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

Detecção e análise de sequências afiliadas à Planctomycetes em manguezais do estado de São Paulo

Juliana Eschholz de Araujo

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

Piracicaba
2014

Juliana Eschholz de Araujo
Bacharel em Biomedicina

Detecção e análise de sequências afiliadas à Planctomycetes em manguezais do estado de São Paulo

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

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

Piracicaba
2014

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

Araujo, Juliana Eschholz de
Detecção e análise de sequências afiliadas à Planctomycetes em manguezais do estado de São Paulo / Juliana Eschholz de Araujo.- - Piracicaba, 2014.
69 p. : il.

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

1. Análises in sílico 2. Isolamento 3. Funcionalidade 4. Sulfatases I. Título

CDD 631.46
A663d

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

Aos meus pais Maria Célia e Gilson por confiarem em mim e me apoiarem nessa jornada. Dedico em especial a minha irmã Fernanda, por aguentar minha ausência e por ser a razão da minha vida.

Dedico.

Ao meu noivo Eduardo, pelo apoio incondicional e companheirismo.

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, porque se não fosse da vontade dele nada disso teria acontecido. Á Nossa Senhora da Aparecida e Nossa Senhora da Glória na qual sou devota, que muitas vezes pedi luz e seriedade para realizar meu trabalho.

Agradeço aos meus pais por me ajudarem a chegar até aqui, pela educação e confiança. Á minha mãe por ser um exemplo de mulher batalhadora, que trabalha e ainda cuida de duas casas, minha melhor amiga. Que no meu momento de desespero orou a Nossa Senhora das Graças e pediu ajuda na realização do meu trabalho. Ao meu pai, um homem trabalhador que luta por uma vida melhor.

Á minha irmã Fefê por suportar minha ausência, apesar de não entender agora que é preciso, sei que um dia vai entender a minha distância, porque tudo que faço é para ajudar a dar um futuro melhor a ela. A pessoa que mais amo nessa vida.

Ao professor Fernando Dini Andreote, primeiro pela confiança em me escolher ser sua aluna, apesar de não me conhecer. Minha admiração é grande, uma pessoa inteligente, correta e amiga. Quando crescer, espero ser igual a ele.

Ao meu noivo Eduardo, por aguentar meus “xiliques” e por sempre falar que tudo vai dar certo.

In memorian ao meu padrinho Rogério que nunca poupou ajuda na minha trajetória. Meu eterno agradecimento por tudo.

Á minha família pelo carinho.

Á minha nova família Daniel, Basso e Ferreira por ter me acolhido e me ajudado nos momentos em que meus pais não podiam por causa da distância. Em especial, minha sogra Selma e meu sogro Adilson.

Aos meus amigos de laboratório Ademir, Armando, Danice, Danielle, Dorotéia, Diogo, Fábio, Giulia, Joelma, Julia, Luana, Lucas, Polé, Maryeimy, Mylenne, Pedro, Simone e Thiago pela amizade e parceria. Ninguém caminha sozinho. Á Cristiane, que me recebeu muito bem, sempre deixou claro que o que eu precisasse, eu podia contar com ela.

Em especial a Danice, aquela que abraçou a causa. Me recebeu bem, me ajudou, me ensinou tudo o que sei hoje. Uma amizade que levarei pelo resto da minha vida. E fica aqui meu agradecimento por tudo, Metal.

Ao amigo Polé, que sempre que precisei ele estava lá. Podia ser ás 7h da manhã ou as 22h da noite que eu precisasse ir ao laboratório ele ia comigo. Tudo, que eu precisasse ele me ajudava. Um grande amigo.

Ás meninas Julia, Mylenne e Danice pela amizade, por me proporcionarem momentos felizes, seja no shopping, seja em Natal, seja no Rucas, no bar, na salinha. Elas me mostraram que amizade verdadeira existe sim, e que posso contar com cada uma delas.

Aos técnicos do laboratório Fernandinho, Denise, Wlade e Sônia, por ajudarem a por ordem no laboratório e pela amizade e recepção.

Á minha primeira amizade em Piracicaba, lá atrás no dia da prova do mestrado, a “bunita” Andresa. Agradeço pela parceria, amizade. Por tudo amiga.

Não posso esquecer as meninas da república no qual dividi minha rotina por 1 ano e meio, apt 141, Elisa, Layanne e Tatiane. Por momentos felizes divididos com vocês, conselhos, risadas.

Aos colegas do laboratório do Márcio Lambais: Elisa, Adriano, Alice e Wlade por me ajudarem quando eu precisei e por emprestar materiais importantes para meu estudo.

"Nunca deixe que lhe digam
que não vale a pena acreditar no sonho que se tem,
ou que seus planos nunca vão dar certo,
ou que você nunca vai ser alguém".

Renato Russo

SUMÁRIO

RESUMO.....11
ABSTRACT.....13
1 INTRODUÇÃO.....15
2 DESENVOLVIMENTO.....17
2.1 Revisão Bibliográfica.....17
2.1.1 O ambiente mangue.....17
2.1.2 O filo *Planctomycetes* – filogenia e características.....19
2.1.3 O papel de Planctomycetes no ciclo do nitrogênio.....21
2.1.4 O papel de Planctomycetes no ciclo do enxofre.....23
2.1.5 Cultivo de isolados pertencentes ao grupo Planctomycetes.....25
2.1.6 Microbiologia molecular: acesso a biodiversidade microbiana não cultivada.....27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....29
3.1 Amostras e manguezais utilizados no estudo.....29
3.2 Busca de clones contendo insertos oriundos de Planctomycetes.....30
3.3 Extração de DNA dos sedimentos e obtenção da biblioteca metagenômica.....31
3.3.1 Sequenciamento da biblioteca de fosmídeos.....31
3.3.2 Análises *in sílico* das sequências da biblioteca de fosmídeo.....32
3.4 Análise dos dados metagenômicos e metatranscriptômicos de amostras ambientais.....32
3.4.1 Análises *in sílico* das sequências do DNA e RNA ambiental.....33
3.5 Isolamento e seqüenciamento de Planctomycetes a partir de amostras de sedimentos de manguezais.....34
3.5.1 Análise filogenética.....36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....37
4.1 Busca de clones contendo insertos oriundos de Planctomycetes.....37
4.2 Análise *in sílico* das sequências obtidas da biblioteca de fosmídeos afiliadas a Planctomycetes.....37
4.3 Análises *in sílico* das sequências de DNA e RNA ambiental afiliadas a Planctomycetes.....39
4.3.1 Análise das sequências de Planctomycetes similares a sulfatase.....42
4.4 Isolamento, seleção e filogenia de bactérias afiliadas ao grupo de Planctomycetes.....44

5 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS.....51
REFERÊNCIAS.....53
ANEXOS.....63

RESUMO

Detecção e análise de sequências afiliadas à Planctomycetes em bibliotecas metagenômicas de manguezais do estado de São Paulo

Os manguezais são considerados um ecossistema único, devido sua particular combinação de condições ambientais, influenciados pela sua localização na interface entre o continente e oceano. O estudo deste ecossistema se torna urgente uma vez que os manguezais estão desaparecendo em todo mundo, e sua diversidade de grupos microbianos é ainda pouco conhecida. Dentro dessa temática, o presente projeto visa descrever a possível funcionalidade de bactérias pertencentes ao filo *Planctomycetes* nos manguezais. Tais organismos são ainda pouco estudados, de difícil cultivo, sendo obtidos principalmente em ambientes marinhos, tratamento de água e locais de criação de peixes. Dentro desse filo são encontrados microrganismos pertencentes a gêneros descritos como capazes de realizar a oxidação anaeróbica do íon amônio (anammox), uma importante transformação do nitrogênio em ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio. E ainda, visamos descrever a possível funcionalidade de bactérias pertencentes ao filo *Planctomycetes* nos manguezais. Para isso, foi inicialmente realizada uma comparação dos genomas de Planctomycetes com as sequências obtidas por análises de metagenômica e metatranscriptômica, onde foram encontradas sequências similares às afiliadas a funções desconhecidas (*putative protein*) e a sulfatases. Tais enzimas são descritas como hidrolíticas, que catalizam a clivagem de ésteres de sulfato, liberando o enxofre na forma assimilável. A análise de sequências de uma biblioteca metagenômica (obtida de um manguezal contaminado com petróleo) permitiu a visualização de fragmentos genômicos de Planctomycetes. Esta análise revelou também a ocorrência de genes relacionados a produção de sulfatases, além de indicar arranjos gênicos distintos dos descritos nos genomas de organismos deste grupo, possivelmente indicando a ocorrência de endemismo de Planctomycetes em manguezais. Esta observação foi reforçada pelo cultivo de isolados afiliados a este grupo, os quais tiveram sua afiliação confirmada pelo sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S DNAr. Alguns destes isolados formaram clusters diferenciados dentro do filo *Planctomycetes*, indicando que podem ser estes novas espécies. Sendo assim, a caracterização desse grupo de microrganismos numa combinação de análises *in sílico* e *in vivo*, possibilitou a confirmação da ocorrência de tais organismos nos manguezais, e gerou as primeiras informações sobre sua funcionalidade neste sistema, onde parece ocorrer de forma diferenciada aos demais ambientes onde já foram descritos.

Palavras-chave: Análises *in sílico*; Isolamento; Funcionalidade; Sulfatases

ABSTRACT

Detection and analysis of sequences affiliated with Planctomycetes in mangroves in the state of São Paulo

Mangroves are considered an unique ecosystem due to its particular combination of environmental conditions, influenced by its location at the interface between land and ocean. The study of this ecosystem becomes urgent since mangroves are disappearing worldwide, and its diversity of microbial groups is still poorly understood. Within this theme, this project aims to describe the possible functionality of bacteria belonging to the phylum *Planctomycetes* in mangroves. Such organisms are still poorly studied, difficult to cultivate and mainly isolated from marine environments, water treatment and fish farming sites. Within this phylum are found microorganisms belonging to genera described as capable of performing the anaerobic oxidation of ammonium (anammox), a major transformation of nitrogen in environments with low oxygen availability. Here we aimed to describe the possible functionality of bacteria belonging to the phylum *Planctomycetes* in the mangroves. In order to achieve the target, it was initially performed a comparison of the Planctomycetes genomes with sequences obtained by metagenomics and metatranscriptomics, revealing the presence of sequences with similarity to those affiliated to unknown function and sulfatases. These are hydrolytic enzymes, which catalyze the cleavage of sulfate esters, releasing sulfur on its available form. The analysis of sequences from a metagenomic library (obtained from an oil-contaminated mangrove) allowed the visualization of genomic fragments related to Planctomycetes. It also revealed the presence of genes related with the production of sulfatases, besides the indication of specific genome arrangements, distinct from those describe in organisms allocated in this group, possibly indicating the occurrence of endemicity for Planctomycetes in mangroves. It was reinforced by the cultivation of isolates affiliated to this groups, whose have their affiliation confirmed by the partial sequencing of the 16S rDNA gene. Some isolates clustered composed new clusters within the *Planctomycetes* phylum, indicating the occurrence of new species. In sum, the characterization of this group by combining *in sílico* and *in vivo* analyses, allowed the confirmation of the occurrence of these organisms in mangroves, and generated the first insights about its functioning on this system, where it seems to occur in a differentiated form from those observed in other environments where it has been described.

Keywords: *In sílico* analysis; Isolation; Functionality; Sulfatase

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 locais. 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 únicas de salinidade e alterações sazonais na disponibilidade de oxigênio e nutrientes. O entendimento desse ecossistema se torna urgente, uma vez que os manguezais estão desaparecendo em todo mundo. No entanto, pouco da diversidade de grupos microbianos funcionais dos manguezais é conhecida. Recentes avanços nas metodologias independentes de cultivo, aplicadas ao estudo de comunidades microbianas, têm contribuído significativamente para o avanço do conhecimento sobre real magnitude da diversidade microbiana.

Os sedimentos de manguezais apresentam elevados teores de matéria orgânica, mas ainda assim, apresentam de maneira geral, deficiência em nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, que apesar de serem abundantes não se encontram em formas disponíveis para as plantas. Adicionalmente, por ser o manguezal um ambiente redutor (metabolicamente predominantemente anaeróbio), onde a matéria orgânica é de difícil degradação, é de extrema importância o papel dos microrganismos na manutenção dos ciclos biogeoquímicos, promovendo a ciclagem de nutrientes, e suprindo assim o fornecimento de energia na base da cadeia trófica (ANDREOTE et al., 2012).

Os Planctomycetes são um grupo de microrganismos que possuem características distintas dos demais grupos de bactérias, com ausência de peptídeoglicano e proteínas nas paredes celulares e perfil lipídico semelhante a organismos eucariotos. Tais organismos apresentam desenvolvimento lento, e incluem um grupo de bactérias conhecidas por realizarem de forma exclusiva a oxidação anaeróbica do íon amônio (FUERST; SAGULENKO, 2011).

Um melhor conhecimento da estrutura genética de tais organismos presentes nos manguezais pode suprir informações sobre sua função neste ambiente. Espera-se relacionar a atividade de tal grupo com as condições ambientais, ligando sua responsividade a alterações no sistema manguezal. Assim, a combinação de uma análise *in sílico* com análises baseadas em cultivo pode gerar dados robustos sobre a temática em que este estudo se insere.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 O ambiente mangue

O manguezal é um ecossistema costeiro localizado em regiões de interface entre os ambientes terrestre e marinho; uma área úmida característica de zonas tropicais e subtropicais com características únicas, tais como alta salinidade e temperatura, muito lodo, sedimento anaeróbio e rico em matéria orgânica (FELLER; SITNIK, 1996; KATHIRESAN; BINGHAM, 2001). Este bioma abrange cerca de 60-75% das florestas tropicais do mundo situadas na orla costeira subtropical (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001).

O termo manguezal é utilizado para representar todo o ecossistema, que envolve as plantas e a comunidade associada, a qual é composta por bactérias, fungos, microalgas, invertebrados, pássaros e mamíferos (Projeto temático Biodiversidade e Atividades Funcionais de Microrganismos de Manguezais do Estado de São Paulo). No Brasil, que possui uma das maiores extensões de manguezais do mundo, as regiões de manguezal 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 km^2. No Estado de São Paulo, a região da baixada santista, formada pelos municípios de Bertioga, Cubatão, Guarujá, Itanhaém, Mongaguá, Peruíbe, Praia Grande, Santos e São Vicente, concentram as áreas de manguezais do estado, apresentando uma cobertura vegetal de 675 km^2 (Figura 1) (CURY, 2002).

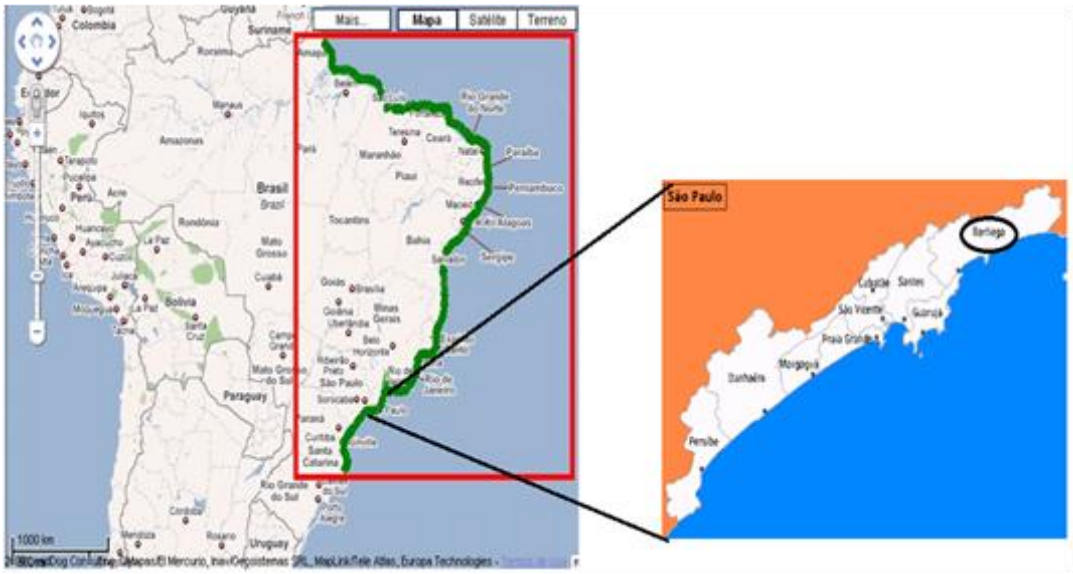


Figura 1 - Mapa do Brasil, evidenciando a área de manguezal ao longo do país; e mapa do estado de São Paulo, enfatizando a baixada Santista (Fonte: Mapa do Brasil mapLink/tele atlas modificado)

Processos importantes, como a ciclagem de nutrientes do manguezal, estão diretamente relacionados com a atividade e diversidade das comunidades microbianas, que formam a base da cadeia alimentar da flora e da fauna desse ecossistema. Nestes locais, algas e protozoários representam apenas 7 e 2% da biomassa, respectivamente, enquanto que bactérias e fungos constituem 91% da biomassa microbiana total (ALONGI et al., 1998; ZHANG et al., 2005). Assim, é possível formular a hipótese de que na ausência ou redução da microbiota haveria prejuízo nas atividades comerciais e ecológicas, possivelmente, resultando na destruição de ecossistemas de manguezais (HOLGUIN et al., 2006; PARALES; HADDOCK, 2004).

A importância desse ecossistema reside na grande produtividade biológica com alta diversidade de peixes, crustáceos, moluscos, aves, répteis e mamíferos; sendo um dos ambientes mais produtivos do mundo. Toda essa diversidade exige uma alta disponibilidade de nutrientes no início da cadeia trófica (DIAS et al., 2009; SÁ; MELO, 2008). Neste ponto, surge a importância da atividade microbiana, que é a principal via de ciclagem de nutrientes dos manguezais, pelos processos de decomposição da matéria orgânica e de fixação de nutrientes (ZAHRAN, 1997). Neste sentindo, Gonzales-Acosta et al. (2006) descrevem que a temperatura da água do mar é um grande determinante para a composição da comunidade de bactérias em manguezais. Assim, a descrição das comunidades bacterianas desse ambiente é altamente desejável e urgente, devido a importância destes ecossistemas manguezais e o desaparecimento destes em todo mundo (HOLGUIN et al., 2006; DUKE; MEYNECKE; DITTMANN, 2007).

A vegetação dos manguezais na costa brasileira é predominantemente composta pelas espécies *Laguncularia racemosa* (mangue branco), *Avicennia schaueriana* (mangue preto) e *Rhizophora mangle* (mangue vermelho). Devido às características ambientais inerentes a este ecossistema, esta vegetação possui adaptações morfológicas e fisiológicas bem desenvolvidas, tais como resistência às alterações de salinidade, variações de maré, ventos fortes e sedimentos com diferentes concentrações de oxigênio (DIAS et al., 2012a).

Apesar de serem muito ricos em matéria orgânica, os ecossistemas de manguezais sofrem deficiência de alguns nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo, que não estão prontamente disponíveis. Uma alta taxa de suprimento desses nutrientes está relacionada à atividade bacteriana, que em manguezais transformam a vegetação morta em fontes de nitrogênio, fósforo e outros nutrientes que podem ser usados pelas plantas (BASHAN; HOLGHIN, 2002).

Embora sejam protegidos por lei (Lei 4771 de 15 de setembro de 1965 do código florestal), os manguezais têm sofrido ações antrópicas na sua exploração, com fins econômicos e agrícolas, pesca predatória e depósito de lixo (EYSINK; POFFO, 2002). Desta forma, o estudo de tais áreas, principalmente em relação ao entendimento de vias metabólicas relacionadas a ciclagem de elementos como nitrogênio e enxofre, podem contribuir para o entendimento e preservação de tais áreas no Brasil e no mundo.

2.1.2 O filo *Planctomycetes* – filogenia e características

Os organismos pertencentes ao filo *Planctomycetes* possuem características fenotípicas distintas das demais bactérias, incluindo a ausência de peptideoglicano, proteínas em suas paredes celulares, e compartimentalização das células por meio de membranas internas. A maioria dos Planctomycetes se reproduz por brotamento, com exceção do gênero marinho *Phycisphaera*, que se reproduz por fissão binária. A falta de peptideoglicano em suas paredes celulares torna estes microrganismos inerentemente resistentes aos antibióticos (inibidores de síntese da parede celular), tais como beta-lactâmicos e vancomicina, o que se gera uma ferramenta útil para o isolamento microbiano em cultura pura (FUERST; SAGULENKO, 2011). Desta maneira, as bactérias pertencentes a este filo apresentam perfil lipídico bastante semelhante ao de organismos eucariotos, e alguns podem sintetizar esteróis, também uma habilidade típica de eucariotos (FUERST; SAGULENKO, 2011). Estes microrganimos podem realizar endocitose, com a capacidade de absorção de genes e proteínas homólogas de membranas protéicas de eucariotos, que são essenciais para o transporte na membrana. Assim, este grupo é considerado como uma transição entre procariotos e eucariotos (IZUMI et al., 2013). Os novos integrantes de *Planctomycetes* mais recentemente descritos, *Bythopirellula goksoyri*, encontrados no Oceano Ártico, possuem reprodução por gemulação, no qual as células filhas são móveis e as células mães são imóveis, ligados uns aos outros em grandes grupos ou em superfícies. Estes Produzem exopolissacarídeos, o que significa que as colônias em meios de cultura são resistentes e de dificil suspensão (STORESUND; OVREAS, 2013) e *Aquisphaera giovannonii* isolado de aquário de água doce relacionado aos gêneros *Isosphaera pallida* e *Singulisphaera acidiphila* no qual possui reprodução por brotamento (BONDOSO et al., 2011).

O crescimento destas bactérias é lento e/ou dependente da interação com outros microrganismos (SLIEKERS et al., 2003). Quando isolados, a maioria apresenta habilidade quimioautotrófica aeróbica ou facultativa, e se especializam no metabolismo de diversas fontes de carbono (BUCKLEY et al., 2006). Algumas bactérias pertencentes a este filo

apresentam ainda um compartimento membranóide denominado ‘anammoxossoma’. Esta estrutura parece não conter qualquer ribossomo ou cromossomo, sendo formado essencialmente por citoplasma com inclusões densas de elétrons (diâmetro 20 nm), com preenchimento e função ainda desconhecidos. As membranas internas de tais bactérias são compostas principalmente de lipídeos diferenciados, chamados de laderanos, o que parece ser mais uma característica exclusiva deste grupo (SINNINGHE-DAMSTÉ et al., 2002). Acredita-se que esta estrutura (anammoxossoma) esteja relacionada a habilidade de alguns Planctomycetes realizarem a oxidação aneróbica do íon amônio (anammox), como descrito no item abaixo (2.1.3).

O filo *Planctomycetes* se divide em duas classes, *Planctomycetacia* e *Phycisphaerae*, que hospedam uma ordem cada, *Planctomycetales* e *Phycisphaerales*, respectivamente. Atualmente, a ordem *Planctomycetales* está dividida em 11 gêneros cultiváveis - *Pirellula, Gemmata, Planctomyces, Isosphaera, Blastopirellula, Rhodopirellula, Schlesneria, Singulisphaera, Aquisphaera, Zavarzinella, Phycisphaera*; e cinco gêneros não cultivados - *Candidatus* (bactérias anammox) Brocadia, Kuenenia, Scalindua, Anammoxoglobus e Jettenia (SCHLESNER et al., 2004; WARD et al., 2006; KULICHEVSKAYA et al., 2008; KRIEG et al., 2008; UKUNAGA et al., 2009; BONDOSO et al., 2011). Alguns dos gêneros desta ordem são frequentemente referenciados como clado PRB (*Pirellula, Rhodopirellula* e *Blastopirellula*). De forma semelhante, os *Planctomycetes* são englobados num chamado superfilo PCV (*Planctomycetes, Chlamydiae, Verrucomicrobia*), que engloba também um candidato de difícil isolamento *Candidatus* Poribacteria e OP3 (IZUMI et al., 2013). Este superfilo tem sido frequentemente sugerido como originado ao longo da separação evolutiva entre Eukarya e Bacteria (FORTERRE, 2011).

Em relação ao genoma de tais organismos, não diferentemente de outros grupos bacterianos, estes tem sido mais amplamente acessados, com base nas novas tecnologias de sequenciamento de DNA. O primeiro representante deste grupo a ter seu genoma sequenciado foi o organismo marinho *Rhodopirellula baltica* (7.15Mb) (GLÖCKNER et al., 2003; LOMBARDOT et al., 2005; TEELING et al., 2004; JENKINS; KEDAR; FUERST, 2002). Um dos maiores genomas encontrados em bactérias foi descrito para *Gemmata obscuriglobus* (9Mb) (BUTLER; FUERST, 2004). Há também a disponibilidade de acesso ao genoma do organismo '*Candidatus* Kuenenia stuttgartiensis', gerado a partir do incremento na densidade de tal organismos em amostras ambientais, ou seja, de forma independente do cultivo (SPETH et al., 2012). A análise comparativa entre genomas de organismos pertencentes a *Planctomycetes* e *Chlamydia* reforçam o estreito elo evolutivo observado entre estes filos

bacterianos (WAGNER; HORN, 2006). Os projetos de sequenciamento de genoma relacionados à bactérias do filo *Planctomycetes* atualmente em curso são: *Blastopirellula marina*, *Planctomyces maris*, *Gemmata obscuriglobus*, *Gemmata* sp. estirpe WA1-1 , *Rosthecobacter dejongeii*, *Akkermansia muciniphila*, *Chthoniobacter flavus*, *Opitutus terrae*, *Errucomicrobium* sp., *Verrucomicrobium espinhosa* (Verrucomicrobia), *Simkania negevensis Z* (*Chlamydiae*), *Lentisphaera araneosa* e *Victivallis vadensis* (*Lentisphaerae*). Tais genomas e suas informações podem ser acessados na base de dados *Genomes Online Database* (Genome Gold) (http://www.genomesonline.org), servindo assim como base de estudos que ampliarão consideravelmente nosso conhecimento sobre a organização genômica de Planctomycetes (WAGNER; HORN, 2006), podendo estes dados ser utilizados para relacionar aos dados já obtidos com estudos dos Planctomycetes em manguezais brasileiros.

No entanto, em contrapartida ao acesso genômico de tais organismos, sequências de genes ribossomais (principalmente 16S RNAr) pertencentes a Planctomycetes 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 natural de tais organismos nos ambientes estudados. O número de genes que codificam 16S RNAr (*operons rrn*) em Planctomycetes pode variar de 1 (BORGES; BERGQUIST, 1993) a 14 (MUYZER; De WAAL; UITTERLINDEN, 1993).

Em 2004 o gênero *Pirellula* foi dividido em 3 gêneros: *Pirellula*, *Blastopirellula* e *Rhodopirellula*. O gênero *Rhodopirellula* é composto por apenas uma espécie, *Rhodopirellula baltica*. Estirpes dessa bactéria foram frequentemente isoladas do Mar Báltico e em diferentes habitats em todo mundo. Apesar do recente isolamento de um membro deste grupo, esses microrganismos continuam considerados os menos representados em coleções de culturas microbianas (WINKELMANN; HARDER, 2009).

Mesmo com as informações nos últimos anos, a fisiologia e o metabolismo de Planctomycetes ainda não são bem compreendidos e o esforço de aumentar o número de estirpes cultiváveis é grande (LAGE; BONDOSO; VIANA, 2012). Apesar do baixo número de espécies descritas, clones de genes 16S rRNA ambiental revelaram que muitas estirpes continuam sendo isoladas, porém as sequências recuperadas não estão relacionadas à espécies cultiváveis (LAGE; BONDOSO, 2011).

2.1.3 O papel de Planctomycetes no ciclo do nitrogênio

Dentro do ciclo do nitrogênio, algumas espécies pertencentes ao filo *Planctomycetes* tem destaque por serem capazes de realizar a oxidação anaeróbica do íon amônio (anammox),

sendo tal transformação essencial para a ciclagem de tal elemento em condições de anaerobiose e/ou baixa disponibilidade de oxigênio. O processo anammox consiste na oxidação de íon amônio a N_2 com a utilização de nitrito como receptor final de elétrons (MULDER et al., 1995; STROUS et al., 1999; Op Den CAMP; JETTEN; STROUS, 2007). Este processo é mediado por bactérias da ordem *Planctomycetales* (STROUS et al., 1999), sendo atualmente conhecidos cinco gêneros, todos *Candidatus* e de difícil cultivo (Scalindua, Brocadia, Kuenenia, Anammoxoglobus e Jettenia) (SCHMID et al., 2005; HUMBERT et al., 2009).

Atualmente, bactérias anammox têm sido detectadas em água doce e em vários ecossistemas marinhos, como em zonas sub-óxicas do Mar Negro (KUYPERS et al., 2003; SCHMID et al., 2003); e associadas a esponjas marinhas e crustáceos (WEBSTER et al., 2001; PIMENTEL-ELARDO et al., 2003; ISHII et al., 2004; XU et al., 2007; SHU; JIAO, 2008; BENGTSSON; OVREAS, 2010) e em manguezais (FERNANDES et al., 2012). Estima-se que cerca de 50% da produção de N_2 marinho seja formado a partir do processo anammox (STROUS; JETTEN, 2004).

A ocorrência de bactérias realizadoras do processo anammox se dá em ambientes com simultânea presença de amônio e nitrito, o 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 nitrato poderia ser produzido pela desnitrificação clássica, ou pela redução dissimilatória de nitrato (COLE, 1996; SIMON, 2002). Neste contexto, o amônio poderia então ser combinado com o nitrito para formar N_2 (KUENEN, 2008).

Em manguezais, aproximadamente 55% do nitrogênio perdido (como NO, N_2O ou N_2) é por meio da desnitrificação. No entanto, anammox é responsável por 67% da perda de N_2 através do desvio do nitrogênio diretamente por NH_4 e NO_2 sob condições anaeróbicas. Em sedimentos organicamente ricos, anammox demonstrou-se ser significativo sob baixas concentrações de NO_2. Os manguezais apresentam tais características, uma vez que possuem características anaeróbicas e nitrato-nitrito disponíveis, sendo um fator de controle para as taxas de desnitrificação. Assim, nitrato e nitrito podem ser gerados por nitrificação intrínseca, fornecido por meio do escoamento da terra e marés. Embora a desnitrificação seja um processo altamente importante e o principal processo de produção de N_2 devido a elevada presença de nitrato, não pode-se excluir que a geração total de N_2 marinho no manguezal, ocorre por uma associação de anammox com desnitrificação em manguezais (FERNANDES et al., 2012).

2.1.4 O papel de Planctomycetes no ciclo do enxofre

O ciclo do enxofre consiste em reações de oxidação e redução dos compostos contendo enxofre nos mais diferentes ambientes. Em condições de aerobiose predominam os processos de oxidação, que geram o íon sulfato, altamente solúvel e disponível para ser absorvido pelas plantas. O sulfato pode então assumir este papel de nutriente, ou se acoplar ao metabolismo microbiano do sedimento em condições específicas de anaerobiose. Neste cenário, o sulfato atua como aceptor de elétrons para alguns microrganismos, como as bactérias redutoras de sulfato. Esta redução do sulfato pode ser assimilatória, onde este passa a compor a biomassa microbiana do sistema, ou dissimilatória, onde a forma reduzida é liberada ao meio. A redução dissimilatória do sulfato gera altos teores de H_2S em sedimentos anaeróbios, como os de manguezais. O sulfeto pode ser doador de elétrons para metabolismo de microrganismos fototróficos e quimiolitotróficos, como as bactérias oxidantes de enxofre, sendo convertido a enxofre elementar ou retornando novamente a forma de sulfato (TANG; BASKARAN; NEMATI, 2009; POSTGATE et al., 1984; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Outro ponto importante na ciclagem de enxofre está na mineralização de compostos orgânicos, ou seja, na liberação de compostos de enxofre a partir de moléculas mais complexas. Neste ponto surge o papel das sulfatases, enzimas que catalizam a hidrólise das ligações de ésteres de sulfato em uma grande variedade de substratos, tais como esteroides sulfatados, alguns carboidratos, proteoglicanos e glicolipídeos (SARDIELLO et al., 2005). São descritas na literatura pelo menos três grupos distintos de sulfatases: (I) o primeiro grupo é conhecido como aril-sulfatases, mais estudadas em eucariotos, que apresentam uma única modificação pós-traducional para produzir seu sítio ativo; (II) no segundo grupo está presente a super família α-cetoglutarato-dioxigenase dependente de Fe^{2+}. Essas enzimas requerem α-cetoglutarato como substrato e a presença de oxigênio e Fe^{2+} para essa atividade; (III), grupo definido em 2006 como alkil-sulfatases da super família das metalo-betalactamase, encontradas predominantemente em bactérias gram-negativas (LONG et al., 2011). A função principal das sulfatases bacterianas está na obtenção de enxofre e/ou disponibilização de carbono como fontes de energia para crescimento celular (POGOREVC; FABER, 2003). De forma geral, as sulfatases liberam sulfato (SO_4) a partir de moléculas mais complexas, sendo esta a forma disponível de enxofre para as plantas.

A aril-sulfatase é a sulfatase de sedimento mais amplamente estudada e é responsável pela hidrólise de ésteres de sulfato (ALEF; NANNIPIERI, 1995a), os quais compreendem 40 a 70% do enxofre total de muitos sedimentos (DICK; BREAKWELL; TURCO, 1996).

Diversos estudos têm demonstrado que todas as sulfatases contêm sítio catalítico C_{α}-formylglicina (FGly), resíduos que são essenciais para a atividade das enzimas. A formação de FGly ocorre pós-translacional pela oxidação de resíduos de cisteína que são regiões conservadas tanto em sulfatases eucarióticas quanto em procariotos. Porém muitas espécies de bactérias produzem FGly por oxidação de serina ao invés de cisteína. O qual se localiza na mesma posição do sítio ativo. Sendo assim a classificação de sulfatases em procariotos é dividida em "tipo-Cis" ou "tipo-Ser". Desta forma, assim como encontram-se sítios ativos para funcionamento das sulfatases, há também fatores de modificação que geram produções defeituosas de sulfatases, que são Fator de Modificação de Sulfatase 1 (SUMF1) e AtsB. São fatores de modificação conservados desde bactérias (Figura 2) até eucariotos (SARDIELLO et al., 2005).

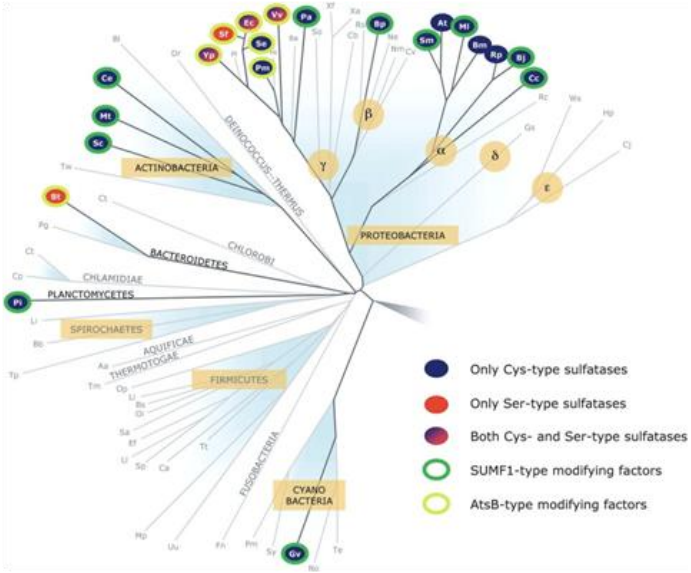


Figura 2 - Árvore filogenética dos genes relacionados a produção de sulfatases e os sítio-ativos que cada uma apresenta (Fonte: SARDIELLO et al., 2005). Planctomycetes apresentam somente sulfatase do tipo-cys (cisteína) com presença de SUM1-fator de modificação

É interessante observar as numerosas sulfatases que aparentemente estão cultivadas em genomas de alguns Planctomycetes marinhos (tais como *Rhodopirellula* spp.), no qual possuem um papel no metabolismo dos polissacarídeos (FUERST; SAGULENKO, 2011) e podem estar supostamente envolvidos no colapso inicial de heteropolissacarídeos sulfatados produzidos por macroalgas (IZUME et al., 2013). Segundo Glöckner et al. (2003), por meio do sequenciamento completo de *Pirellula* sp. estirpe 1 (agora conhecida como *Rhodopirellula* sp.), foi descoberto que essas bactérias alojam um genoma de 110 genes que codificam

proteínas sulfatases de semelhança significativa com procariotos e eucariotos. As sulfatases foram bem reconhecidas para *Rhodopirellula sp*, exceto três tipos de Alkylsulfatase. O fato dos genes de sulfatase de *Rhodopirellula sp.* ultrapassarem em número todos os outros genomas de procariotos, nos levam a perceber mais uma característica desses organismos que mostra sua aproximação dos organismos eucariotos. Como ambientes marinhos são caracterizados por níveis elevados de sulfato inorgânico, como no caso os manguezais, essas bactérias podem usar suas sulfatases para acessar de forma mais eficaz energia de compostos sulfatados. Estes dados sugerem que sulfatase são metabolicamente importantes para *Rhodopirellula* e podem desempenhar um importante papel na degradação de glicopolímeros sulfatados. Tais compostos sulfatados são encontrados em ambientes marinhos, explicando assim a presença dessas bactérias em tais ambientes. Há evidências que *Planctomycetes* representados por *Rhodopirellula baltica* e *Blastopirellula marina* são capazes de degradar polissacarídeos sulfatados de Condroitina. Portanto podem desempenhar funções completamente importantes na reciclagem de nutrientes e nos ciclos do carbono e do enxofre no oceano (IZUMI et al., 2013).

Segundo Storesund e Ovreas (2013) os Planctomycetes possuem uma alta capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono para o metabolismo, e o genoma de *Rhodopirellula baltica* (*Pirellula* sp. estirpe 1) revela que quando o organismo está sob condições aeróbicas de águas livres, o ganho energético provém da oxidação aeróbica de mono e dissacarídeos derivados da clivagem de polímeros de sulfatases. Porém podem mudar para fermentação de ácidos heteroláticas sob condições anóxicas. Isso permite uma importante flexibilidade genética para ambientes versáteis (STORESUND; OVREAS, 2013).

2.1.5 Cultivo de isolados pertencentes ao grupo Planctomycetes

Os Planctomycetes foram considerados como bactérias não cultivadas por muitas décadas. No entanto, após a descrição inicial de um isolado pertencente a este filo (FUERST, 1995) abriu caminho para o cultivo de um grande número de estirpes, obtidas a partir de uma variedade de habitats aquáticos, com diferença de salinidade, pH, ou disponibilidade de nutrientes (LAGE; BONDOSO, 2011; FUERST, 1995; BENGTSSON; OVREAS, 2010; IZUMI et al., 2013; SPETH et al., 2012; STORESUND; OVREAS, 2013). As estirpes encontram-se em muitos ambientes naturais, tanto aquático quanto terrestre. Há muitos exemplos de Planctomycetes que vivem em associação com outros organismos, como corais, crustáceos, esponjas, microalgas, cianobactérias e recentemente em macroalgas como o caso do novo gênero de *Planctomycetes* da nova ordem *Phycisphaerales*, que foi isolado a partir da

superfície de uma macroalga *Porphyra* sp. Estas células são ovais e em forma de pêra com coloração rosada (LAGE; BONDOSO, 2011).

O primeiro relato de isolamento em esponjas marinhas foi principalmente pelo gênero *Aplysina aerophoba* no mar da França, no qual o gênero de *Planctomycetes* isolado foi *Pirellula* sp. que teve um crescimento lento, com colônias em forma de pêra e de cor rosa brilhantes, usando apenas uma fonte de carbono e nitrogênio: N-glicosamina. Esta informação demonstra a capacidade de degradação de quitina (PIMENTEL-ELARDO et al., 2003). Outro isolado de esponjas foi divulgado recentemente em esponjas *Niphates* sp. na Austrália, a abordagem resultou em uma grande coleção de diversidade de Planctomycetes, incluindo novas linhagens de Planctomycetes associados a esponja, bem como em sedimentos da água do mar de Moreton Bay, onde essas esponjas aparecem com freqüência. Os métodos realizados foram plaqueamento direto e cultura enriquecida, onde o primeiro resultou numa maior diversidade. Essas novas linhagens de Planctomycetes revelaram que as células não apresentam um nucleóide condensado e um fenótipo distinto comparando com outros Planctomycetes. Esse estudo sugeriu que para culturas com finalidade de isolar estirpes novas, é mais indicado incorporar polissacarídeos em meios sólidos para o método de plaqueamento direto ao invés de meio enriquecido (IZUMI et al., 2013).

Foram recentemente isolados novos representantes desse grupo, de sistemas hidrotermais do fundo do oceano em depósitos de hidróxido de ferro recém formado e lavas de vulcão basálticas do Oceano Ártico: Artic Mid Ocean Ridge, localizado entre Groenlandia e a Sibéria. Com uma elevada freqüência de microrganismos de Planctomycetes, foram nomeados a *Bythopirellula goksoyri* gen. nov. sp. Esta nova linhagem é relacionada com a única linhagem conhecida da ordem *Phycisphaerales* representada por *Phycisphaera mikurensis* isolados a partir da superfície de algas marinhas *Porphyra* sp. (STORESUND; OVREAS, 2013).

O isolamento de Planctomycetes na superfície da alga *Laminaria hyperborea* do sudeste da Noruega trouxe informações sobre o estilo de vida dos Planctomycetes, no qual mostrou associação com organismos eucarióticos na superfície das algas e a presença de biofilme nas algas mais envelhecidas (BENGTSSON; OVREAS, 2010).

Em larvas de camarão Tigre Gigantes, *Penaeus monodon*, os isolados de Planctomycetes foram obtidos a partir de amostras infectadas ou não com vírus Baculovirus. Independente da infecção os isolados apresentaram cores rosa e alaranjadas e os gêneros destacados foram *Gemmata obscuriglobus* e *Planctomycetes brasiliensis.* Porém cinco dos isolados foram representados por *Pirellula* sp. sem pigmentação (FUERST, 1995).

2.1.6 Microbiologia molecular: acesso a biodiversidade microbiana não cultivada

As análises de sequências comparativas ambientais recuperadas de sequências de genes 16S rRNA (16S rDNA) tornou-se “padrão-ouro” para a avaliação independente de cultivo da diversidade bacteriana nos sistemas naturais e artificiais. Este método tem como base a identificação de genes 16S rDNA em DNA genômico. Isto proporciona uma alta resolução no quadro de distribuição de novas sequências obtidas de 16S rDNA em bibliotecas construídas de amostras ambientais, no qual um terço não é representado por métodos cultiváveis (CHOUARI et al., 2003). As metodologias moleculares desenvolvidas nas últimas décadas (extração de ácidos nucléicos, amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), clonagem e sequenciamento de Ácido Desoxirribonucleico (DNA) têm sido otimizadas e adaptadas para superar as limitações impostas pela abordagem clássica de estudos de comunidades microbianas, adicionando dados aos obtidos com base no isolamento e cultivo dos microrganismos. A utilização destas metodologias vem permitindo uma mudança drástica na perspectiva da diversidade microbiana no ambiente, auxiliando na descrição de novos grupos de organismos nunca antes cultivados (HUGENHOLTZ; GOEBEL; PACE, 1998; RAPPÉ; GIOVANNONI, 2003).

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

Em busca de informações mais relevantes e significativas, pesquisadores passaram a trabalhar com bibliotecas metagenômicas (clones, sequenciamento e inserção de genes em vetores partindo-se de uma amostra composta de um determinado ambiente), sendo esta uma ferramenta muito eficaz (BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000; HUGENHOLTZ; GOEBEL; PACE, 1998; KIM et al., 2006). O uso da estratégia metagenômica permite ainda combinar o escrutínio de genes funcionais com a análise de sequências relacionadas à

filogenia, o que pode representar um mecanismo para se estabelecer relações entre filogenia e função microbiana, auxiliando na elucidação do papel ecológico dos componentes da microbiota no ambiente.

A metagenômica revolucionou a microbiologia abrindo caminho para uma avaliação independente de cultivo e exploração de comunidades microbianas presentes em ecossistemas complexos. O uso do sequenciamento em larga escala para técnicas metagenômicas, resultaram na geração de grandes conjuntos de dados de sequências derivadas de vários ambientes, tais como o sedimento, ambiente marinho e corpo humano. As análises desses conjuntos de dados abriram uma janela para a enorme diversidade taxonômica e funcional das comunidades microbianas ambientais. A combinação de análises baseadas em DNA, RNA e proteína de comunidades microbianas presentes em diferentes ambientes é uma maneira de explicar, composições, funções e interações das comunidades e associá-las aos processos ambientais (SIMON; DANIEL, 2011). Vem também sendo mostrado nos manguezais brasileiros um grande número de dados de sequências metagenômicas e metatranscriptômicas, que revelou os potenciais taxonômicos e aspectos das vias metabólicas por Andreote et al. (2012).

O novo campo da metatranscriptômica utiliza uma abordagem de sequências microbianas, gera o estudo de genes expressos nas comunidades naturais intactas, permitindo-nos compreender os padrões de expressão microbiana. Com metatranscriptômica é possível compreender a diversidade da comunidade microbiana, a transcrição a partir de um tempo e um lugar e reconhecer as comunidades ativas (MORAN, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras e manguezais utilizados no estudo

No presente trabalho foram avaliadas as comunidades microbianas de Planctomycetes presentes em sedimentos de manguezais do Estado de São Paulo, localizados no município de Bertioga. A coleta das amostras que originaram as bibliotecas metagenômicas foi realizada pela equipe técnica da Embrapa Meio Ambiente - CNPMA, no âmbito do Projeto "Biodiversidade e atividades funcionais de microrganismos de manguezais do Estado de São Paulo" (Processo FAPESP nº 04/13910-6).

Para a construção da biblioteca metagenômica as amostras de sedimentos foram coletadas em um manguezal contaminado por derramamento de petróleo (23°53'74'S e 46°12'50'W) (Figura 3). Nesta área, ocorreu no ano de 1983 o derramamento de aproximadamente 35 milhões de litros de petróleo, subdividindo o manguezal em duas áreas: a área próxima ao mar, que sofreu um baixo impacto causado por derramamento de petróleo devido a um córrego que corta o manguezal (BrMg01) (atuando como dreno da contaminação); e as áreas de centro de manguezal e próxima ao continente (BrMg02), que concentraram o contaminante, sendo esta a mais afetada, tanto na sua composição da fauna (caranguejos) como da flora (ausência de plantas de *R. mangle*). A terceira área é composta por todo o manguezal, que se situa aproximadamente 5 km do manguezal contaminado, mas não apresenta tal contaminação (BrMg03), sendo observado neste manguezal apenas um efeito da contaminação antropogênica (Figura 3). Estes manguezais apresentam água de inundação composta por uma mistura entre água do mar e do Rio Iriri. (ANDREOTE et al., 2012).

Para o isolamento de Planctomycetes, a partir dos manguezais em estudo, amostras constaram de um *pool* com todos os pontos das três áreas de estudo, realizada a coleta no dia 10 de abril de 2013, pela manhã com uma temperatura variando entre 20 a 25°C com amostragem em maré baixa. Após a coleta, as amostras foram refrigeradas e levadas ao laboratório onde foram rapidamente submetidas à extração de DNA total.

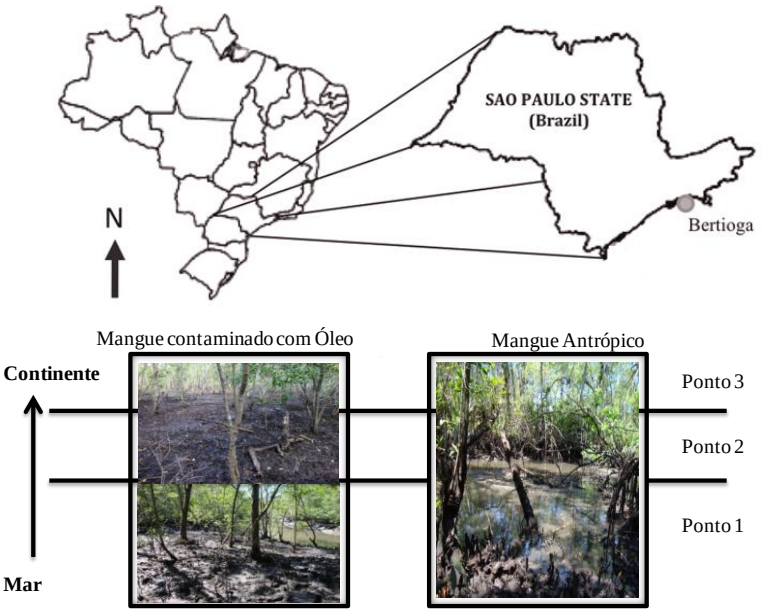


Figura 3 - Local de coleta das amostras de manguezais. Bertioga/SP. Fonte: Modificado de Andreote et al. (2012)

3.2 Busca de clones contendo insertos oriundos de Planctomycetes

A busca de clones contendo insertos afiliados a Planctomycetes foi realizada com base na formação de *pools* de clones (1 placa com 96 clones por *pool*). Estes *pool* foram submetidos a extração de DNA fosmidial e posterior uso em reações de PCR com *primers* específicos (Tabela 1). As reações foram realizadas com parâmetros descritos na literatura.

Tabela 1 - Lista de *primers* utilizados durante o desenvolvimento do estudo

Primers	**Sequência 5'- 3'**	**Referência**
Pla 46F	GGATTAGGCATGCAAGTC	NEEF et al., 1998
1387R	CGGTGTGTACAACGCCCGGGAACG	MARCHESI et al., 1998
Amx 368F	CCTTTCGGGCATTGCGAA	JAYAKUMAR et al., 2009
Amx 820R	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	JAYAKUMAR et al., 2009
Brod 541F	GAGCACGTAGGTGGGTTTGT	PENTON et al., 2006
Brod 1260R	GGATTCGCTTCACCTCTCGG	PENTON et al., 2006
958R	YCCGGCGTTGAMTCCAATT	CYTRYN et al., 2000
27F	GAGAGTTTGATCCTGGCTCA	STUDHOLME et al., 1999
P1	CCTACGGGAGGCAGCAG	MUYZER et al., 1993
P2	ATTACCGCGGCTGCTGG	MUYZER et al., 1993

3.3 Extração de DNA dos sedimentos e obtenção da biblioteca metagenômica

A biblioteca de fosmídeos foi gerada com base nas amostras coletadas na área de maior contaminação, ou seja, ponto BrMg02 da figura 3. Esta etapa foi desenvolvida pela equipe da Dra. Valéria Maia de Oliveira (Unicamp – SP). A metodologia utilizada para a construção de bibliotecas metagenômicas foi a mesma descrita anteriormente por Vasconcellos et al. (2010). Para a validação das bibliotecas, ao menos 30 (trinta) clones de cada biblioteca foram selecionados aleatoriamente. O DNA fosmidial foi extraído como descrito no protocolo do Kit "Fosmidmax DNA Purification" (Epicentre®). Aproximadamente, 500 ng de DNA fosmidial foram então clivados com a enzima de restrição *Bam*HI e o padrão de digestão dos fosmídios, analisado em gel de agarose pulsed field (BioRad®) 1% por eletroforese em campo pulsado (Pulsed-field CHEF DRIII System - BioRad®). Como resultado, foram obtidas 135 placas com 96 poços totalizando 12.960 clones.

3.3.1 Sequenciamento da biblioteca de fosmídeos

O sequenciamento da biblioteca metagenômica foi realizado de duas maneiras. A equipe da Profª. Drª. Valéria M. Oliveira realizou tal etapa utilizando a tecnologia de pirosequenciamento (454 Titanium Flx, Roche), enquanto que a equipe do Prof. Dr. Fernando D. Andreote realizou este mesmo sequenciamento na plataforma Illumina HiSeq2000 (Illumina). O sequenciamento por pirosequenciamento foi realizado pela Macrogen (Coréia do Sul), e o sequenciamento no HiSeq2000 foi feito no Laboratório Multiusuários Centralizado – Genômica Funcional Aplicada à Agropecuária e Agroenergia (Piracicaba, SP, Brasil). Para isto, as 135 placas contendo os clones da biblioteca metagenômica de fosmídeos foram submetidas a extração do DNA fosmidial com uso do kit QIAGEN Large-Construct Kit, sendo estas realizadas separadamente para *pools* contendo 10 placas cada.

Após o sequenciamento, os dados gerados foram analisados no programa CLC Bio (CLC Workbenk 6.0.1), onde foram retiradas as sequências de baixa qualidade e as oriundas de *Escherichia coli* e dos fosmídeos. Com isto apenas as sequências oriundas dos insertos foram obtidas, sendo posteriormente submetidas para anotação na plataforma MG-RAST (*Meta Genome Rapid Annotation using Subsystem Technology*). Como resultado disso, obtivemos um número total de sequências de 1.380.509, no qual 41.985 (5.1%) são os números de sequências exclusivas de Planctomycetes.

3.3.2 Análises *in sílico* das sequências da biblioteca de fosmídeos

A partir do depósito das sequências no banco de dados MG-RAST, foram selecionadas apenas sequências anotadas como pertencentes a *Planctomycetes*. Esta análise foi feita por meio da análise *Best Hit Classification – All annotation source*: M5NR – *e-value*: 1e-5, *Identify*: 60%, *Alignment Length Cutoff*: 15. As sequências selecionadas foram usadas para montagem de contigs, realizada por meio da extração do arquivo fasta contendo as sequências afiliadas a Planctomycetes e posterior montagem dos contigs no programa CLC Bio. Os contigs gerados com tamanho maior do que 3,0 kb foram submetidos a anotação na plataforma *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST), onde estes foram comparados com sequências de genomas já descritos.

3.4 Análise dos dados metagenômicos e metatranscriptômicos de amostras ambientais

Uma análise complementar a realizada com base na biblioteca de fosmídeos foi feita com base em grupos de sequências de DNA e RNA diretamente obtidas das amostras ambientais. O sequenciamento do DNA ambiental foi realizado previamente por Andreote et al. (2012). Para isto, seis amostras de sedimento de cada área em questão foram coletadas separadamente num total de 24 amostras. Alíquotas de 0,3g de sedimento homogeneizado foram submetidas a extração de DNA utilizando Power Soil DNA Isolation Kit –MoBio. Após as extrações foi feito um *pool* com DNA das seis amostras extraídas dos quatro diferentes manguezais (o quarto manguezal está localizado na cidade de Cananéia e não faz parte da pesquisa). Este foi concentrado numa centrífuga á vácuo até um volume final de 10 mL. Utilizou-se um espectrofotômetro (NanoDrop) para obter a quantificação exata do DNA para posterior sequenciamento. A amostra de DNA ambiental foi submetida a pirossequenciamento utilizando a tecnologia 454 GS FLX da Roche Applied Sciences (Indianopolis, IN, EUA). As sequências geradas foram enviadas para o servidor RAST *metagenomic* (MG-RAST) e disponibilizadas para o público (ANDREOTE et al., 2012).

O sequenciamento de RNA ambiental foi realizado pelo Laboratório Multiusuários Centralizado – Genômica Funcional Aplicada á Agropecuária e Agroenergia (Piracicaba, SP, Brasil) por meio do equipamento Illumina HiSeq2000, gerando algo próximo a 10 milhões de *reads* por manguezal estudado. Os RNAs extraídos foram então submetidos ao sequenciamento em larga escala, com a finalidade de se obter um panorama dos RNAs presentes em sedimentos dos distintos manguezais estudados. A necessidade de se utilizar este equipamento especificamente ocorre principalmente devido a alta quantidade de RNA ribossômico nas amostras ambientais. Isto pode ser necessário para permitir de maneira mais

robusta a comparação dos dados de metagenômica com os dados aqui gerados de metatranscriptômica. Resumidamente, o kit utilizado foi o Power Soil DNA Extraction kit (MoBio Labs, Inc. Solana Beach, USA), a partir do qual serão geradas as quantidades necessárias de DNA para este tipo de sequênciamento (normalmente 5µg).

Todas as sequências citadas foram submetidas a remoção de sequências de baixa qualidade, e devidamente preparadas para o envio ao banco de dados MG-RAST. As características de cada uma das abordagens (metagenômica, metatranscriptômica) estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Número total de sequências depositadas no MG-RAST, separadas por área de estudo e abordagem

Objetos de estudo	Número total de sequências
BrMgv1	249.993
BrMgv2	231.233
BrMgv3	214.921
MTBrMgv01 (Metatranscriptômica)	7.562.283
MTBrMgv02 (Metatranscriptômica)	37.594.766
MTBrMgv03 (Metatranscriptômica)	50.723.794

3.4.1 Análises *in sílico* das sequências do DNA e RNA ambiental

Com as sequências depositadas na plataforma MG-RAST, foram realizados estudos sobre possíveis funções relacionadas às sequências de Planctomycetes nas três áreas do manguezal de Bertioga. Para isto, primeiramente foram selecionadas apenas sequências de Planctomycetes (*Best Hit Classification – All annotation source*: M5NR – *e-value*: 1e-5 - *%Identify*: 60% - *Alignment Length Cutoff*: 15), as quais foram separadas e enviadas para análise em *Workbench*. Em seguida foi realizado o levantamento das funções codificadas por tais sequências de DNA, utilizando-se a ferramenta *Hierarchical Classification – Annotation Source: Subsystems (e-value*: 1e-5 - *%Identify*: 60% - *Alignment Length Cutoff*: 15). A partir desses dados foram geradas tabelas contendo as funções observadas para as sequências de Planctomycetes de cada um dos manguezais.

Adicionalmente, foram realizadas análises de busca genômica, onde as sequências de genomas afiliados a Planctomycetes foram usadas como modelo de afiliação para as sequências de DNA e RNA ambiental. Para isto, foram determinados todos os genomas de Planctomycetes disponíveis na plataforma Genomes on Line Database (Gold), e observados

os já disponíveis no banco de dados da plataforma MG-RAST. Observou-se a possibilidade de realizar tal análise com base em 5 genomas distintos (*Blastopirellula marina, Pirellula staleyi, Planctomycetes limnophilus, Planctomycetes brasiliensis* e *Rhodopirellula baltica*), onde foram utilizado os parâmetros *Recruitment Plot – e-value:* 1e-05 – *Abundance scale: linear*.

3.5 Isolamento e sequenciamento de Planctomycetes a partir de amostras de sedimentos de manguezais

O isolamento dos organismos alvo foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Lage; Bondoso (2012). Primeiramente, as amostras coletadas dos manguezais de Bertioga compuseram um *pool*, o qual foi usado para o isolamento. A partir deste *pool*, foi separada uma quantidade de 500g, usada para o preparo de três sub-amostras, sendo a primeira representada pelo sedimento bruto, a segunda pelo sedimento lavado com água do mar e peneirado; e a terceira composta pelo sedimento lavado, peneirado e centrifugado à 5000 RPM por 30 minutos. Nesta terceira preparação, o sobrenadante foi descartado e restante acrescido com 2mL de PBS 1X autoclavado (137 mM NaCl: 8g/ 2,7 mM KCl: 0,2g/ 10 mM Na_2PO_4 anidro: 1,189g/ 2 mM KH_2PO_4: 0,2g/ água destilada: 1L) e aferido o PH para 7,0.

Os meios de cultura realizados foram os M13 e M14 (LAGE; BONDOSO, 2012) (Anexo A). Estes meios de cultivo foram acrescentados de Solução de Vitaminas, Solução de metais 44 (LAGE; BONDOSO, 2012) e solução de sais – Hunter's basal salts (LAGE; BONDOSO, 2012).

Os meios de cultivo foram incubados seguindo orientações de Lage; Bondoso (2012), sendo inoculadas suspensões celulares obtidas a partir das amostras de sedimentos. As placas foram então incubadas a uma temperatura de 20°C, sem presença de luz por um período aproximado de 70 dias. A partir do qüinquagésimo dia foi possível observar o surgimento de colônias de bactérias com a cor rósea (Figura 4), indicador da presença de bactérias afiliadas ao filo *Planctomycetes*.

Figura 4 - Colônias de Planctomycetes - apresentam pigmentação rósea

As colônias obtidas foram repicadas em novo meio de cultivo, e parte de suas biomassas foi usada para identificação dos microrganismos. Para isto, foram inicialmente observadas características de morfologia e coloração das bactérias, de acordo com o artigo de Lage e Bondoso (2012). Foram assim selecionadas as colônias de cor rosada, salmão e algumas outras em tons mais claros. Estas foram armazenadas em temperatura de -80°C em suspensão celular a 50% de glicerol. Um total de 80 colônias foram obtidas e armazenadas por meio deste procedimento.

A identificação molecular se deu por meio de extração de DNA de tais colônias, realizadas por meio de quebra celular por *bead beating*, seguida de purificação do DNA com fenol e clorofórmio (ANDREOTE et al., 2007). Com DNA devidamente extraído, foram realizadas PCRs para amplificação do gene ribossomal 16S RNAr, com os *primers* 8F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1541R (5' AAGGAGGTGATCCAGCCGACA 3') (LÖFFLER et al., 2000) com tamanho de fragmento aproximado de 1533 pb. Na reação de PCR foram usados 2,5 de taq buffer, 1,5 de $MgCl_2$, 2,5 de DNTP, 1,0 *primer* 8F (10pmol), 1,0 *primer* 1541R (10pmol), 0,2 taqDNA polimerase. O programa usado no termociclador segue: 94°C em 3 minutos, 30 ciclos de (94°C em 45 segundos, 55°C em 30 segundos, 72°C em 2 minutos), 72°C em 7 minutos. Em seguida, corrido em gel de agarose 1,2% sobre uma velocidade de 80V.

A purificação da PCR foi realizada através do Kit de purificação *ChargeSwitch PCR Up kit Ivitrogen*. Em seguida foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 2 porcento e assim foram confirmadas as bandas de tamanho correto. Das 80 amostras, 20 foram enviadas

para *sequência*mento, que foram realizados pela equipe da Prof. Dra. Valéria Maia de Oliveira (Unicamp/Campinas-SP) pelo método Sanger ABI3500.

3.5.1 Análise filogenética

As sequências afiliadas à Planctomycetes foram comparadas às sequências de Planctomycetes descritos ou não como responsáveis pela via anammox. 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.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Busca de clones contendo insertos oriundos de Planctomycetes

Após a extração dos DNAs totais e fosmidiais, iniciou-se os testes para as reações de PCR, inicialmente realizadas com os *primers* descritos na tabela 1. Inicialmente foi realizada uma reação de PCR com gradiente, buscando-se determinar a temperatura de anelamento ideal para os *primers* PLA46F e 1387R, determinada em 53°C (Tabela 1). No entanto, este par de *primers* sempre gerou um perfil de bandas em todas as amostras de DNA (pools de clones e DNA ambiental), indicando dentre as bandas obtidas aquelas com tamanho esperado. No intuito de identificar fragmentos gerados com tamanho aproximado do gene de interesse foi realizado o sequenciamento de Sanger, após a excisão e purificação das bandas desejadas. O resultado revelou que os fragmentos amplificados eram afiliados ao grupo das *Escherichia coli*. Assim, a metodologia empregada com uso de reações de PCR não foi satisfatória para busca de clones positivos de insertos contendo sequências afiliadas ao grupo Planctomycetes. Posteriormente, as combinações de diferentes *primers* (Tabela 1), citados pela literatura como marcadores de bactérias anammox, foram utilizadas para testes em PCR (Brod541F e Brod1260R; Amx368F e Amx1260R; Pla46F e Amx1260R); porém, nenhuma combinação resultou na amplificação de fragmentos com tamanhos esperados. A partir de então, foi concluído que esta estratégia não atenderia as necessidades do projeto e abordagens *in sílico* foram empregadas para a busca de sequências de interesse.

4.2 Análise *in sílico* das sequências obtidas da biblioteca de fosmídeos afiliadas a Planctomycetes

Uma vez que há a disponibilidade de sequências obtidas diretamente da biblioteca de fosmídeos, a primeira estratégia foi analisar aquelas afiliadas ao grupo de interesse. Para tanto, foram selecionadas na plataforma MG-RAST as sequências que mostraram melhor clusterização com Planctomycetes. Estas foram selecionadas e submetidas a montagem de contigs, sendo obtidos a partir de 41.985 sequências um total de 28 contigs maiores do que 3.000 pb.

Tais grupos de sequências foram anotadas automaticamente na plataforma RAST, onde foi confirmada a afiliação das mesmas ao grupo desejado (*Blastopirellula marina DSM 3* e *Pirellula* sp.1). Os resultados evidenciam certa similaridade entre as regiões cromossômicas dos insertos fosmidiais com as regiões já descritas de genomas presentes na plataforma RAST (Anexo B). Pode-se ainda notar, que existem diferenças na organização dos genes entre as sequências obtidas neste estudo e aquelas já previamente disponíveis na

plataforma RAST. Isto pode indicar a ocorrência de arranjos gênicos endêmicos em tais organismos, adicionando informação aos estudos que indicam a presença de genes com sequências endêmicas no ambiente de manguezais, como já descrito para os genes *nifH* (TAKETANI et al., 2010; DIAS et al., 2012b) e *dsrB* (VARON-LOPEZ et al., 2013). Tais observações são extremamente importantes, pois evidenciam mais uma vez os manguezais como reservatório de diversidade específica, onde podem ocorrer novos grupos ou novas organizações gênicas de organismos afiliados a Planctomycetes. Segundo Glöckner e colaboradores (2003), os Planctomycetes possuem uma versatilidade ambiental que exige uma complexidade genética melhorada, abrigada comumente em genomas maiores. Percebe-se através das análises realizadas no servidor RAST (Anexo B), que a maioria dos contigs afiliam-se ao genoma descrito para a espécie *Blastopirellula marina*. Há um total de 107.293 bp, divididos nos 28 contigs maiores que 3.000 bp. Desses encontra-se um total de 63 genes, sendo 3 relacionados a produção de sulfatases.

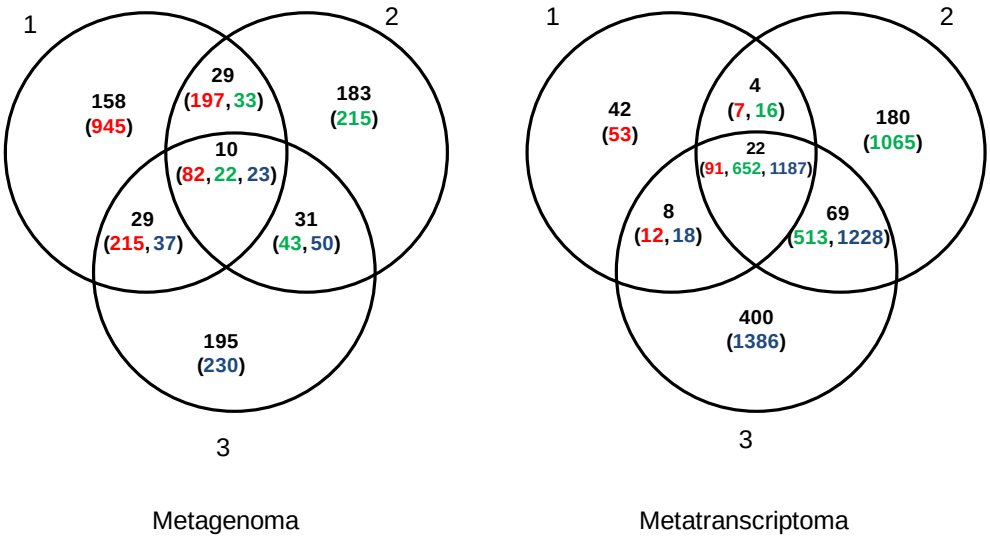
Dos gêneros cultiváveis como: *Planctomyces, Pirellula, Blastopirellula, Rhodopirellula, Gemmata, Isosphaera, Singulisphaera, Schlesneria, Zavarzinella* e *Phycisphaera, Aquisphaera* (SCHLESNER et al., 2004; WARD et al., 2006; KULICHEVSKAYA et al., 2008; UKUNAGA et al., 2009; BONDOSO et al., 2011), os que mostraram-se alinhar as sequências da biblioteca de fosmídeo foram *Planctomycetes, Blastopirellula marina DSM3* e *Pirellula* sp.1, apresentando funções como a presença de tipos diferentes de enzimas de sulfatase, proteína hipotética, transporte de ATP, indicando a atividade destas enzimas nas áreas de manguezal em estudo. Segundo Glöckner e colaboradores (2003), a partir desse breve conhecimento sobre os genes que mais marcam presença nos gêneros, pode-se propor um certo estilo de vida desse grupo como: ganhos de energia a partir da oxidação aeróbica de mono ou dissacarídeos derivados da clivagem de polímeros sulfatados produzidos por algas; expressão de carotenóides e proteção a radiação ultra violeta (UV) nas superfícies das águas, no qual os microrganismos marinhos são expostos levando a um dano direto no DNA, diminuição no crescimento e sobrevida, fotoinibição da fotossíntese e branqueamento de sua pigmentação (VIANA; LAGE; OLIVEIRA, 2013); transportes de nitrato que sustenta o crescimento mesmo em condições limitadas de nitrogênio entre outros. Segundo Jeske e colaboradores (2013) Planctomycetes possuem um complexo ciclo de vida e uma complexa biologia celular, o que o diferente das demais bactérias e possuem uma diferente sinalização de moléculas bioativas, que estão relacionadas a sua resistência a antibióticos.

4.3 Análises *in sílico* das sequências de DNA e RNA ambiental afiliadas a Planctomycetes

Nestas análises foram analisadas as sequências de DNA e RNA obtidas do sequenciamento direto do material genético extraído dos sedimentos de manguezais. Inicialmente, foram identificadas as sequências afiliadas ao grupo Planctomycetes por meio do recrutamento das sequências em genomas de Planctomycetes presentes no banco de dados *Genome Gold Database* (http://www.genomesonline.org/cgi-bin/GOLD/index.cgi).: *Blastopirellula marina*, *Pirellula staleyi*, *Planctomycetes limnophilus*, *Planctomycetes brasiliensis*, *Rhodopirellula baltica*.

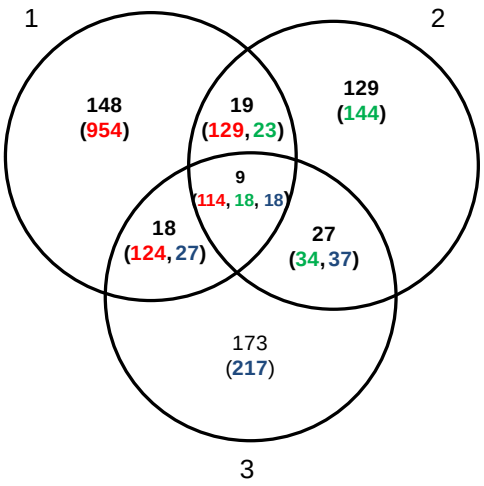
As sequências alocadas neste grupo foram classificadas de acordo com sua função, dando origem a Diagramas de *Venn* (Figuras 5 a, b, c, d, e), que indicam o número de funções exclusivas e comuns entre as áreas de manguezais estudadas. Dentre os genomas utilizados, os que apresentaram maior número de funções com sequências alocadas foram: *Rhodopirellula baltica* (40 funções) e *Pirellula staleyi* (34 funções).

a) *Blastopirellula marina*

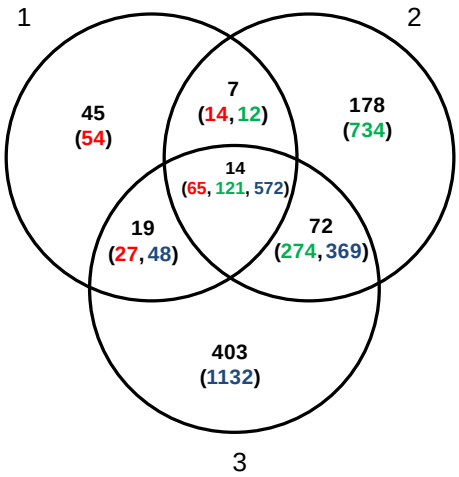


Metagenoma Metatranscriptoma

b) *Pirellula staleyi*

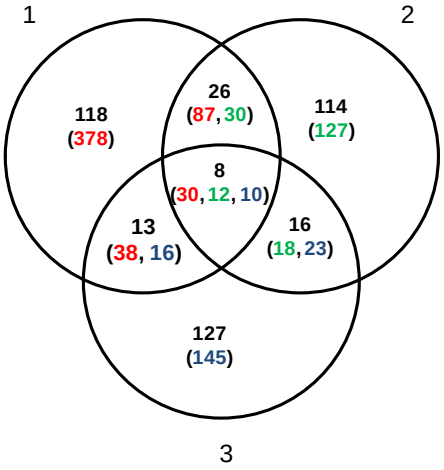


Metagenoma

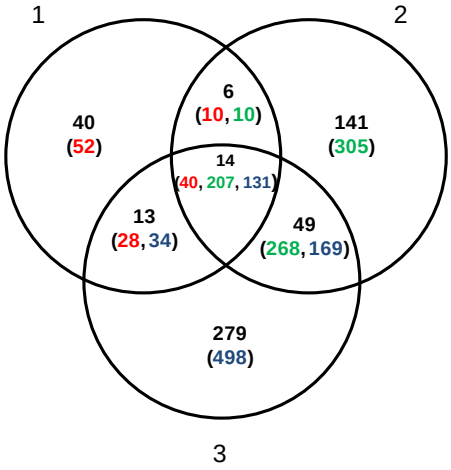


Metatranscriptoma

c) *Planctomycetes brasiliensis*

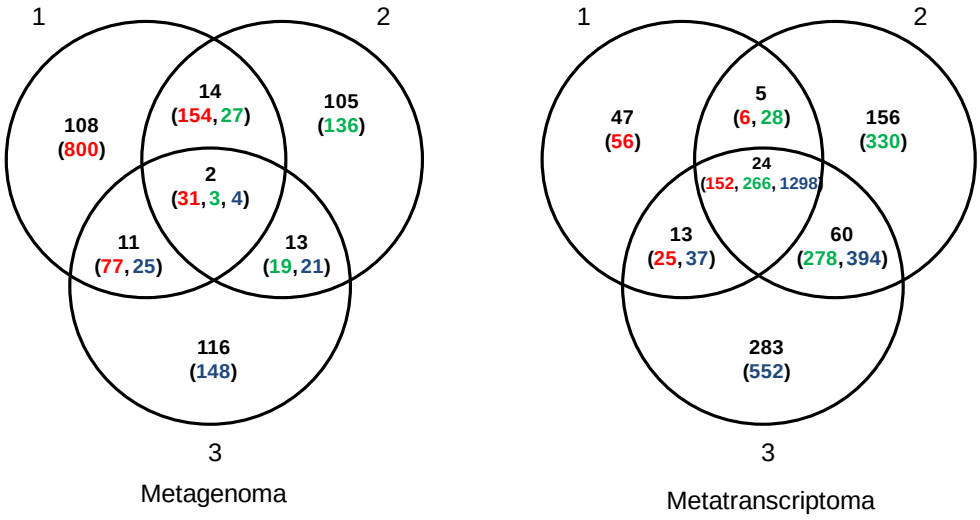


Metagenoma



Metatranscriptoma

d) *Planctomycetes limnophilus*



e) *Rhodopirellula baltica*

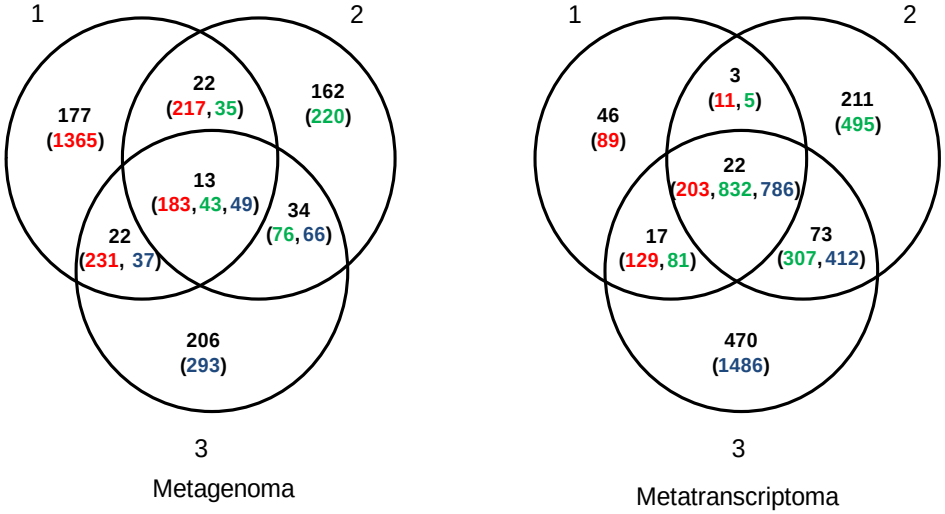


Figura 5 a, b, c, d e - Diagramas de *Venn* representando o número de funções e a quantidade de sequências encontradas relacionadas a cada função, visualizada em cada Planctomycete para cada manguezal. Os valores em negrito indicam o número de funções. Os valores em vermelho representam o número de sequências presentes em BrMgv 01; os valores em verde: sequências presentes em BrMgv 02; e os números em azul: sequências presentes em BrMgv03

Comparando as funções encontradas em cada um dos manguezais estudados, verificou-se um menor número (2) comparado com o total de *reads* mapeados (4195) que ocorreram em comum em todas as áreas estudadas e em todos os genomas estudados. A função que mais se manteve presente em toda a análise dos três manguezais analisados com base na metagenômica foi a função das sulfatases. Já com base na metatranscriptômica, somente duas enzimas sulfatase em toda a análise foi levantada. Isso pode ser explicado por duas justificativas: *i.* Baixa expressão. Há sulfatases, porém elas podem não estar sendo expressadas. *ii.* Sequência de RNA total. Nesse caso, as sequências enviadas para análise foram sequências de RNA total, no qual 95% é RNA ribossomal e 5% restante é RNA mensageiro, o RNA mensageiro nesse caso é subestimado, levando a crer nesse dado de baixa expressão de sulfatase. Os Planctomycetes apresentam capacidade em produzir enzimas de sulfatases, enzimas importantes para obtenção de nutrientes e para seu metabolismo no ambiente de manguezal. Entre os genomas analisados destaca-se *Rhodopirellula báltica*, gênero que codifica 110 genes relacionados à sulfatases (GADLER; FABER, 2006). Segundo Jeske e colaboradores (2013) essas enzimas sulfatases são de grande importância biotecnológica. Sulfatos de condroitina são polissacarídeos de cadeias compostas ramificadas de dissacarídeos, compostos de N-acetilgalactosamina e ácido D-glucurônico, sendo tais compostos usados no metabolismo de *R. baltica* isolado de ambientes marinhos.

4.3.1 Análise das sequências de Planctomycetes similares a sulfatases

Devido a sua grande abundância dentro dos grupos de sequências avaliadas, as sequências de sulfatases foram analisadas de forma mais detalhada. Inicialmente, pode-se observar que estas são mais abundantes no ponto BrMgv01. Os números de *reads* encontrados em cada amostra dos manguezais acessados foram: 4814, 1166, 1096 para os manguezais BrMgv01, BrMgv02 e BrMgv03, respectivamente (Figura 6).

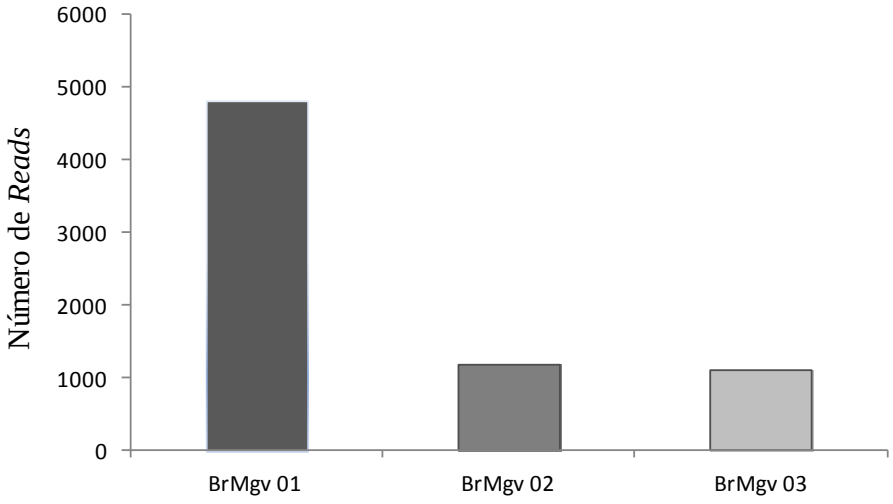


Figura 6 - Gráfico de abundância de sulfatases. Número de *reads* similares a sulfatase encontrado nos manguezais em estudo por meio das análises *in sílico* de sequências do MG-RAST

O fato da área BrMgv01 apresentar um maior número de *reads* de abundância de sulfatases, pode estar relacionado a abundância das bactérias do filo *Planctomycetes* neste ambiente. Através de dados do servidor MG-RAST, obtivemos em número a quantificação dessas bactérias que representam em abundância: BrMgv01- 1.950; BrMgv02- 432 e BrMgv03- 447. Contudo, comprova-se uma maior atividade de microrganimos Planctomycetes expressando suas enzimas sulfatases na área BrMgv01. Segundo Andreote e colaboradores (2012) a diversidade e comunidade bacteriana desempenham um papel essencial no funcionamento e manutenção do ecossistema. E essa comunidade bacteriana presente no sedimento de manguezal é influenciada pela biogeografia, propriedades ecológicas incluindo cadeia alimentar do ecossistema, ciclagem de nutrientes bem como a presença de matéria orgânica e inorgânica. Todas essas características nos levam ao entendimento do ecossistema preferencial dos Planctomycetes no manguezal em estudo, nos trazendo um maior entendimento sobre sua presença nessa área de estudo. Segundo Varon-Lopez e colaboradores (2013) o manguezal BrMgv01 apresenta os maiores valores de potencial redox, provavelmente devido a sua maior abundância de espécies de mangue (*Rhizophora mangle, Avicennia shaueriana* e *Laguncularia racemosa*), os quais geram maior aeração pela liberação de oxigênio das raízes, aumentando consequentemente o valor do potencial redox (Eh). O Eh nos manguezais varia de -200 a +150 mV de acordo com a movimentação das marés trazendo condições anaeróbicas frequentes (ANDREOTE et al., 2012; VARON-LOPEZ et al., 2013). Entretanto, esses dados sugerem novamente a um possível endemismo da comunidade de Planctomycetes nos manguezais em estudo,

preferencialmente ao manguezal BrMgv01, assim como existe a comprovação de que há uma diferença na comunidade e diversidade bacteriana nas diferentes áreas de manguezal em estudo (VARON-LOPEZ et al., 2013).

4.4 Isolamento, seleção e filogenia de bactérias afiliadas ao grupo de Planctomycetes

A possibilidade de isolamento de Planctomycetes a partir das amostras de manguezais mostrou-se bastante promissora, uma vez que após os procedimentos descritos no item 3.5 as placas permaneceram incubadas por 50 dias, a partir dos quais observou-se o surgimento de colônias com características similares às descritas como as afiliadas ao grupo alvo de estudo.

Após o isolamento das colônias obtidas, estas foram submetidas a identificação por sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S DNAr. No total, 20 isolados foram identificados, sendo 18 destes pertencentes ao grupo dos *Planctomycetes* (Tabela 3).

Tabela 3 - Identificação dos isolados afiliados por *Planctomycetes* por meio de comparação das sequências obtidas com as presentes no Genbank (BlastN) (continua)

Isolado	Gêneros com afiliação	Identidade (%)
JEA-1	*Planctomycetes* sp.	95%
	Rhodopirellula sp.	93%
	Pirellula sp.	93%
JEA-2	*Planctomycetes* sp.	93%
	Pirellula sp.	92%
	Rhodopirellula sp.	91%
JEA-3	*Planctomycetes* sp.	96%
	Pirellula sp.	94%
	Rhodopirellula sp.	93%
JEA-4	*Planctomycetes* sp.	96%
	Pirellula sp.	95%
	Rhodopirellula sp.	94%

Tabela 3 - Identificação dos isolados afiliados por *Planctomycetes* por meio de comparação das sequências obtidas com as presentes no Genbank (BlastN) (continuação)

Isolado	Gêneros com afiliação	Identidade (%)
JEA-5	*Planctomycetes* sp.	98%
	Pirellula sp.	98%
	Blastopirellula marina	93%
JEA-6	*Planctomycetes* sp.	98%
	Pirellula sp.	98%
	Blastopirellula sp.	97%
JEA7	*Planctomycetes* sp.	92%
	Blastopirellula marina	91%
	Pirellula sp.	87%
JEA-8	*Planctomycetes* sp.	98%
	Blastopirellula marina	96%
	Pirellula sp.	94%
JEA-9	*Planctomycetes* sp.	97%
	Pirellula sp.	97%
	Blastopirellula sp.	97%
JEA-10	*Planctomycetes* sp.	95%
	Blastopirellula marina	93%
	Pirellula sp.	91%
JEA-11	*Planctomycetes* sp.	84%
	Blastopirellula sp.	84%
	Pirellula sp.	84%
JEA-12	*Planctomycetes* sp.	97%
	Pirellula sp.	97%
	Blastopirellula sp.	97%

Tabela 3 - Identificação dos isolados afiliados por *Planctomycetes* por meio de comparação das sequências obtidas com as presentes no Genbank (BlastN) (conclusão)

Isolado	Gêneros com afiliação	Identidade (%)
	Planctomycetes sp.	97%
JEA-13	*Pirellula* sp.	97%
	Blastopirellula sp.	96%
	Planctomycetes sp.	98%
JEA-14	*Pirellula* sp.	97%
	Blastopirellula sp.	97%
	Planctomycetes sp.	98%
JEA-16	*Pirellula* sp.	98%
	Blastopirellula sp.	97%
	Planctomycetes sp.	98%
JEA-17	*Blastopirellula marina*	96%
	Pirellula sp.	93%
	Planctomycetes	96%
JEA-18	*Pirellula*	96%
	Blastopirellula marina	93%
	Planctomycetes sp.	97%
JEA-19	*Blastopirellula marina*	96%
	Pirellula sp.	92%

Uma vez que os gêneros que mostraram maiores similaridades com os isolados foram *Planctomycetes*, *Blastopirellula* e *Pirellula*, a filogenia dos isolados foi melhor estudada numa árvore filogenética (Figura 7), onde foram comparadas as sequências obtidas com aquelas já descritas como afiliadas a *Planctomycetes*.

Segundo Lage, Bondoso e Cunha (2013) embora os Planctomycetes normalmente se apresentam em baixa abundância, eles foram observados em uma ampla variedade de habitats terrestres e aquáticos o que reflete sua adaptação a diferentes estilos de vida e ambiente. Os membros desse grupo podem ser encontrados na água do mar, hipersalina, salobra, água fresca, e em muitos ambientes terrestres, incluindo solos e ambientes ácidos, água doce

(LAGE, 2013). Encontrados em macroalgas, em associações com vários organismos eucarióticos como camarões, esponjas e corais, florações de microalga. A maioria dos Planctomycetes são considerados halofílicos, mesófilos, quimioheterotróficos e gram-negativos (LAGE; BONDOSO; CUNHA, 2013).

Na organização filogenética, foi possível observar que os isolados JEA 5-6-9-11-12-13-14-16-18 se agrupam com *Planctomycetes* Zi62, isolado a partir de fontes anaeróbicas de enxofre no sudoeste de Oklahoma (ELSHAHED et al., 2007). A caracterização detalhada de Zi62 revelou sua capacidade em reduzir o enxofre elementar em sulfeto sob condições anaeróbicas, bem como sua capacidade em produzir ácidos a partir de açúcares. Ambas as características permitem o seu crescimento e sobrevivência em condições anaeróbicas com presença de enxofre, como as encontradas em sedimentos de manguezais. Alguns isolados também se agruparam à *Planctomycetes* str.116, revelado em comunidades de biofilme bacteriano (MOSS et al., 2006). Já os isolados JEA 7-8-10-17-19 se agruparam ao gênero *Blastopirellula marina,* que apresente isolados obtidos à partir de estações de tratamento de água (CHOUARI et al., 2003). Os isolados JEA 1-2-3-4 se agruparam com um grupo de isolados identificados como *Rhodopirellula* sp. e *Rhodopirellula baltica*, *Pirellula* e *Planctomycetes*. Assim, não houve nenhum agrupamento dos isolados obtidos neste trabalho com o clado que hospeda os grupos de Planctomycetes relacionados ao processo de anammox.

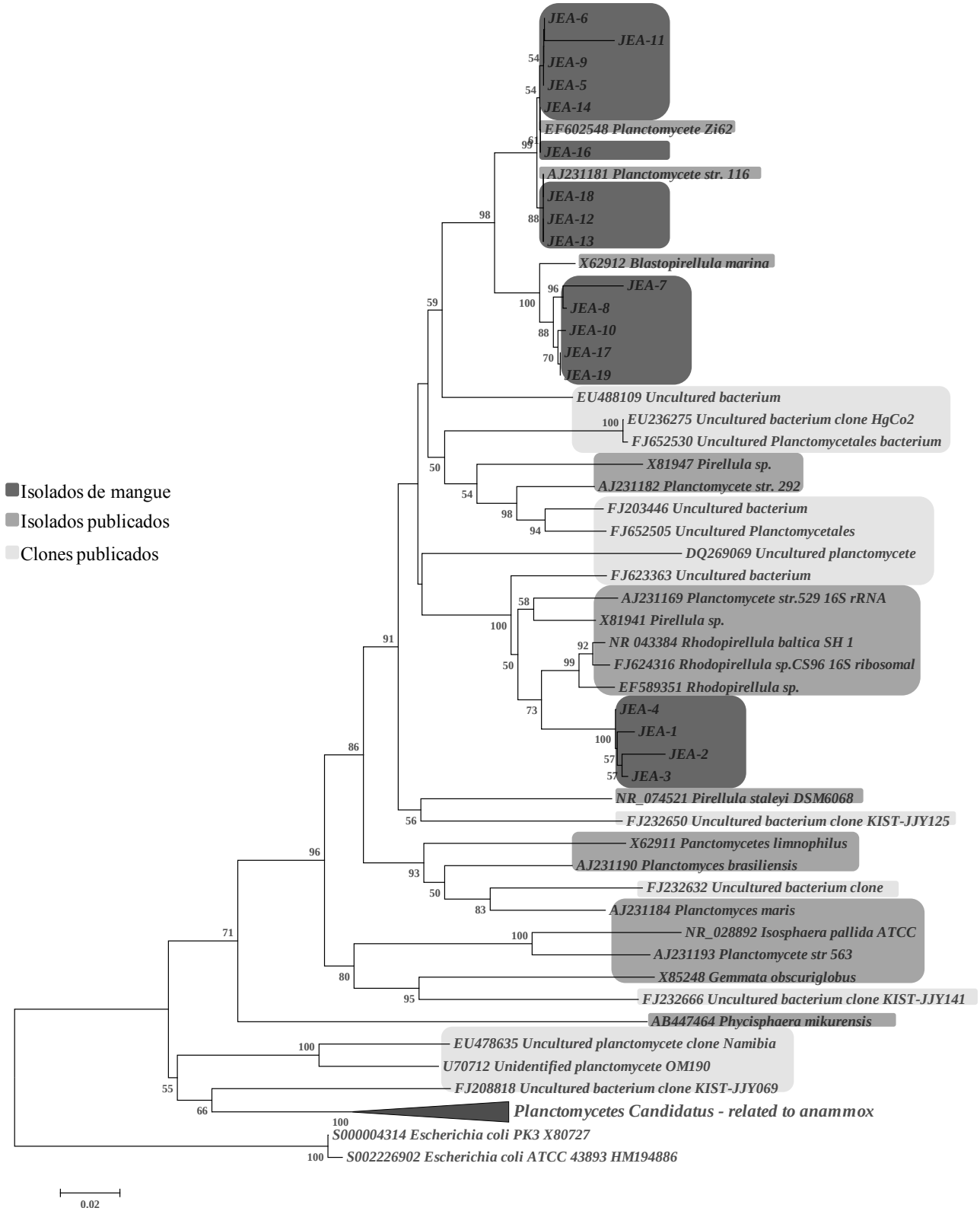


Figura 7 - Árvore filogenética realizada para sequências afiliadas à *Planctomycetes*, gene 16S RNAr. A filogenia foi determinada pelo método *Neighbor joining* e a relação entre as sequências foi inferida usando método *muscle*; os dados observados nos ramos indicam valores de *bootstrap* acima de 50%, total de 1000 repetições. Foram utilizadas sequências de isolados identificados à *Planctomycetes*, além sequências obtidas da literatura

Um fato adicional que chama a atenção é a possível formação de subgrupos contendo apenas isolados obtidos no presente estudo. Este fato pode estar relacionado ao endemismo do ambiente, já observado para grupos de plantas e alguns animais, mas jamais comprovado para grupos microbianos. Neste estudo, podemos observar tais subgrupos nos ramos que alocam isolados de *Plantomycetes* e *Blastopirelulla* (Figura 7), sugerindo que mesmo que pertencentes a este gênero, podem ocorrer espécies particulares nas áreas estudadas. Isto vai de encontro ao que foi comentado anteriormente para a análise de agrupamentos gênicos, e condiz com a literatura que mostra a formação de clusters púnicos para outros genes estudados, como aqueles associados a ciclagem de nitrogênio (DIAS et al., 2012b) e enxofre (TAKETANI et al., 2010; VARON-LOPEZ et al., 2013). O endemismo de tal ambiente, uma vez comprovado, pode indicar que os manguezais devem ser melhor explorados na descrição de novos grupos microbianos, e possivelmente, de novas rotas metabólicas, que podem servir tanto para a melhor compreensão dos ciclos biogeoquímicos, até para uma melhor exploração biotecnológica de grupos microbianos encontrados em manguezais.

Por fim, vale a pena destacar que uma vez cultivados, tais isolados deverão ser usados em estudos metabólicos e de ecologia, além de serem candidatos a terem seus genomas decifrados, o que pode auxiliar na confirmação do endemismo de Planctomycetes em sedimentos de manguezais.

5 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho mostra a detecção de sequências e a confirmação da ocorrência de organismos afiliados ao filo *Planctomycetes* em sedimentos de manguezais de Bertioga, São Paulo. Além da detecção, a detecção de sequências de RNA afiliadas a tais organismos comprova a funcionalidade dos mesmos nas condições encontradas nos manguezais estudados.

Em relação a metodologia, primeiramente foi observado que a busca de clones em uma biblioteca metagenômica, com base na PCR com primers descritos na literatura, não foi satisfatória, sendo os fragmentos gerados posteriormente afiliados a *E. coli* (célula hospedeira dos insertos fosmidiais).

Em contrapartida, a detecção de sequências relacionadas a Planctomycetes de amostras de DNA e RNA ambiental foi de grande sucesso. Estas análises indicaram a afiliação de tais sequências a genomas descritos de Planctomycetes, e revelaram a ocorrência de sequências codificadoras de sulfatases neste ambiente. A produção de tais enzimas pode estar relacionada ao metabolismo destes organismos nos sedimentos de manguezais, sendo este ponto ainda carente de estudos mais detalhados.

As análises *in silico* das sequências da biblioteca de fosmídeos confirmaram a ocorrência de sequências de Planctomycetes, destacando novamente a ocorrência de genes relacionados a produção de sulfatases. No entanto, esta análise evidenciou, a partir dos 28 contigs analisados, a possível ocorrência de arranjos gênicos endêmicos em tais organismos. Tal observação corrobora as observações feitas com base nos isolados obtidos neste estudo, sendo estes afiliados aos grupos *Blastopirellula marina*, *Pirellula* sp., *Planctomycetes* sp., mas por vezes alocados em clados distintos dos compostos pelos organismos já descritos.

Este trabalho nos apresenta pela primeira vez um estudo focado no grupo Planctomycetes. Devido ao pouco conhecimento que se tem sobre tais organismos, esta é a primeira descrição da ocorrência dos mesmos em manguezais, o que faz o estudo descritivo, e gerador de novos temas de trabalho, que deverão ser posteriormente desenvolvidos. Uma vez determinada a ocorrência e a funcionalidade dos mesmos, tanto o funcionamento específico de metabolismos específicos (sulfatases), como a organização do genomas de tais organismos deverão ser alvo de estudos posteriores, que darão base a um melhor entendimento do ambiente encontrado nos sedimentos dos manguezais.

REFERÊNCIAS

ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry.** London: Academic Press, 1995. 576 p.

ALONGI, D.M.; SEKUMAR, A.; TIRENDI, F.; DIXON, P. The influence of stand age on benthic decomposition and recycling of organic matter in managed mangrove forests of Malaysia. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology,** Amsterdam, v. 225, p. 197-218, 1998.

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, 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.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. **Trees: Structure and Function,** Berlin, v. 16, p. 159-166, 2002.

BENGTSSON, M.M.; OVREAS, L. *Planctomycetes* dominate biofilms on surfaces of the kelp Laminaria hyperborea. **BMC Microbiology,** New York, v. 10, p. 261, 2010.

BONDOSO, J.; ALBUQUERQUE, L.; NOBRE, M.F.; LOBO-DA-CUNHA, A.; COSTA, M.S.; LAGE, O.M. *Aquisphaera giovannonii* gen. nov., sp. nov., a *Planctomycete* isolated from a freshwater aquarium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 61, p. 2844-2850, 2011.

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.; SCHOUTEN, S.; JETTEN, M.; DAFFONCHIO, D. Anammox bacterial populations in deep marine hypersaline gradient systems. **Extremophiles**, Tokyo, v. 17, n. 2, p. 289-299, 2013.

BUCKLEY, D.H.; HUANGYUTITHAM, V.; NELSON, T.A.; RUMBERGER, A.; THIES, J.E. Diversity of *Planctomycetes* in soil in relation to soil history and environmental heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 72, n. 7, p. 4522-4531, 2006.

BULL, A.T.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology,** New York, v. 64, p. 573-606, 2000.

BUTLER, M.K.; FUERST, J.A. Comparative analysis of ribonuclease P RNA of the *planctomyectes*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** Reading, v. 54, p. 1333-1344, 2004.

CHOUARI, R.; PASLIER, D.L.; DAEGELEN, P.; GINESTET, P.; WEISSENBACH, J.; SGHIR, A. Molecular evidence for novel *Planctomycete* diversity in a municipal wasterwater treatment plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 12, p. 7354-7363, 2003.

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

CURY, J.C. **Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado por petróleo.** 2002. 84 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

CYTRYN, E.; MINZ, D.; OREMLAND, R.S.; COHEN, Y. Distribution and diversity of Archaea corresponding to the limnological cycle of a hypersaline stratified lake (Solar Lake, Sinai, Egypt). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 8, p. 3269-3276, 2000.

DIAS, A.C.F.; ANDREOTE, F.D., RIGONATO, J.; FIORE, F.M.; MELO, I.S.; ARAÚJO, W.L. The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. **Antonie van Leeuwenhoek**, 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. Interespecific variation of the bacterial community structure in the phyllosphere of the three major plant components of mangrove florests. **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, M.C.P.; COTTA, S.R.; DINI-ANDREOTE, F.; SOARES JR, F.L.; SALLES, J.F.; AZEVEDO, J.L.; van ELSAS, J.D.; ANDREOTE, F.D. Abundance and genetic diversity of nifH gene sequences in anthropogenically affected Brazilian mangrove sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 22, p. 7960-7967, 2012b.

DICK, R.P.; BREAKWELL, D.P.; TURCO, R.F. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrated microbial indicators. In: DORAN, J.W.; JONES, A.J. (Ed.). **Methods for assessing soil quality.** Madison: Soil Science Society of America, 1996. p. 107-121.

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

EDGAR, R.C. Local homology recognition and distance measures in linear time using compressed amino acid alphabets. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, n. 1, p.380-385, 2004.

ELSHAHED, M.S.; YOUSSEF, N.H.; LUO, Q.; NAJAR, F.Z.; ROE, B.A.; SISK, T.M.; BÜHRING, S.I.; HINRICHS, K.U.; KRUMHOLZ, L.R. Phylogenetic and metabolic diversity of *Planctomycetes* from anaerobic, sulfide-and sulfur-rich Zodletone Spring, Oklahoma. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 15, p. 4707-4716, 2007.

EYSINK, G.G.J.; POFFO, I.R.F. Recuperação de manguezais: proposta pedagógica para programas de educação ambiental. In: HAMMER, V.S. **Educação ambiental para o desenvolvimento sustentável.** Brasília: Embrapa Informática e Tecnologia, 2002. v. 5, p. 130.

FELLER**,** I.C.; SITNIK, M. **Mangrove ecology.** Washington: Smithsonian Institution, 1996. 129 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.

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

FUERST, J.A. The *Planctomycetes*: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. **Microbiology**, Reading, v.141, n.7, p. 1493-1506, 1995.

FUERST, J.A.; SAGULENKO, E. Beyond the bacterium: *Planctomycetes* challenge our concepts of microbial structure and function. **Nature Reviews,** 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.

GADLER, P.; FABER, K. New enzymes for biotransformations: microbial alkyl sulfatases displaying stereo- and enantioselectivity. **Trends in Biotechnology,** Amsterdam, v. 25, n. 2, p. 83-88, 2006.

GLÖCKNER, F.O.; KUBE, M.; BAUER, M.; TEELING, H.; LOMBARDOT, T.; LUDWING, W.; GADE, D.; BECK, A.; BORZYM, K.; HEITMANN, K.; RABUS, R.; SCHLESNER, H.; AMANN, R.; REINHARDT, R. Complete genome sequence of the marine *Planctomycete Pirellula* sp. Strain 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 100, p. 8298-8303, 2003.

GONZALEZ-ACOSTA, B.; BASHAN, Y.; HERNANDEZ-SAAVEDRA N.Y.; ASCENCIO, F.; CRUZ-AGUERO, G. Seasonal seawater temperature as the major determinant for populations of culturable bacteria in the sediments of an intact mangrove in an arid region. **FEMS Microbiology and Ecology,** Amsterdam, v. 55, p. 311–321, 2006.

HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, R.W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology,** New York, v. 35, p. 1-21, 1998.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and Fertility of Soils,** 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.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 180, p. 4765-4774, 1998.

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.

ISHII, K.; MUSSMANN, M.; MACGREGOR, B.J.; AMANN, R. An improved fluorescence in situ hybridization protocol for the identification of bacteria and archaea in marine sediments. **FEMS Microbiology Ecology,** Amsterdam, v. 50, n. 3, p. 203-212, 2004.

IZUMI, H.; SAGULENKO, E.; WEBB, R.I.; FUERST, J.A. Isolation and diversity of *Planctomycetes* from the sponges *Niphates* sp., seawater, and sediment of Moreton Bay, Australia. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v.104, p.533-546, 2013.

JAYAKUMAR, A.; NAQVI, S.WA.; WARD, B.B. Distribution and relative quantification of key genes involved in fixed nitrogen loss from the Arabian sea oxygen minimum zone. **Indian Ocean Biogeochemical Processes and Ecological Variability,** New Jersey, v. 185, p. 188-203, 2009.

JENKINS, C.; KEDAR, V.; FUERST, J.A. Gene discovery within the *Planctomycete* division of the domain Bacteria using sequence tags from genomic DNA libraries. **Genome Biology**, Seattle, v. 3, n. 6, p. 1-46, 2002.

JESKE, O.; JOGLER, M.; PETERSEN, J.; SIKORSKI, J.; JOGLER, C. From genome mining to phenotypic microarrays: *Planctomycetes* as source for novel bioactive molecules. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 104, p. 551-567, 2013.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B.L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems advances. **Marine Biology**, Berlin, v. 40, p. 81-251, 2001.

KIM, Y.; CHOI, G.; KIM, S.; YOON, G.; KIM, Y.; RYU, Y. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. **Protein Expression Purification,** Berlin, v. 45, p. 315–323, 2006.

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.; GARRITY, G.M. **Bergey´s manual of systematic bacteriology.** 2nd ed. Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology, v. 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Len tisphaerae, Verrucomicrobia, Chtamydiae, and *Planctomycetes*, 925 p.

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

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

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

LAGE, O.M. Characterization of a *Planctomycete* associated with the marine dinoflagellate *Prorocentrum micans* Her. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 104, p. 499-508, 2013.

LAGE, O.M.; BONDOSO, J. *Planctomycetes* diversity associated with macroalgae. **FEMS Microbiology and Ecology**, Amsterdam, v. 78, p. 366-375, 2011.

LAGE, O.M.; BONDOSO, J.; LOBO-DA-CUNHA, A. Insights into the ultrastructural morphology of novel *Planctomycetes*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 104, p. 467-476, 2013.

LAGE, O.M.; BONDOSO, J.; VIANA, F. Isolation ad characterization of *Planctomycetes* from the sediments of a fish farm wastewater treatment tank. **Archives of Microbiology,** Berlin, v. 194, p. 879-885, 2012.

LOMBARDOT, T.; BAUER, M.; TEELING, H.; AMANN, R.; GLÖCKNER, F.O. The transcriptional regulator pool of the marine bacterium *Rhodopirellula baltica* SH1 as revealed by whole genome comparisons. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 242, p. 137-145, 2005.

LONG, M.; RUAN, L.; LI, F.; YU, Z.; XU, X. Heterologous expression and characterization of a recombinant thermostable alkylsulfatase (sdsAP). **Extremophiles**, Tokyo, v. 15, p. 293-301, 2011.

LOUWS, F.J.; RADEMAKER, J.L.W.; De BRUIJN, F.J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology,** Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

MADIGAN, M.T; MARTINKO, J.M; PARKER, J. **Microbiologia de Brock.** São Paulo: Prentice Hall, 2004. 624 p.

MARCHESI, J.R.; SATO, T.; WEIGHTMAN, A.J.; MARTIN, T.A.; FRY, J.C.; HIOM, S.J.; DYMOCK, D.; WADE, W.G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 64, n. 6, p. 2333, 1998.

MORAN, M.A. Metatranscriptomics: eavesdropping on complex microbial communities. **Microbe**, Herndon, v. 4, n. 7, p. 329-335, 2009.

MOSS, J.A.; NOCKER, A.; LEPO, J.E.; SNYDER, R.A. Stability and change in estuarine biofilm bacterial community diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 9, p. 5679-5688, 2006.

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.

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.

NEEF, A.; AMAN, R.; SCHLESNER, H.; SCHLIEFER, K.H. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of *Planctomycetes* with 16S rRNA-targets probes. **Microbiology,** Britain, v. 144, p. 3257-3266, 1998.

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.** Amsterdam: Elsevier, 2007. chap. 16, p. 244-282.

PARALES, R.E.; HADDOCK, D. Biocatalytic degradation of pollutants. **Current Opinion Biotechnology,** Berlin, v. 15, p. 374-379, 2004.

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.

PIMENTEL-ELARDO, S.; WEHRL, M.; FRIEDRICH, A.B.; JENSEN, P.R.; HENTSCHEL, U. Isolation of *Planctomycetes* from Aplysina sponges. **Aquatic Microbial Ecology,** New York, v. 33, n. 3, p. 239-245, 2003.

POGOREVC, M.; FABER, K. Purification and characterization of an inverting stereo- and enantioselective sec-Alkylsulfatase from the gram-positive bacterium *Rhodococcus ruber* DSM 44541. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 5, p. 2810-2815, 2003.

POSTGATE, J.R.; KENT, H.M.; ROBSON, R.L; CHESSHYRE, J.A. The genomes of *Desulfovibrio gigas* and *Desulfovibrio vulgaris*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 130, p. 1597-1601, 1984.

POTTKAMPER, J.; BARTHEN, P.; ILBERGER, N.; SCHAWANEBERG, U.; SCHENK, A.; SCHULTE, M.; IGNATIEV, N.; STREIT, W.R. Applying metagenomics for the identification of bacterial cellulases that are stable in ionic liquids. **Green Chemistry,** Cambridge, v. 11, p. 897-1068, 2009.

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

RAPPÉ, M.S.; GIOVANNONI, S.J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 57, p. 369-394, 2003.

SÁ, A.L.B. **Diversidade de rizobactérias endoglicoliticas isoladas de mangue vermelho (*Rhizophora mangle*).** 2008. 61 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

SARDIELLO, M.; ANNUNZIATA, I.; ROMA, G.; BALLABIO, A. Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 14, n. 21, p. 3203-3217, 2005.

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.; WALSH, K.; WEBB, R.I.; RIJPSTRA, W.I.C.; VAN de PAS-SCHOONEN, K.T.; VERBRUGGEN, M.J.; HILL, T.; MOFFERT, B.; FUERST, J.; SCHOUTEN, S.; SINNINGHE DAMSTÉ, J.S.; HARRIS, J.; SHAW, P.; JETTEN, M.S.M.; STROUS, M. *Candidatus "Scalindua brodae",* sp. Noc., *Candidatus "Scalindua wagneri"*, sp. Nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, 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.

SHU, Q.L.; JIAO, N.Z. Different *Planctomycetes* diversity patterns in latitudinal surface seawater of the open sea and in sediment. **Journal of Microbiology,** London, v. 46, n. 2, p. 154-159, 2008.

SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic analyses: past and future trends. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 4, p. 1153-1161, 2011.

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.; RIJPSTRA, 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.

SPETH, D.R.; van TEESELING, M.C.F.; JETTEN, M.S.M. Genomic analysis indicates the presence of an asymmetric bilayer outer membrane in *Planctomycetes* and Verrucomicrobia. **Frontiers in Microbiology**, Berlin, v. 3, n.304, p. 1-11, 2012.

STORESUND, J.E.; OVREAS, L. Diversity of *Planctomycetes* in iron-hydroxide deposits from the Artic Mid Ocean Ridge (AMOR) and description of *Bythopirellula goksoyri* gen. nov., sp. nov., a novel *Planctomycete* from deep sea iron-hydroxide deposits. **Antonie van Leewenhoek**, Wageningen, v. 104, n. 4, p. 569-584, 2013.

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. 400, p. 446-449, 1999.

STUDHOLME, D.J.; JACKSON, R.A.; LEAK, D.J. Phylogenetic analysis of transformable strains of thermophilic *Bacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 172, p. 85-90, 1999.

TAKETANI, R.G.; YOSHIURA, C.A.; DIAS, A.C.F.; ANDREOTE, F.D.; TSAI, S.M. Diversity and identification of methanogenic archaea and sulphate-reducing bacteria in sediments from a pristine tropical mangrove. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 97, n.4, p. 401-411, 2010.

TANG, K.; BASKARAN, V.; NEMATI, M. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. **Biochemical Engineering Journal,** Amsterdam, v. 44, p. 73-94, 2009.

TEELING, H.; LOMBARDOT, T.; BAUER, M.; LUDWING, W.; GLÖCKNER, F.,O., Evaluation of the phylogenetic position of the *Planctomycete* '*Rhodopirellula baltica'* SH1 by means of concatenated ribosomal protein sequences, DNA-directed RNA polymerase subunit sequences and whole genome trees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 24, p. 791-801, 2004.

VARON-LOPEZ, M.; DIAS, A.C.F.; FASANELLA, C.C.; DURRER, A.; MELO, I.S.; KURAMAE, E.E.; ANDREOTE, F.D. Sulphur-oxidizing and sulphate-reducing communities in Brazilian mangrove sediments. **Environmental Microbiology**, Oxford, 2013. In press.

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

VIANA, F.; LAGE, O.M.; OLIVEIRA, R. High ultraviolet C resistance of marine *Planctomycetes*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 104, n. 4, p. 585-595, 2013.

WAGNER, M.; HORN, M. The *Planctomycetes*, Verrucomicrobia, Chlamydiae and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 17, p. 241-249, 2006.

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

WEBSTER, N.S.; WILSON, K.J.; BLACKALL, L.L.; HILL, R.T. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 67, n. 1, p. 434-444, 2001.

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.; 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.

XU, M.X.; WANG, F.P.; MENG, J.; XIAO, X. Construction and preliminary analysis of a metagenomic library from a deep-sea sediment of east Pacific Nodule Province. **FEMS Microbiology Ecology,** Amsterdam, v. 62, n. 3, p. 233-241, 2007.

ZAHRAN, H.H. Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. **Biology and Fertility of Soils,** Berlin, v. 25, p. 211-223, 1997.

ZHANG, Q.R.; XU, W.H.; CHEN, F.S.; LI, S. Insect biochemistry. **Molecular and Biology,** New York, v. 35, p. 153-164, 2005.

ANEXOS

Anexo A - Descrição dos componentes para o meio de cultura (continua)

Tabela de produtos utilizados no meio de cultura

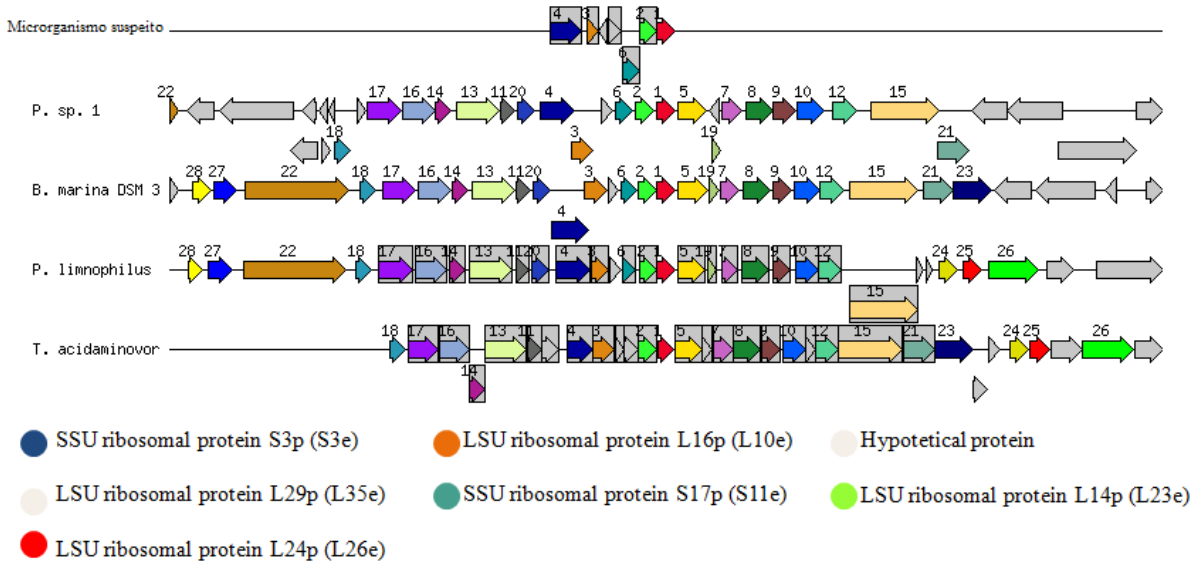
M13	**M14**
0,250g/L Peptona	1,0 g/L Extrato de levedura
0,250g/L Extrato de levedura	1,0 g/L Glucose
0,250g/L Glucose	10 mL solução de vitaminas
10 mL de solução de vitaminas	20 mL Solução de sais – Hunter's basal salts
20 mL de Solução de sais – Hunter's basal	5 mL de TRIS-HCl (solução)
5 mL de TRIS-HCl (solução)	Ágar – 15 g/L
Ágar – 15 g/L	Água do mar esterilizada 940 mL
Água do mar esterilizada 940 mL	
Antibióticos:	
Ampicilina 200µg/mL	Ampicilina 200µg/mL
Estreptomicina 500µg/mL	Estreptomicina 500µg/mL
Ciclohexamida 20 µg/mL	Ciclohexamida 20 µg/mL
Benomyl 1 µL/L	Benomyl 1 µL/L
Vitaminas	**Concentração (Solução estoque 500mL)**
Cobalamina (Vitamina B12)	0,025g
Biotina	0,500g
Thiamina-HCl.2H_2O	1,25g
Ca-Pantothenato (Vitamina B5)	1,25g
Ácido Fólico (Vitamina B9)	0,500g
Riboflavina (Vitamina B2)	1,25g
Nicotinamida	1,25g
Água destilada	500Ml
Metais 44	**Concentração**
Na_2EDTA	250 mg/L
$ZnSO_4.7H_2O$	1,095 mg/L
$FeSO_4.7H_2O$	500 mg/L
$CuSO_4.5H_2O$	39,2 mg/L
$MnSO_4.H_2O$	154,0 mg/L
$CO(NO_3)_2.6H_2O$	24,8 mg/L

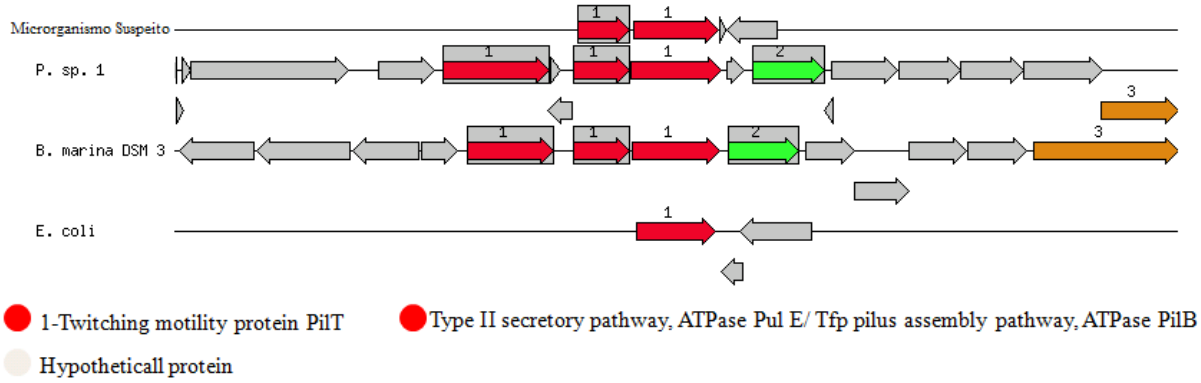
Anexo A - Descrição dos componentes para o meio de cultura (conclusão)

Tabela de produtos utilizados no meio de cultura	
$Na_2B_4O_7.10H_2O$	12,7 mg/L
Hutner's salts	**Concentração (Solução estoque 500mL)**
Ácido nitrilotriacético	5.000g
$MgSO_4.7H_2O$	14.850g
$CaCl_2.2H_2O$	1.675g
$(NH_4)_6MoO_7O_{24}.4H_2O$	4.625mg
$FeSO_4.7H_2O$	49,5mg
Metais 44	25mL
Água destilada	475 mL

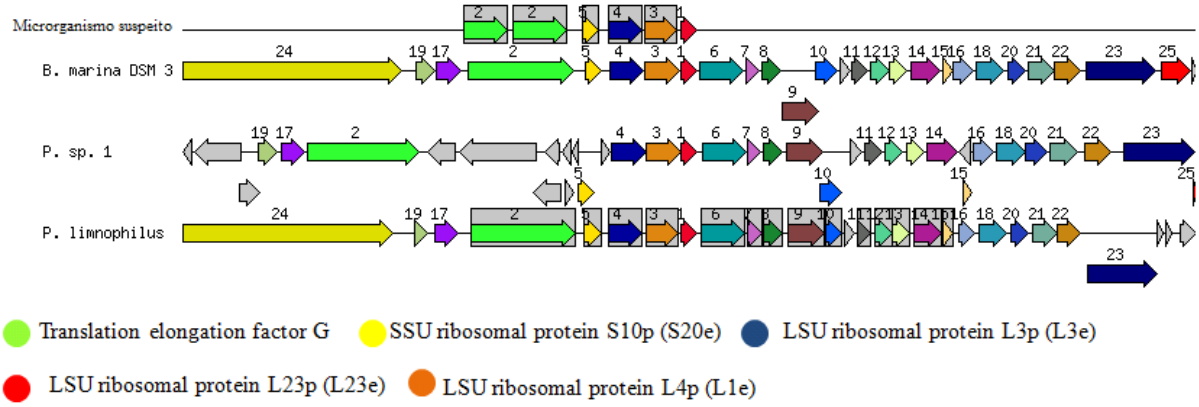
Anexo B - Comparações das sequências de *Planctomycetes* com regiões cromossômicas de gêneros semelhantes. Figura realizada pelas sequências com metodologia 454 de sequenciamento (continua)

a) Contigs associados a *Pirellula* sp.1;



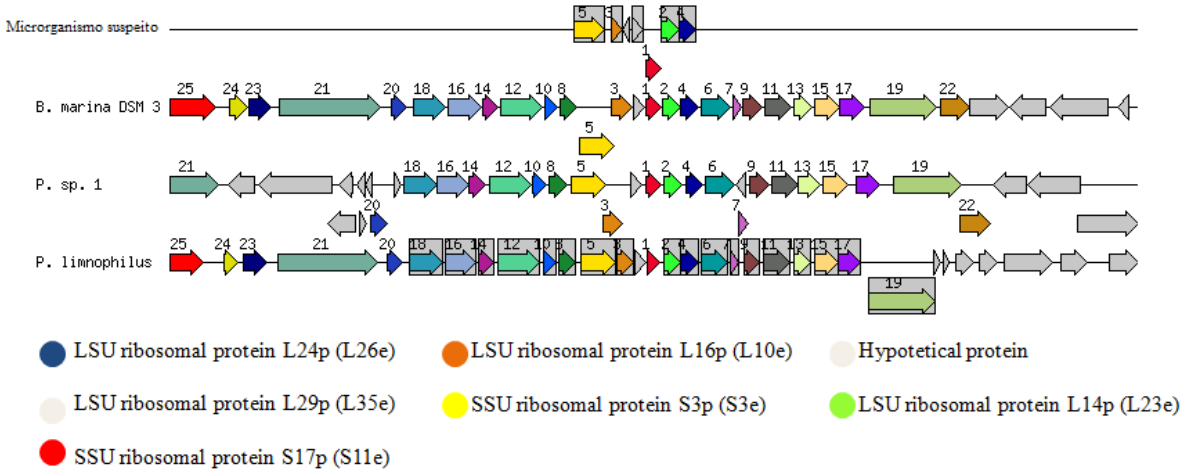


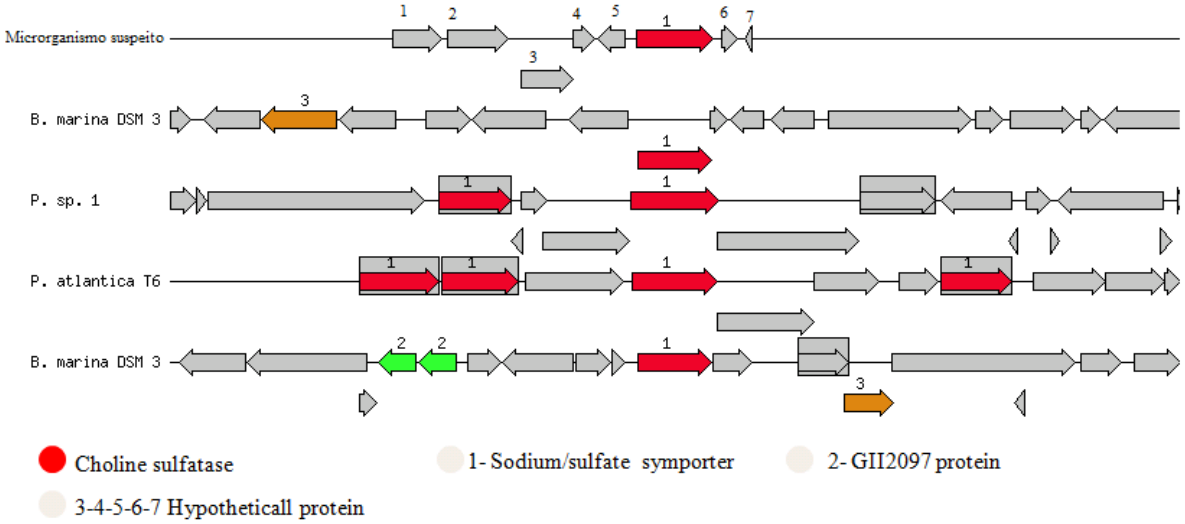
b) Contigs associados a *Blastopirellula marina* DSM-3;

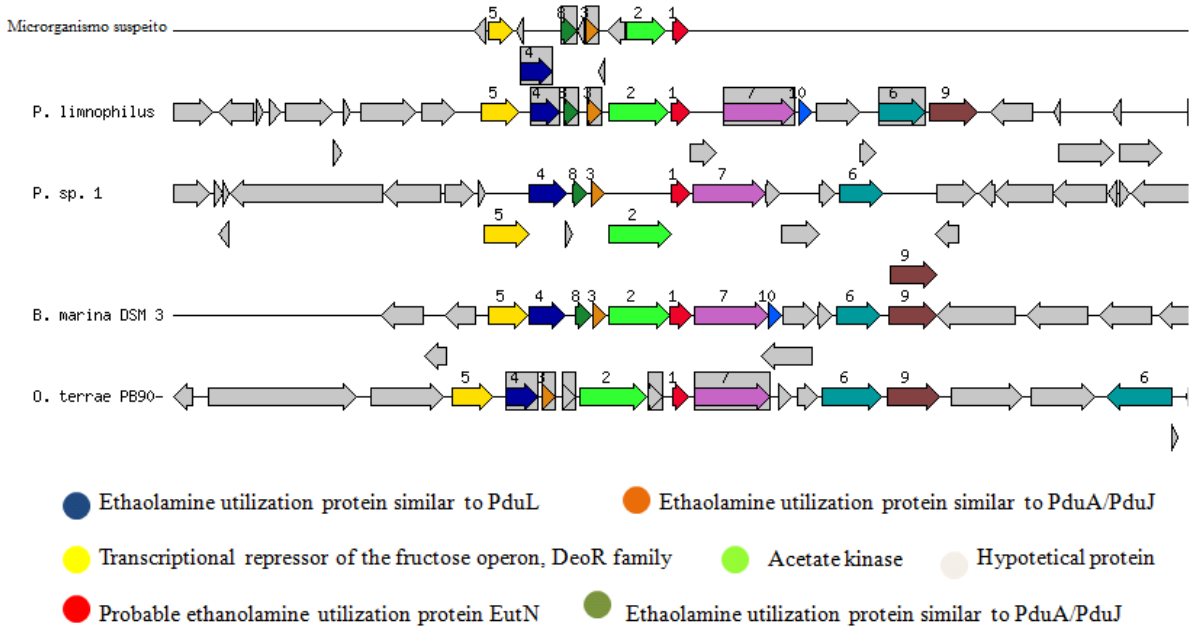
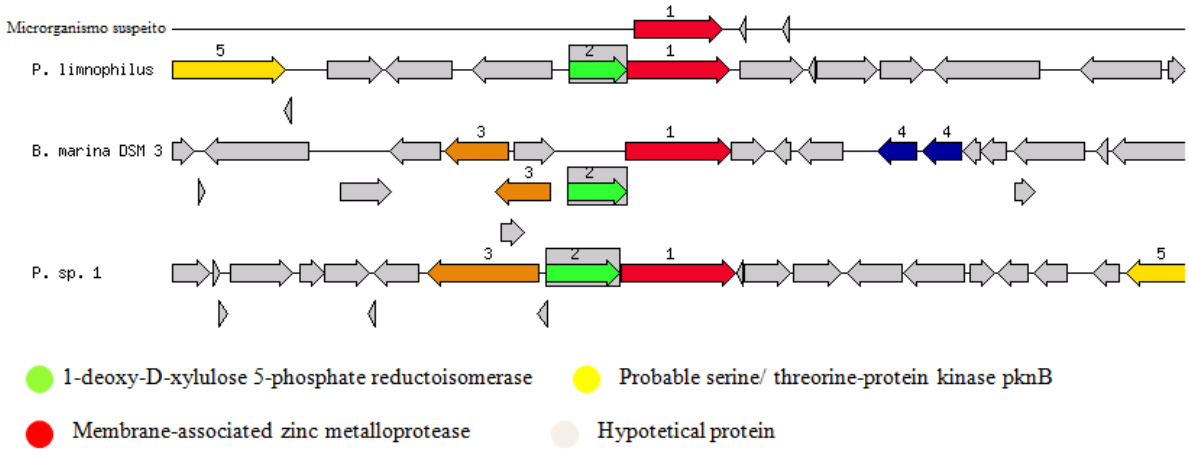


Anexo B - Comparações das sequências de *Planctomycetes* com regiões cromossômicas de gêneros semelhantes. Figura realizada pelas sequências com metodologia 454 de sequênciamento (continuação)

b) Contigs associados a *Blastopirellula marina* DSM-3;





Anexo B - Comparações das sequências de *Planctomycetes* com regiões cromossômicas de gêneros semelhantes. Figura realizada pelas sequências com metodologia 454 de *sequência*mento (conclusão)

c) Contigs associados a *Planctomycetes limnophilus*