contaminação da área BrMgv02 leva a uma alteração da diversidade, o que propicia a detecção de tais grupos, o que não ocorre nas áreas adjacentes.

3.3.3 Análises filogenéticas

As sequências identificadas como *Planctomycetes* e alocadas em UTOs foram estudadas quanto à filogenia. Para tanto, duas filogenias foram obtidas, uma primeira com as 56 UTOs (com duas ou mais sequencias, Anexo A), e uma segunda, onde apenas UTOs com cinco ou mais sequências foram consideradas (11 UTOs, representando 94 sequências). Como as duas filogenias apresentaram a mesma tendência de agrupamento, somente a segunda filogenia é apresentada neste trabalho.

A relação entre as UTOs e as sequências previamente identificadas como *Planctomycetes* indicou que as UTOs tendem a se agrupar com os *Planctomycetes* e planctomycetes-clones não descritos como responsáveis pela via anammox (Figura 3.2). Foi possível observar a formação de dois grandes agrupamentos. No primeiro deles, agrupamento A, 10 UTOs agruparam-se com *Rhodopirellula baltica* e *Rhodopirellula* sp., *Pirellula staleyi* e *Phycisphaera mikurensis*, não descritos como bactérias anammox. Porém outras seis UTOs (representando 60 sequências) não se agruparam de maneira próxima à nenhuma sequência deste agrupamento.

No segundo agrupamento (B) somente as sequências referentes a bactérias anammox, “*Candidatus*”, mantiveram-se no clado. Apenas 1 UTOs (representando 6 sequências) alocou-se de maneira próxima a este grupo. Assim, apesar do grande número de sequências afiliadas

à *Planctomycetes*, (e a maioria das sequências ter sido encontrada para a área BrMgv02), estas sequências não estariam, então, relacionadas a bactérias promotoras da via anammox.

Figura 3.2 – Árvore filogenética realizada para sequências afiliadas à *Planctomycetes*, gene 16S RNAr. A filogenia foi determinada pelo método *Neighbor joining* e a relação entre as sequências foi inferida usando método *muscle*; os dados observados nos ramos indicam valores de *bootstrap* acima de 30%, total de 1000 repetições. Foram utilizadas sequências provenientes de pirosequenciamento separadas em UTOs (97%) com programa *mothur*. As formas indicam: planctomycetes-clones; *Planctomycetes*; planctomycetes-anammox; e raiz. Os círculos indicam: ● BrMgv01; ● BrMgv02 e ● BrMgv03, bem como as porcentagens de sequências representadas destes manguezais em cada UTO

O filo *Planctomycetes* está atualmente dividido entre bactérias cultiváveis, os gêneros *Planctomyces*, *Pirellula*, *Blastopirellula*, *Rhodopirellula*, *Gemmata*, *Isosphaera*, *Singulisphaera*, *Schlesneria*, *Zavarzinella* e *Phycisphaera* (SCHLESNER et al., 2004; WARD et al., 2006; KULICHEVSKAYA et al., 2008; UKUNAGA et al., 2009; KULICHEVSKAYA et al., 2009); e bactérias relacionadas ao processo/via anammox, com cinco gêneros candidatos, *Candidatus Kuenenia*, *Candidatus Brocadia*, *Candidatus Scalindua*, *Candidatus Anammoxoglobus*, *Candidatus Jettenia* (KRIEG et al., 2008). Nos últimos anos, estudos com muitos locais marinhos anóxicos indicaram que o processo anammox é uma parte importante do ciclo do nitrogênio marinho (DALSGAARD et al., 2003; 2005; KUYPERS et al., 2003; 2005; RISGAARD-PETERSEN et al., 2004).

De acordo com Dale et al. (2009), a diversidade e distribuição de bactérias anammox pode diferir entre vários ecossistemas, mostrando a especificidade com o nicho. Os gêneros ‘*Brocadia*’ e ‘*Kuenenia*’ são geralmente encontrados em sistemas artificiais, tais como estações de tratamento de águas residuais, embora alguns relatos já tenham indicado a presença destes gêneros em ecossistemas de água doce e marinhos (AMANNO et al., 2007; NAKAJIMA et al., 2008; ZHANG et al., 2007); o gênero ‘*Scalindua*’ geralmente é dominante em ecossistemas naturais, especialmente em ambientes marinhos (SCHMID et al., 2007; WOEBKEN et al., 2008). Porém, o conhecimento sobre a estrutura da comunidade temporal de bactérias anammox em ecossistemas naturais ainda é limitado, especialmente em ecossistemas naturais com influências antropogênicas (LI et al., 2011).

Os *Planctomycetes* possuem um dos maiores genomas conhecidos para *Bacteria* (9 Mb para *Gemmata obscuriglobus*) (FUERST, 2004). No entanto, sequências de genes específicos 16S RNAr pertencentes a planctomycetes-anammox têm sido historicamente difíceis de recuperar a partir de amostras ambientais (SCHMID et al., 2005; PENTON et al., 2006), provavelmente devido ao seu crescimento lento e/ou baixa abundância nos ambientes estudados. O número de genes que codificam 16S RNAr, operons *rrn*, podem variar de 1 (BORGES; BERGQUIST, 1993) a 14 (MUYZER et al., 1993). Porém, a maioria das bactérias contém entre 2 a 11 cópias do gene rRNA por célula (GOTTLIEB; RUDNER, 1985; SRIVASTAVA; SCHLESSINGER, 1990). De acordo com Pernthaler et al. (2001), a maioria das bactérias dos sistemas aquáticos crescem lentamente e, devido ao seu metabolismo, apresentam baixo número de ribossomos.

Num trabalho anterior envolvendo as mesmas áreas de manguezais estudadas, a abundância encontrada para o filo *Planctomycetes*, por análise metagenômica, evidenciou

porcentagens de 1.2–3.8% (ANDREOTE et al., 2012). Porém, no trabalho citado, a maior ocorrência foi observada para a área BrMgv03. Desta maneira acredita-se que estas bactérias poderiam apresentar poucas cópias do gene 16S RNAr, ficando, desta maneira, subestimadas na análise de pirosequenciamento deste gene realizada no presente trabalho.

Os resultados apresentados sugerem importância na abundância relativa de *Planctomycetes* para o manguezal BrMgv02, onde as frequências observadas para as repetições *a* e *b* (3,91%) foram quase equivalentes às frequências observadas para os manguezais BrMgv01 e BrMgv03 somadas (4,12%). Estas bactérias podem estar sofrendo diferenciação sazonal por alguns fatores, como sugerido por Li et al., (2011), que demonstraram diferenças na distribuição espacial de bactérias relacionadas a anammox em sedimentos de manguezal devido a alterações na vazão do rio e ao movimento das marés. No presente estudo, por se tratar da área com maior contaminação, a área BrMgv02 pode apresentar maiores períodos de condições anóxicas, ou outros fatores, que auxiliem a detecção destas bactérias nestes locais. A abundância destas bactérias pode ainda estar sofrendo influência antropogênica, observada nestes locais, principalmente na área BrMgv03, que apresentou menor abundância destas bactérias. Curiosamente, a detecção de *Planctomycetes* ocorreu inversamente às taxas encontradas para via desnitrificação (Capítulo 2) onde a área BrMgv03 apresentou as maiores taxas, seguida por BrMgv01 e a menor produção foi observada para BrMgv02. Assim, pode-se inferir que a abundância de *Planctomycetes* pode estar inversamente relacionada à abundância de bactérias desnitrificantes.

Levando em consideração a função destes *Planctomycetes*, uma vez que apenas uma pequena parte destas afiliou-se proximamente às bactérias relacionadas à via anammox, pode-se inferir que tais organismos estejam relacionados à outras vias biogeoquímicas, como por exemplo, atuando na degradação do carbono orgânico ou contaminantes presentes nestes locais. Já foi descrito que membros do filo *Planctomycetes* podem apresentar diversos metabolismos para a utilização/degradação de carbono orgânico, uma parte importante do ciclo do marinho do carbono (KALYUZHNYA et al., 2005; SHU et al., 2011).

Outro fator importante para a abundância de bactérias anammox é a presença de raízes de plantas. Nestes locais, as raízes das plantas transportam O₂ para o sedimento e seus exsudados servem como substratos para os micro-organismos (HOLGUIN et al., 2001). Uma vez que as bactérias promotoras de anammox são estritamente anaeróbias e requerem nitrito e amônio para seu crescimento, a existência de árvores nestes manguezais estaria exercendo interação competitiva com anammox, liberando O₂ e consumindo as formas nitrogenadas

disponíveis. Além disso, diferentes bactérias que utilizam nitrogênio, tais como os amônio-oxidantes, nitrito-oxidantes, e desnitrificantes, também podem estar influenciando diretamente a presença deste processo, uma vez que competem ou acoplam para consumir/liberar substratos nitrogenados nos sedimentos de manguezais (FLORES-MIRELES et al., 2007). Nos locais amostrados, observou-se a presença de vegetação mais intensa na área BrMgv03, seguida por BrMgv01; a área BrMgv02 apresentou, devido a contaminação, a presença de vegetação menos densa.

3.3.4 Hibridização fluorescente *in situ* (Fluorescence *in situ* Hybridization FISH)

Uma vez que bibliotecas de clones 16S RNAr não fornecem informações sobre a organização das comunidades microbianas *in situ*, (SUZUKI; GIOVANNONI, 1996), a estratégia de utilização de sondas marcadas deve ser considerada. A técnica de FISH marca os ribossomos das células e permite a identificação, quantificação e, quando combinada com outras técnicas, caracterização de populações microbianas em ambientes complexos (AMANN et al., 1991; WAGNER et al. 2003). Para tanto, duas sondas de oligonucleotídeos foram desenhadas para marcar de forma específica o gene 16S RNAr de *Planctomycetes* (PLA46 e PLA886), e têm evidenciado a ubiquidade deste grupo em diversos ecossistemas (NEEF et al., 1998; GADE et al., 2004). O uso de sondas como estas tem detectado *Planctomycetes* representando, por exemplo, < 2 a 10% das células contadas com DAPI em amostras de rios poluídos (BRUMMER et al., 2000; BRUMMER et al., 2004); e de 3 a 19% das células em amostras arenosas de sedimento do Mar do Norte, Alemanha (MUSAT et al., 2006).

Neste trabalho, foi feito uso da sonda PLA46, onde a técnica FISH foi utilizada de maneira qualitativa. A dificuldade de visualização das células devido a auto-fluorescência dos sedimentos amostrados, como a limitação na contagem de células devido ao aumento utilizado, foram fatores que impediram o uso da técnica de maneira quantitativa. Foi observado que nem todo material genético corado com DAPI foi corado com a sonda PLA46; comprovando a especificidade da sonda aplicada. A baixa quantidade de células marcadas com a sonda específica PLA46, evidenciada pelo poucos pontos de fluorescência nas imagens (Figura 3.3), corrobora os dados encontrados com o pirosequenciamento gene ribossomal 16S RNAr, que indica uma ocorrência média de 1,34% de *Planctomycetes* nestas amostras. No entanto, pode-se observar que células hibridizadas com a sonda PLA46 encontram-se frequentemente em aglomerados de células e sedimento, o que pode indicar a ocorrência deste

grupo microbiano em biofilmes, ou associados a outros grupos microbianos presentes em tal ambiente. Frequentemente este grupo tem sido descrito como formado por organismos muito dependentes da interação com outros organismos para sua sobrevivência (SLIEKERS et al., 2003).

Uma pequena detecção de *Planctomycetes* relacionados à via anammox foi observada por Zhang et al. (2007). Estes autores realizaram um estudo com sedimento de água doce (Xinyi River, China), com uso da sonda AMX820 (utilizada para detectar principalmente *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*); detectando somente cerca de 1% de bactérias anammox, comparadas o número total de células coradas com DAPI. Posteriormente, foi realizado o enriquecimento destas amostras (por meio de biorreatores), e a porcentagem de detecção de bactérias anammox aumentou para cerca de 6%. Da mesma maneira, acredita-se que um enriquecimento dos sedimentos de manguezais amostrados neste trabalho melhorariam imensamente a visualização de *Planctomycetes*, responsáveis ou não pelo processo anammox; buscando o entendimento da distribuição espacial destas bactérias nestes locais.

Além disso, teoricamente, cada ribossomo dentro de uma célula bacteriana, que contem uma cópia do 16S RNAr, foi marcada por uma molécula de sonda durante a hibridização. Assim, o alto número de cópias dos ribossomos por célula proporciona a amplificação do sinal natural para aquela célula (AMANN et al., 1995). Contudo a maioria das bactérias dos sistemas aquáticos crescem lentamente e, devido ao seu metabolismo, apresentam baixo número de ribossomos. Desta forma, muitas vezes a intensidade do sinal das células hibridizadas é fraco, frequentemente abaixo do limite de detecção (PERNTHALER et al., 2001).

Figura 3.4 - Detecção de *Planctomycetes* por FISH. a. BrMgv01 coloração com DAPI; b. BrMgv01 hibridização com sonda PLA46; c. BrMgv02 coloração com DAPI; d. BrMgv02 hibridização com sonda PLA46; e. BrMgv03.coloração com DAPI; f. BrMgv03 hibridização com sonda PLA46. Aumento de 400x. As barras brancas significam 10 μ m

3.4 Conclusões do capítulo

Este trabalho relata, pela primeira vez, a detecção e análise do filo *Planctomycetes* em sedimentos de manguezais brasileiros, comprovando sua ocorrência, e relacionando sua frequência com variáveis ambientais. Foi determinado que tal grupo corresponde em média a 1,34% das bactérias presentes neste ambiente.

A detecção deste filo foi maior na área de estudo BrMgv02 (maiores frequências deste grupo), indicando que a contaminação desta área leva a uma alteração da diversidade, o que propicia um aumento na abundância de bactérias pertencentes a este grupo.

A filogenia apresentada sugere a afiliação da maioria das sequências detectadas com *Planctomycetes* não descritos como responsáveis pelo processo anammox, corroborando os resultados de baixa atividade de tal processo nos sedimentos de manguezais, como indicado no capítulo 2.

A detecção do filo *Planctomycetes* por dados gerados a partir do pirosequenciamento foi ser confirmada pela técnica FISH; que, apesar de ter sido realizada de maneira qualitativa, indicou uma baixa frequência de tais organismos, concordando com os dados de sequenciamento de DNA.

A atividade das bactérias alocadas no filo *Planctomycetes* nestes locais não está clara, uma vez que apenas sua relação com o ciclo do nitrogênio foi considerada neste trabalho. Assim, acredita-se que as bactérias detectadas nestes locais possam estar não apenas relacionadas somente com a oxidação anaeróbica de amônia. Possivelmente, nestes manguezais amostrados, estas podem estar relacionadas com outros ciclos biogeoquímicos, como por exemplo, ciclo do carbono, atuando na degradação dos contaminantes presentes locais, sobretudo na decomposição dos derivados de petróleo, presentes na área BrMgv02.

Referências

ALFREIDER, A.; PERNTHALER, J.; AMANN, R.; SATTTLER, B.; GLOCKNER, E.O.; WILLE, A.; PSENNER, R. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and Pelagic Layers of a High Mountain Lake by in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2138-2144, 1996.

AMANN, R.I.; BINDER, B.J.; OLSON, R.J. Combination of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analysing mixed microbial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 1919-1925, 1990.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 143-169, 1995.

AMANO, T.; YOSHINAGA, I.; OKADA, K.; YAMAGISHI, T.; UEDA, S.; OBUCHI, A.; SAKO, Y.; SUWA, Y. Detection of anammox activity and diversity of anammox bacteria related 16S rRNA genes in coastal marine sediment in Japan. **Microbes and Environments / JSME**, Tagajo, v. 22, n. 3, p. 232-242, 2007.

ANDREOTE, F.D.; JIMENEZ, D.J.; CHAVES, D.; DIAS, A.C.F.; LUVIZOTTO, D.M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELA, C.C.; LOPEZ, M.V.; BAENA, S.; TAKETANI, R.G.; SOARES, I.M. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **Plos One**, Oxford, v. 7, p. e38600, 2012.

BAE, H.; PARK, K.-S.; CHUNG, Y.-C.; JUNG, J.-Y. Distribution of anammox bacteria in domestic WWTPs and their enrichments evaluated by real-time quantitative PCR. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 323-334, 2010.

BORGES, K.M.; BERGQUIST, P.L. Genomic restriction map of the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB8. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 175, n. 1, p. 103-110, 1993.

BORIN, S.; MAPELLI, F.; ROLLI, E.; SONG, B.; TOBIAS, C.; SCHMID, M.C.; De LANGE, G.J.; REICHART, G.J.; SCHOUTEN, S.; JETTEN, M.; DAFFONCHIO, D. Anammox bacterial populations in deep marine hypersaline gradient systems. **Extremophiles**, Tokyo, 2013. Online doi: 10.1007/s00792-013-0516-x

BRUMMER, I.H.M.; FEHR, W.; WAGNER-DOBLER, I. Biofilm community structure in polluted rivers: abundance of dominant phylogenetic groups over a complete annual cycle. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3078-3082, 2000.

BRUMMER, I.H.M.; FELSKA, A.D.M.; WAGNER-DOBLER, I. Diversity and seasonal changes of uncultured *Planctomycetales* in river biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 5094-5101, 2004.

CLEARY, D.F.R, SMALLA, K., MENDONÇA-HAGLER, L.C.S, GOMES, N.C.M. Assessment of variation in bacterial composition among microhabitats in a mangrove environment using DGGE fingerprints and barcoded pyrosequencing. **PLoS One**, Oxford, v. 7, p. e29380, 2012.

DAIMS, H.; BRÜHL, A.; AMANN, R.; SCHLEIFER, K.H.; WAGNER, M. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. **Systematic and Applied Microbiology**, Oxford, v. 22, p. 434-444, 1999.

DALSGAARD, T.; CANFIELD, D.E.; PETERSEN, J.; THAMDRUP, B.; ACUNA-GONZALEZ, J. N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. **Nature**, London, v. 422, p. 606-608, 2003.

DeLONG, E.F.; FRANKS, D.G.; ALLDREDGE, A.L. Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 38, p. 924-934, 1993.

FASANELLA, C.C. **Diversidade da comunidade de fungos em solos de manguezais do Estado de São Paulo**. 2012. 98 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

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

FORTERRE, P. A new fusion hypothesis for the origin of Eukarya: better than previous ones, but probably also wrong. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 162, n. 1, p. 77-91, 2011.

FUERST, J.A.; SAGULENKO, E. Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 9, p. 403-413, 2011.

FUKUNAGA, Y.; KURAHASHI, M.; SAKIYAMA, Y.; OHUCHI, M.; YOKOTA, A.; HARAYAMA, S. *Phycisphaera mikurensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a marine alga, and proposal of *Phycisphaeraceae* fam. nov., *Phycisphaerales* ord. nov. and *Phycisphaerae* classis nov. in the phylum *Planctomycetes*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 55, p. 267-275, 2009.

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

GADE, D.; SCHLESNER, H.; GLOCKNER, F.O.; AMANN, R.; PFEIFFER, S.; THOMM, A. Identification of planctomycetes with order-, genus-, and strain-specific 16S rRNA targeted probes. **Microbial Ecology**, New York, v. 47, p. 243-251, 2004.

GLOCKNER, F.O.; AMANN, R.; ALFREIDER, A.; PERNTHALER, J.; PSENNER, R.; TREBESIU, K.; SCHLEIFER, K.H. An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, Oxford, v. 19, p. 403-406, 1996.

GOTTLIEB, P.; RUDNER, R. Restriction site polymorphism of ribosomal ribonucleic acid gene sets in members of the genus *Bacillus*. **International Journal for Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 35, p. 244-252, 1985.

HU, B.L.; ZHENG, P.; TANG, C.J.; CHEN, J.W.; van DER BIEZEN, E.; ZHANG, L.; NI, B.J.; JETTEN, M.S.M.; YAN, J.; YU, H-Q. Identification and quantification of anammox bacteria in eight nitrogen removal reactors. **Water Research**, Oxford, v. 44, p. 5014–5020, 2010.

JANSSEN, P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 1719-1728, 2006.

JETTEN, M.; SCHMID, M.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.; SINNINGHE DAMSTÉ, J. STROUS, M. Anammox organisms: enrichment, cultivation, and environmental analysis. **Methods in Enzymology**, Palo Alto, v. 397, p. 34-57, 2005.

KALYUZHNAIA, M.G.; LIDSTROM, M.E.; CHISTOSERDOVA, L. Utility of environmental primers targeting ancient enzymes: methylotroph detection in Lake Washington. **Microbial Ecology**, New York, v. 48, p. 463-472, 2004.

KALYUZHNAIA, M.G.; NERCESSIAN, O.; LIDSTROM, M.E., CHISTOSERDOVA, L. Development and application of polymerase chain reaction primers based on *fhcD* for environmental detection of methanopterin-linked C1-metabolism in bacteria. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 7, p. 1269-1274, 2005.

KARTAL, B.; RATTRAY, J.; van NIFTRIK, L.A.; van de VOSSENBERG, J.; SCHMID, M.C.; WEBB, R.I.; SCHOUTEN, S.; FUERST, J.A.; DAMSTÉ, J.S.; JETTEN, M.S.M. *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"* a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, Oxford, v. 30, p. 39–49, 2007.

KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, Oxford, v. 16, p. 11–120, 1980.

KRIEG, N.R.; STALEY, J.T.; BROWN, D.R.; HEDLUND, B.P.; PASTER, B.J.; WARD, N.L.; LUDWIG, W.; WHITMAN, W.B. **Bergey's manual of systematic bacteriology: the Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes**. 2nd ed. New York: Springer, 2010. v. 4, 720 p.

KULICHEVSKAYA, I.S.; BAULINA, O.I.; BODELIER, P.L.E.; RIJPSTRA, W.I.C.; DAMSTE, J.S.S.; DEDYSH, S.N. *Zavarzinella formosa* gen. nov., sp. nov., a novel stalked, Gemmatallike planctomycete from a Siberian peat bog. **International Journal for Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, p. 357-364, 2009.

KULICHEVSKAYA, I.S.; IVANOVA, A.O.; BAULINA, O.I.; BODELIER, P.L.E.; DAMSTE, J.S.S.; DEDYSH, S.N. *Singulisphaera acidiphila* gen. nov., sp. nov., a non-filamentous, *Isosphaera*-like planctomycete from acidic northern wetlands **International Journal for Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 1186-1193, 2008.

KUYPERS, M.M.M.; LAVIK, G.; WOEBKEN, D.; SCHMID, M.; FUCHS, B.M.; AMANN, R. Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 102, p. 6478-6483, 2005.

KUYPERS, M.M.M.; SLIEKERS, A.O.; LAVIK, G.; SCHMID, M.; JORGENSEN, B.B.; KUENEN, J.G. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. **Nature**, London, v. 422, p. 608-611, 2003.

LI, M.; CAO, H.; HONG, Y.G.; GU, J.D. Seasonal dynamics of anammox bacteria in estuarial sediment of the Mai Po reserve revealed by analyzing the 16S rRNA and hydrazine oxidoreductase (*hzs*) genes. **Microbes and Environments / JSME**, Tagajo, v. 26, p. 15-22, 2011.

LLOBET-BROSSA, E.; ROSSELLO-MORA, R.; AMANN, R. Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 2691-2696, 1998.

LONGFORD, S.R.; TUJULA, N.A.; CROCETTI, G.R.; HOLMES, A.J.; HOLMSTROEM, C.; KJELLEBERG, S.; STEINBERG, P.D.; TAYLOR, M.W. Comparisons of diversity of bacterial communities associated with three sessile marine eukaryotes. **Aquatic Microbial Ecology**, Berlin, v. 48, p. 217-229, 2007.

MANZ, W.; AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; WAGNER, M.; SCHLEIFER, K.-H. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. **Systematic and Applied Microbiology**, Oxford, v. 15, p. 593-600, 1992.

MISKIN, I.P.; FARRIMOND, P.; HEAD, I.M. Identification of novel bacterial lineages 705 as active members of microbial populations in a freshwater sediment using a rapid RNA 706 extraction procedure and RT-PCR. **Microbiology**, Reading, v. 145, p. 1977-1987, 1999.

MUSAT, N.; WERNER, U.; KNITTEL, K.; KOLB, S.; DODENHOF, T.; van BEUSEKOM, J.E.E. Microbial community structure of sandy intertidal sediments in the North Sea, Sylt-Romo Basin, Wadden Sea. **Systematic and Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, p. 333-348, 2006.

MUYZER, G.; de WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n. 3, p. 695-700, 1993.

NAKAJIMA, J.; SAKKA, M.; KIMURA, T.; SAKKA, K. Detection of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in Ago Bay sediments. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 72, p. 2195-2198, 2008.

NEEF, A.; AMANN, R.; SCHLESNER, H.; SCHLEIFER, K.-H. Monitoring a widespread bacterial group: *in situ* detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. **Microbiology**, Reading, v. 144, p. 3257-3266, 1998.

PENTON, C.R.; DEVOL, A.H.; TIEDJE, J.M. Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 6829-6832, 2006.

PERNTHALER, J.; GLOCKNER, F.O.; SCHONHUBER, W.; AMANN, R. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Methods in Microbiology**, Oxford, v. 30, p. 207-226, 2001.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 151, p. 167-177, 2000.

RIGONATO, J.; ALVARENGA, D.O.; ANDREOTE, F.D.; DIAS, A.C.F. MELO, I.S. KENT, A.; FIORE, M.F. Cyanobacterial diversity in the phyllosphere of a mangrove Forest. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 80, n. 2, p. 312-322, 2012.

RISGAARD-PETERSEN, N.; NIELSEN, L.P.; RYSGAARD, S.; DALSGAARD, T.; MEYER, R.L. Application of the isotope pairing technique in sediments where anammox and denitrification co-exist. **Limnology Oceanography Methods**, Waco, v. 2, p. 315, 2004.

RUSCH, A.; HUETTEL, M.; REIMERS, C.E.; TAGHON, G.L.; FULLER, C.M. Activity and 744 distribution of bacterial populations in Middle Atlantic Bight shelf sands. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 44, p. 89-100, 2003.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SCHLESNER, H. *Planctomyces brasiliensis* sp. nov., a halotolerant bacterium from a salt pit. **Systematic and Applied Microbiology**, Oxford, v. 12, p. 159-161, 1989.

SCHLESNER, H.; RENSMANN, C.; TINDALL, B.J.; GADE, D.; RABUS, R.; PFEIFFER, S.; HIRSCH, P. Taxonomic heterogeneity within the *Planctomycetales* as derived by DNA-DNA hybridization, description of *Rhodopirellula baltica* gen. nov., sp. nov., transfer of *Pirellula marina* to the genus *Blastopirellula* gen. nov. as *Blastopirellula marina* comb. nov. and emended description of the genus *Pirellula*. **International Journal for Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1567-1580, 2004.

SCHMID, M.C.; MASS, B.; DAPENA, A.; van de PAS-SCHOONEN, K.; van de VOSSENBERG, J.; KARTAL, B. Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) bacteria (Minireview). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1677-1684, 2005.

SCHMID, M.C.; RISGAARD-PETERSEN, N.; van de VOSSENBERG, J.; KUYPERS, M.M.M.; LAVIK, G.; PETERSEN, J. Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 9, p. 1476-1484, 2007.

SHU, Q.; XIONG, W.; PENG, S.; HUANG, P. Molecular progresses of marine *Planctomycetes*: a review. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 5, n. 33, p. 6018-6023, 2011.

SINNINGHE-DAMSTÉ, J.S.; STROUS, M.; RIJPSMA, W.I.C.; HOPMANS, E.C.; GEENEVASSEN, J.A.; van DUIN, A.C.T.; van NIFTRIK, L.A.; JETTEN, M.S.M. Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. **Nature**, London, v. 419, p. 708-712, 2002.

SLIEKERS, A.O.; THIRD, K.; ABMA, W.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. CANON and Anammox in a gas-lift reactor. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 218, p. 339-344, 2003.

SRIVASTAVA, A.K.; SCHLESSINGER, D. Mechanism and regulation of ribosomal RNA processing. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 44, p. 105-129, 1990.

STALEY, J.T. Budding bacteria of *Pasteuria-Blastobacter* group. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 19, p. 609-614, 1973.

STROUS, M.; FUERST, J.A.; KRAMER, E.H.M.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; VAN de PAS-SCHOONEN, K.T.; WEBB, R.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. Missing lithotroph identified as new planctomycete. **Nature**, London, v. 400, p. 446-449, 1999a.

VERGIN, K.L.; URBACH, E.; STEIN, J.L.; DELONG, E.F.; LANOIL, B.D.; GIOVANNONI, S.J. Screening of a fosmid library of marine environmental genomic DNA fragments reveals four clones related to members of the order *Planctomycetales*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 3075-3078, 1998.

WAGNER, M.; AMANN, R.; LEMMER, H.; SCHLEIFER, K. H. Probing activated sludge with proteobacteria-specific oligonucleotides: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 9, p. 1520-1525, 1993.

WALLNER, G.; AMANN, R.; BEISKER, W. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. **Journal of Cytometry**, Rajkot, v. 14, p. 136-143, 1993.

WARD, N.; STALEY, J.T.; FUERST, J.A.; GIOVANNONI, S.; SCHLESNER, H.; STACKEBRANDT, E. The order Planctomycetales, including the genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata* and *Isophaera* and the Candidatus genera *Brocadia*, *Kuenenia* and *Scalindua*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The Prokaryotes**. 3rd ed. New York: Springer, 2006. v. 7: Symbiotic proteobacteria: delta, epsilon subclass, p. 757-793.

WINKELMANN, N.; HARDER, J. An improved isolation method for attached-living *Planctomycetes* of the genus *Rhodopirellula*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 77, p. 276-284, 2009.

WOEBKEN, D.; LAM, P.; KUYPERS, M.M.M.; NAQVI, S.W.A.; KARTAL, B.; STROUS, M. A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel *Candidatus Scalindua* phylotype in marine oxygen minimum zones. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 10, p. 3106-3119, 2008.

WOEBKEN, D.; TEELING, H.; WECKER, P.; DUMITRIU, A.; KOSTADINOV, I.; DELONG, E.F.; AMANN, R.; GLOCKNER, F.O. Fosmids of novel marine *Planctomycetes* from the Namibian and Oregon coast upwelling systems and their cross-comparison with planctomycete genomes. **The ISME Journal**, New York, v. 1, p. 419-435, 2007.

ZHANG, Y.; RUAN, X.H.; DEN CAMP, H.J.M.O.; SMITS, T.J.M.; JETTEN, M.S.M.; SCHMID, M.C. Diversity and abundance of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater sediments of the Xinyi River (China). **Environmental Microbiology**, Washington, v. 9, p. 2375-2382, 2007.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ciclos biogeoquímicos, como ciclo do carbono, nitrogênio e enxofre determinam a ocorrência da vida e a funcionalidade dos ecossistemas. Neste sentido, o ciclo do nitrogênio apresenta grande importância nos ecossistemas, uma vez que o nitrogênio é um dos elementos essenciais ao metabolismo microbiano.

Importantes transformações do nitrogênio podem ocorrer em ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio, como os sedimentos de manguezais. Nestes locais, a principal importância do ciclo do nitrogênio está relacionada ao seu metabolismo numa condição de constante variação da condição óxica-anóxica, determinada pela movimentação da maré. Este movimento das marés, além de influenciar a disponibilidade de oxigênio, influencia na disponibilidade de nutrientes aos microrganismos, principalmente na camada superior do sedimento. Neste sentido, o estudo das vidas anammox, desnitrificação e DNRA, torna-se interessante nestes locais, buscando a compreensão do funcionamento do ciclo do nitrogênio neste ecossistema.

De acordo com os resultados obtidos, foi observado que a via predominante de processamento do nitrogênio oxidado é a desnitrificação. Já o processo de anammox, pode ocorrer em tais áreas, porém em taxas bastante reduzidas. Há ainda indícios da importância da via DNRA, uma vez que taxas significantes no consumo NO_x^- foram observadas, bem como a presença do principal gene relacionado a esta detectado nos dados metagenômicos.

As análises metagenômicas e metatranscriptômicas realizadas nestes trabalho corroboram com os dados obtidos com as incubações, onde a via anammox foi detectada de maneira menos expressiva e os genes relacionados à desnitrificação foram os mais detectados. Assim, o conjunto de resultados deste trabalho evidenciam a importância da via desnitrificação, em todas as áreas estudadas, principalmente na área BrMgv03, área que também apresentou os maiores resultados para ao consumo de NO_x^- (relacionado à vida DNRA).

Foi observado ainda que todas as três vias estudadas sofreram supressão na área BrMgv02, fato possivelmente relacionado à contaminação por hidrocarbonetos observada neste local. Assim, a contaminação estaria, de forma direta (inibindo o desenvolvimento de grupos realizadores dos processos) ou indireta (alterando as condições ambientais, por exemplo, causando uma menor vegetação da área), diminuindo tais transformações no nitrogênio nestes locais.

Ainda, a partir de dados metagenômicos e por meio da técnica FISH, realizou-se, pela primeira vez, a detecção de bactérias afiliadas ao Filo *Planctomycetes* em ecossistemas de manguezais brasileiros. No entanto, a maioria das sequências obtidas não tenham se relacionado filogeneticamente aos *Planctomycetes* responsáveis pelo processo de anammox. Desta forma, sugere-se que os *Planctomycetes* detectados, principalmente na área BrMgv02, estariam relacionados a funcionalidade de outros elementos, como por exemplo, participando ativamente do ciclo do carbono.

Concluindo, este trabalho traça as primeiras linhas de uma análise funcional dos sedimentos de manguezais, indicando a predominância de determinados processos, e atuando na nomeação de genes e grupos microbianos essenciais a transformação do nitrogênio neste ambiente.

ANEXO

Figura 4.1 - Árvore filogenética realizada para sequências afiliadas à *Planctomycetes*, gene 16S RNAr. A filogenia foi determinada pelo método *Neighbor joining* e a relação entre as sequências foi inferida usando método *muscle*; os dados observados nos ramos indicam valores de *bootstrap* acima de 30%, total de 1000 repetições. Foram utilizadas sequências provenientes de pirosequenciamento separadas em UTOs (97%) com programa mothur. As cores indicam: planctomycetes-clones; *Planctomycetes*; planctomycetes-anammox; e raiz.