

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

**Descrição da microbiota relacionada às transformações do enxofre em
sedimentos de manguezais**

Maryeimy Varon-Lopez

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

**Piracicaba
2013**

Maryeimy Varon-Lopez
Bióloga

Descrição da microbiota relacionada às transformações do enxofre em sedimentos de manguezais

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

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

Piracicaba
2013

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

Varon-Lopez, Maryeimy

Descrição da microbiota relacionada às transformações do enxofre em sedimentos de manguezais / Maryeimy Varon-Lopez.- - Piracicaba, 2013.
108 p: il.

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

1. Bactérias redutoras de sulfato 2. Ecologia microbiana 3. Deltaproteobacteria
4. Gammaproteobacteria I. Título

CDD 631.46
V323d

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

DEDICATÓRIA

*A Dios y a su imagen
representada en el
Divino Niño Jesús,
prueba de amor y de
fe viva dentro de mí.*

A mis padres Argelia y Heriberto,
mi Hermana Yamile y mi Sobrino Daniel,
por apoyarme en la realización de una búsqueda
personal y el anhelo de un futuro mejor.

A mi Madre por esperarme siempre,
mi Padre por apoyarme y hacerme reír como nadie
mi Hermana, por ser ejemplo de mujer luchadora
y sobre todo por cuidar de mis padres
y a mi sobrino por ser nuestra continuación.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote, por ser além de um professor um mestre, sempre motivador e interessado em explorar o melhor de cada um, obrigada por acreditar em meu trabalho e me apoiar em cada passo.

À agência de fomento CAPES, pela concessão da bolsa.

Aos técnicos de laboratório pela ajuda e boa disposição: Denise, Luiz Fernando, Luiz Silva, João Silva e Wlade.

As secretárias do PGG Microbiologia Agrícola Giovanna e Maria Fernanda.

À Daniela Villela Lima e à equipe da Profa. Vivian Pellizari e o Prof. James Tiedje por disponibilizar os dados de hidrocarbonetos e GeoChip.

À Dra. Eiko Kuramae pelos ensinamentos e a oportunidade de participar da equipe do instituto NIOO – Wageningen e ao pessoal do grupo; Mattias, Nardy, Yao e Lucas pela colaboração e os bons momentos. Aos amigos da Holanda Charles, Lara e Zany por me ajudar e incentivar.

Ao Prof. Dr Tiago Osorio Ferreira e Gabriel Nuto Nobrega pela ajuda nas análises de sulfeto.

Aos amigos e colegas do Laboratório pela convivência; Ademir, Armando, Cristiane, Danielle, Danice, Dorotéia, Fábio, Júlia, Juliana, Lucas, Marcos Vinícius, Mylenne, Pedro e Simone. E em especial ao Diogo, Thiago e Daniel Bini pela ajuda nas análises e correções de português.

Aos meus grandes amigos e família em Piracicaba, Nelson por estar do meu lado sempre para me apoiar e me fazer os dias mais leves, às minhas amigas Eleonora e Silvia, presentes em todos os momentos, sobretudo naqueles que mais precisei, a Marcos Guilherme pelos anos de boa convivência e a Luana Lira pela boa companhia e agradável conversa.

E a todo o pessoal que conheci durante o período de doutorado, do qual sempre recebi ensinamentos e só posso ter boas lembranças, perto ou longe só fica uma palavra, Muito Obrigada!!!!

EPÍGRAFE

É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver.

Martin Luther King

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Revisão bibliográfica.....	18
1.1.1 O ecossistema de manguezal	18
1.1.2 O solo de mangue	18
1.1.3 Diversidade microbiana nos manguezais	19
1.1.3.1 Influência da contaminação na estrutura da comunidade microbiana dos sedimentos de manguezais	21
1.1.4 Ciclo do enxofre e suas diferentes transformações	22
1.1.4.1 Redução do enxofre	24
1.1.4.1.1 A redução dissimilativa do sulfato	24
1.1.4.1.2 Redução assimilativa do sulfato e imobilização.....	24
1.1.4.1.3 Respiração do enxofre elementar (redução dissimilativa).....	24
1.1.4.2 Oxidação.....	25
1.1.4.2.1 Oxidação do enxofre.....	25
1.1.4.2.2 Mineralização	25
1.1.5 Genes <i>aprA</i> e <i>dsrB</i> no ciclo do enxofre.....	25
1.1.6 Grupos microbianos envolvidos no ciclo do enxofre em diferentes ecossistemas.....	27
Referências	29
2 COMUNIDADES OXIDANTES DO ENXOFRE E REDUTORAS DE SULFATO EM SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS BRASILEIROS	35
Resumo	35
Abstract.....	35
2.1 Introdução.....	36
2.2 Desenvolvimento	38
2.2.1 Material e Métodos.....	38
2.2.1.1 Descrição dos locais de coleta.....	38
2.2.1.2 Caracterização do solo e extração do DNA.....	39
2.2.1.3 Quantificação dos genes <i>aprA</i> e <i>dsrB</i> por PCR em tempo real	39
2.2.1.4 Amplificação do gene <i>aprA</i> e <i>dsrB</i> para DGGE.....	40
2.2.1.5 Construção e análises das bibliotecas de clones dos genes <i>aprA</i> e <i>dsrB</i>	41

2.3 Resultados	42
2.3.1 Quantificação dos genes funcionais <i>aprA</i> e <i>dsrB</i> por PCR em tempo real.....	42
2.3.2 Composição das comunidades de SOB e SRB reveladas por PCR-DGGE.....	43
2.3.3 Análises de sequências dos genes <i>aprA</i> e <i>dsrB</i> nas bibliotecas de clones	45
2.4 Discussão	49
2.5 Conclusões	52
Referências.....	53
Anexo.....	58
3 ESTRUTURA E DIVERSIDADE DE ARQUÉIAS E BACTÉRIAS, COM ENFOQUE EM BACTÉRIAS REDUTORAS DO SULFATO, EM MANGUEZAIS	59
Resumo	59
Abstract	59
3.1 Introdução	60
3.2 Desenvolvimento	63
3.2.1 Descrição dos locais de coleta	63
3.2.2 Amostragem.....	64
3.2.3 Análises físicas, químicas e quantificação de hidrocarbonetos nos sedimentos dos manguezais.....	65
3.2.4 Extração do DNA.....	65
3.2.5 PCR em tempo real	66
3.2.6 Pirosequenciamento	67
3.2.6.1 Pirosequenciamento do gene 16S DNAr de arqueias e bactérias	67
3.2.6.2 Pirosequenciamento do gene <i>dsrB</i>	68
3.2.6.3 Análise dos dados obtidos por pirosequenciamento	68
3.2.7 Modelos de co-ocorrência.....	70
3.2.8 Análises de GeoChip.....	70
3.3 Resultados e discussão.....	71
3.3.1 Diferenças entre os manguezais baseados na caracterização física e química	71
3.3.2 Quantificação dos grupos alvo nos sedimentos estudados.....	74
3.3.3 Diversidade de arqueias e bactérias por pirosequenciamento usando RDP e QIIME	75
3.3.4 Diversidade de arqueias por pirosequenciamento.....	77
3.3.5 Diversidade de bactérias por pirosequenciamento.....	80
3.3.6 Modelos de co-ocorrência de arqueias e bactérias.....	82

3.3.7 Diversidade de bactérias redutoras de sulfato (Sulfate reducing bacteria - SRB) determinada por pirosequenciamento do gene funcional <i>dsrB</i>	85
3.3.8 Análises de GeoChip	88
3.4 Considerações finais	94
Referências	95
Anexos	104

RESUMO

Descrição da microbiota relacionada às transformações do enxofre em sedimentos de manguezais

Os manguezais são ambientes de transição entre os ecossistemas terrestres e marinhos, essenciais para o crescimento e o desenvolvimento de muitas espécies de elevado interesse ecológico e econômico. Apesar de ter sua importância reconhecida, são constantemente impactados por diversos poluentes que influenciam sua estabilidade. Estes ecossistemas caracterizam-se por serem anaeróbicos, ricos em sulfato e em matéria orgânica, sendo os microrganismos fundamentais na ciclagem de nutrientes, em especial os envolvidos no ciclo do enxofre, onde os procariotos redutores de sulfato (*sulphate-reducing prokaryotes*, SRP) aparecem como um grupo frequente e com um papel preponderante. O presente estudo mostrou que as comunidades de arqueias, bactérias e bactérias redutoras de sulfato (*sulphate-reducing bacteria* SRB) são abundantes, diversas e responsivas aos estados de intervenção dos manguezais. A abundância medida por qPCR mostrou que as quantidades de arqueias e bactérias aumentam com a contaminação. A diversidade estudada por pirosequenciamento do gene ribossomal 16S DNAr indicou que estes grupos são diversos, mostrando filos Euryarcheota e Crenarcheota do domínio Archaea, e os filos Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria, do domínio Bacteria, como grupos frequentes. A estrutura destas comunidades, avaliada por análises de co-ocorrência, revelou que a microbiota responde à contaminação, diminuindo e simplificando as interações, quanto maior for a contaminação. A diversidade dos grupos relacionados ao ciclo do enxofre, estudada por DGGE (*aprA* e *dsrB*), pirosequenciamento (*dsrB*) e GeoChip (*aprA*, *dsrB*), mostrou que a classe Deltaproteobacteria, representada pelas ordens Desulfobacterales e Desulfovibrionales, é o grupo prevalente na redução do sulfato, e as classes Gammaproteobacteria e Betaproteobacteria devem atuar na oxidação do enxofre (*sulphur-oxidising* – SOB). O GeoChip (*aprA*, *dsrB*) foi a única metodologia que permitiu detectar arqueias redutoras de sulfato (gêneros *Archaeoglobus* e *Pyrobaculum*), sendo esta a primeira descrição de tais organismos em ecossistemas de manguezais. Desse modo, estes resultados evidenciam que a microbiota em áreas de manguezais responde à contaminação, tendo uma alta frequência de SRB e SOB, ressaltando, assim, a importância do ciclo do enxofre em ambientes de manguezais.

Palavras-chave: Bactérias redutoras de sulfato; Ecologia microbiana; Deltaproteobacteria; Gammaproteobacteria

ABSTRACT

Description of the microbiota related with the sulfur transformations in mangroves sediments

Mangroves are transitional environments between terrestrial and marine ecosystems, essential for the growth and development of many species with high ecological and economical interests. Despite its recognized importance, mangroves are constantly impacted by various pollutants, affecting its stability. These ecosystems are characterized as anaerobic, rich in sulfate and organic matter, where the microorganisms are essential to the nutrient cycling, particularly those involved in the sulfur cycle, where sulphate-reducing prokaryotes (SRP) appear as frequent and taking an important role. The present study showed that communities of archaea, bacteria and sulphate reducing bacteria (SRB) are abundant, diverse and responsive to state intervention of the mangrove. The abundance measured by qPCR showed that the quantities of archaea and bacteria increase with the contamination. The diversity studied by pyrosequencing of the 16S rDNA ribosomal gene indicated that these groups are diverse, showing Euryarcheota and Crenarcheota phyla of the domain Archaea, and Deltaproteobacteria and Gammaproteobacteria classes of the domain Bacteria, as the most frequent groups. The structure of these communities, as assessed by analysis of network, revealed that the microbiota responds to contamination, reducing and simplifying interactions in the higher contamination. The diversity of groups related with the sulfur cycle studied by DGGE (*aprA* and *dsrB*), pyrosequencing (*dsrB*) and GeoChip (*aprA*, *dsrB*) showed that Deltaproteobacteria, represented by orders Desulfobacterales and Desulfovibrionales, is a prevalent group in the sulfate reduction, while Gammaproteobacteria and Betaproteobacteria are frequent in the sulfur oxidation (*sulfur-oxidising bacteria* - SOB). The GeoChip (*aprA*, *dsrB*) was the only method that allowed to detect sulfate-reducing archaea (genera *Archaeoglobus* and *Pyrobaculum*), which is the first description of these organism on mangrove ecosystems. Thus, these results show that the microbiota in mangroves areas responds to contamination, having a high frequency of SRB and SOB, thus highlighting the importance of the sulfur cycle in mangrove environments.

Keywords: Sulphate reducing bacteria; Microbial ecology; Deltaproteobacteria; Gammaproteobacteria

1 INTRODUÇÃO

Os manguezais são ambientes complexos e dinâmicos, fundamentais para o crescimento e o desenvolvimento de muitas espécies de reconhecido interesse ecológico e econômico. Apesar de conhecer seu valor, eles são parte de um dos ecossistemas mais ameaçados no mundo, já que muitas atividades antropogênicas localizam-se próximo a estas regiões. O derramamento de petróleo, por exemplo, é um dos contaminantes que causam efeitos mais severos nestas áreas, necessitando de muito tempo e recursos financeiros para a sua remediação.

Entre as espécies que habitam os manguezais encontram-se as de diversos microrganismos, os quais são fundamentais na manutenção desses ambientes, com alta abundância de matéria orgânica e deficiência em nutrientes. Neste tipo de ambiente redutor, as bactérias redutoras de sulfato (*sulphate-reducing prokaryotes*, SRB) aparecem como um grupo frequente, o qual se mostra variável e sensível, evidenciando sua potencialidade como bioindicador da contaminação.

Grande parte dos estudos realizados na microbiota de manguezais naturais e contaminados baseia-se na exploração da diversidade da comunidade microbiana, utilizando-se técnicas de *fingerprinting* e biblioteca de clones de genes ribossomais. Mesmo que estas abordagens forneçam uma informação melhor do que a obtida com base nos métodos dependentes de cultivo, esses dados são, ainda, de certa maneira limitantes para estudos de ecologia microbiana. Para isso, novas tecnologias de sequenciamento estão sendo cada vez mais utilizadas, já que, a partir dessa abordagem, é possível obter um maior número de informações, que permitem maior precisão e confiabilidade dos resultados.

Em alguns dos trabalhos realizados para avaliar os microrganismos em manguezais aborda-se a estrutura, a diversidade e a importância de alguns grupos funcionais. Entretanto, ainda faltam estudos que abordem, de forma mais extensa, as comunidades e as interações de arqueias e bactérias, além de considerar um foco maior na ecologia e no funcionamento metabólico desses ecossistemas, em especial os relacionados com o ciclo do enxofre. Neste contexto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a densidade e diversidade das arqueias, bactérias e SRB, além de descrever as alterações na estrutura das comunidades microbianas e dos grupos, relacionadas com o ciclo do enxofre, como resposta aos diferentes tipos de intervenção nesses ambientes.

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 O ecossistema de manguezal

Os manguezais são ecossistemas costeiros de transição entre o ambiente terrestre e o marinho, com efeito constante do mar. Esses ambientes são encontrados em cerca de 60% - 75% das costas do planeta, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Dentre essas regiões, a América Latina é uma das que têm maior cobertura de mangues, com 4.000.000 hectares presentes nas costas do Atlântico e Pacífico (GIRI et al., 2011; HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001).

Na América Latina, o Brasil é o primeiro país (e o terceiro do mundo) com maior extensão em área de manguezais (GIRI et al., 2011), distribuindo-se desde os estados de Amapá, no extremo norte, até Santa Catarina, no sul (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 1990), atingindo, aproximadamente, 25,000 km², dos quais cerca de, 231 km² correspondem ao estado de São Paulo (DUKE et al., 2007).

Estes ecossistemas são de grande importância ecológica e caracterizam-se pela alta produtividade, devido à grande quantidade de matéria orgânica contida em seu sedimento, a qual é a fonte de nutrientes e a base da cadeia alimentar de muitos organismos. Dessa forma, os manguezais servem como base do ciclo de vida e sustentabilidade de muitas espécies, atuando como zona de refúgio, criação, e alimentação de crustáceos, moluscos, peixes, aves (residentes e migratórias) e mamíferos (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001).

Apesar do seu elevado valor ecológico, os manguezais encontram-se entre os ecossistemas mais ameaçados do mundo, atingindo o nível de “risco de extinção”, devido à presença das muitas atividades antropogênicas desenvolvidas em suas áreas próximas, evidenciando a necessidade de se criar estratégias de conservação, proteção e recuperação dessas áreas (SANTOS et al., 2010). Uma das atividades que geram maior impacto no ecossistema são os vazamentos de petróleo, cujo efeito pode durar até 20 anos (BURNS et al., 1994), podendo provocar desfolha das árvores, impedindo seu crescimento adequado, influenciando diretamente a sua sobrevivência e fazendo que a recuperação dessas áreas seja difícil e de custo elevado (SANTOS et al., 2010).

1.1.2 O solo de mangue

Os solos de mangue são solos halomórficos desenvolvidos a partir de sedimentos marinhos e fluviais, com dominância de frações de argila e silte, e elevadas quantidades de matéria orgânica e de sais solúveis, em decorrência do contato com o mar (PRADA-

GAMERO; VIDAL-TORRADO; FERREIRA, 2004). Nesses ambientes, os teores de matéria orgânica apresentam um amplo espectro de variação espacial, a qual está relacionada diretamente com o tamanho das partículas inorgânicas dos sedimentos (PRADA-GAMERO; VIDAL-TORRADO; FERREIRA, 2004). Estes solos apresentam amplas variações nos valores de pH, CTC, capacidade de retenção de água, nitrogênio e fósforo solúvel além de variações mineralógicas (NOBREGA et al., 2013; PRADA-GAMERO; VIDAL-TORRADO; FERREIRA, 2004), além de variações nos valores de potencial redox, que pode se encontrar em uma faixa de -200 a +150mV (CLARK et al., 1998).

A salinidade das suas águas pode variar de 0,5‰ a 30‰, e, na superfície do solo, a salinidade pode diminuir com a distância dos rios e canais, exceto nas áreas que são desprovidas de vegetação, as quais sofrem evaporação maior (PRADA-GAMERO; VIDAL-TORRADO; FERREIRA, 2004).

1.1.3 Diversidade microbiana nos manguezais

Os microrganismos têm um papel fundamental na ciclagem de nutrientes neste ambiente, resultante da sua interação com os demais organismos e, em especial, com as plantas, nas quais funcionam ciclando e conservando os nutrientes, além de atuar como promotores do crescimento vegetal, sob tais condições extremas (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001).

A diversidade microbiana nos manguezais pode variar com a localidade, a profundidade, a sazonalidade e, as condições físicas e químicas, entre outros fatores, gerando uma pressão seletiva e promovendo mudanças na sua composição (DIAS et al., 2010; GONZALEZ-ACOSTA et al., 2006; LIANG et al., 2006).

As arqueias compõem um grupo abundante e diverso nos manguezais, muitas delas são extremófilas, com capacidade de crescer em pH extremo e na ausência de oxigênio. Este domínio tem cinco filos bem caracterizados, que são: Crenarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota, Nanoarchaeota e o recente filo Thaumarchaeota (GUPTA; SHAMI, 2011), tendo os dois primeiros filos, sido os primeiros a serem descritos (CAVICCHIOLI, 2011) e também citados como os mais abundantes em sedimentos de manguezais.

O filo Crenarchaeota apresenta espécies filogenéticas e metabolicamente menos diversas, as quais ficaram alocadas por muito tempo como exclusivas com temperaturas extremas, e com capacidade de metabolizar enxofre. Este filo está composto de uma única classe, Thermoprotei, dentro da qual ocorrem três ordens: Thermoproteales, Desulfurococcales e Sulfolobales (GUPTA; SHAMI, 2011). Os avanços nas técnicas

moleculares dos últimos anos têm colocado as Crenarcheota mesófilas dentro de um novo filo proposto, chamado de Traumarcheota. Este grupo tem sido encontrado em ambientes marinhos costeiros, águas profundas, hidrotermais, manguezais e em diferentes tipos de solos (BATES et al., 2011; DIAS et al., 2011; GUMEROV et al., 2011; MENDES et al., 2012).

Assim, os Crenarcheota mesofílicos são, agora, conhecidos por compreender uma fração considerável (~5%) do total da comunidade microbiana de ambientes marinhos e terrestres (SCHLEPER; JURGENS; JONUSCHEIT, 2005). O filo Euryarchaeota é um grupo bastante diversificado, incluindo organismos halófilos, termófilos e metanogênicos, que são extremamente importantes na degradação de compostos orgânicos nos mais diferentes ambientes. Vários membros deste grupo são relacionados às transformações de carbono por meio da metanogênese (a qual ocorre em condições anaeróbias) (GUPTA; SHAMI, 2011).

A presença de Crenarcheota e Euryarchaeota tem sido reportada em ambientes de manguezais (DIAS et al., 2011; LYIMO; POL; OP DEN CAMP, 2002; MENDES et al., 2012; PIRES et al., 2012). As análises filogenéticas utilizando o gene ribossomal 16S DNAr mostraram que nos manguezais da China, de 319 clones estudados, 80,4% pertencem ao filo Crenarchaeota e 19,6% pertencem ao filo Euryarchaeota (YAN; HONG; YU, 2006). Nos manguezais brasileiros, os estudos deste domínio mostram que a riqueza de arqueias é influenciada pela profundidade da amostragem, encontrando, na camada superficial, uma predominância de Euryarchaeota metanogênicos, enquanto, na camada mais profunda, predominam os Crenarchaeota (MENDES et al., 2012). Estudos em manguezais com diferentes condições antropogênicas mostraram os grupos Thaumarchaeota (54%) e Euryarchaeota (29%) como os mais dominantes (DIAS et al., 2011).

Outro grupo microbiano de grande importância nos manguezais é o das bactérias, as quais têm papel fundamental no controle de reações químicas, como, por exemplo, na fotossíntese, na fixação de nitrogênio, no fluxo de carbono nos sedimentos, bem como na produção de antibióticos e enzimas (arilsulfatase, L-glutaminase, quitinas, L-asparaginase, e celulase, dentre outras) (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001; RIGONATO et al., 2012). Nos manguezais, este grupo é abundante, sendo as bactérias aeróbias as que sequestram e mantêm os nutrientes na superfície e as bactérias redutoras de sulfato atuam como decompositoras primárias da matéria orgânica (ALONGI; CHRISTOFFERSEN; TIRENDI, 1993).

O domínio Bacteria, atualmente, é composto de 23 filas, determinados utilizando-se as sequências de 16S DNAr. Alguns destes filas possuem uma única ou algumas poucas espécies (*Thermomicrobia*, *Chrysiogenetes*, *Fibrobacteres* e *Deferribacteres*), enquanto

outros, como Proteobacteria, Bacteriodetes, Cyanobacteria, Actinobacteria e Firmicutes, incluem milhares de espécies, as quais correspondem a 90%-95% de todas as espécies de bactérias conhecidas.

Em vários trabalhos, as proteobactérias são descritas como um grupo frequente nos manguezais (CASTINE et al., 2009; DIAS et al., 2010; LIANG et al., 2006), cujas classes predominantes variam com a localidade e as condições ambientais. Em manguezais subtropicais da China, podem ser encontrados representantes de 13 membros de diferentes linhagens, mantendo-se como dominante o filo Proteobacterias (67%), distribuído nas classes de Gammaproteobacteria (29,1%), Epsilonbacteria (16%) e Deltaproteobacteria (8%) (LIANG et al., 2006). Nos manguezais Brasileiros, o filo Proteobacteria persiste como o dominante, no entanto, a distribuição das classes muda de acordo com a localidade.

Alguns trabalhos reportam Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Epsilonproteobacteria como as classes mais abundantes (DIAS et al., 2010; GOMES et al., 2008), enquanto outros já reportam Gammaproteobacteria e Deltaproteobacteria (ANDREOTE et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2011; PEIXOTO et al., 2011). Outros grupos encontrados em menor proporção são Acidobacteria e as classes Betaproteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteriodetes (DIAS et al., 2010).

1.1.3.1 Influência da contaminação na estrutura da comunidade microbiana dos sedimentos de manguezais

O conhecimento do estado de conservação do manguezal e dos efeitos dos contaminantes sobre os organismos, mediante métodos dependentes e independentes de cultivo, tem sido proposto para melhorar o entendimento das comunidades microbianas e sua capacidade de degradação dos poluentes, permitindo o desenvolvimento de estratégias para biorremediação e monitoramento (SANTOS et al., 2010). Dessa maneira, os perfis da diversidade microbiana podem ser utilizados como indicadores do gradiente de poluição em mangues e também indicar a especificidade dos compostos derivados de petróleo que mais estão influenciando certos grupos bacterianos (PEIXOTO et al., 2011).

Dada a importância de criar estratégias de recuperação, uma alternativa é aproveitar o potencial das comunidades microbianas presentes na área e, assim, avaliar sua capacidade para transformar os poluentes. Em estudos realizados no Brasil foi demonstrado que existe uma grande diversidade de bactérias, arqueias, e microeucariotos nos manguezais brasileiros, sendo muitos deles descritos como possíveis bioindicadores da contaminação e do estado de recuperação dos manguezais (DIAS et al., 2010, 2011; FASANELLA et al., 2012; SANTOS

et al., 2010). Isso mostra que as comunidades microbianas refletem a variação espacial dos nutrientes e dos poluentes nos manguezais, uma vez que cada um destes fatores tem influência direta nas estruturas de tais comunidades (DOS SANTOS et al., 2011).

Dos Santos et al. (2011), avaliando os sedimentos de manguezais, demonstraram que as sequências dos gêneros *Marinobacter*, *Marinobacterium*, *Cycloclasticus* e *Haliea* são bioindicadores de poluição. Estes mesmos autores encontraram um grande número de bactérias redutoras de sulfato, antes e depois da contaminação, indicando a possível participação de tais organismos no processo de degradação dos poluentes estudados. Em manguezais expostos a contaminações prévias, a comunidade é pré-selecionada, fazendo com que esta responda mais rapidamente a uma contaminação posterior. Até mesmo nestas condições, o filo Proteobacteria se mantém como dominante, selecionando algumas Deltaproteobacteria e uma pequena quantidade de Gammaproteobacteria (TAKETANI et al., 2010).

1.1.4 Ciclo do enxofre e suas diferentes transformações

O enxofre é o décimo elemento mais abundante da Terra. Seus grandes reservatórios encontram-se como precipitados de sulfúrio-metal, tais como pirita (FeS_2) e gesso (CaSO_4), além do enxofre associado com combustíveis fósseis. O segundo grande reservatório está na forma de sulfato, encontrado nos oceanos. Outros reservatórios menores e mais ativos são os encontrados na biomassa e na matéria orgânica, em ambientes terrestres e marinhos (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001).

O ciclo do enxofre tem uma ampla faixa de estados de oxidação, desde -2 (S^{2-} sulfeto, completamente reduzido) até +6 (SO_4^{2-} sulfato, completamente oxidado), podendo ser transformado química ou biologicamente. Na natureza, o enxofre é um elemento essencial para os organismos, compondo, aproximadamente, 1% do peso seco de uma célula bacteriana, com grande importância para a síntese dos aminoácidos cisteína e metionina, como também de algumas vitaminas, hormônios e coenzimas. Os impactos globais do ciclo do enxofre são muito importantes, incluindo a formação de chuva ácida, drenagem de mina ácida, e corrosão de concreto e metal.

Uma visão geral do ciclo do enxofre é mostrada na figura 1.1, em que tais transformações são divididas em dois processos básicos, de redução e de oxidação.

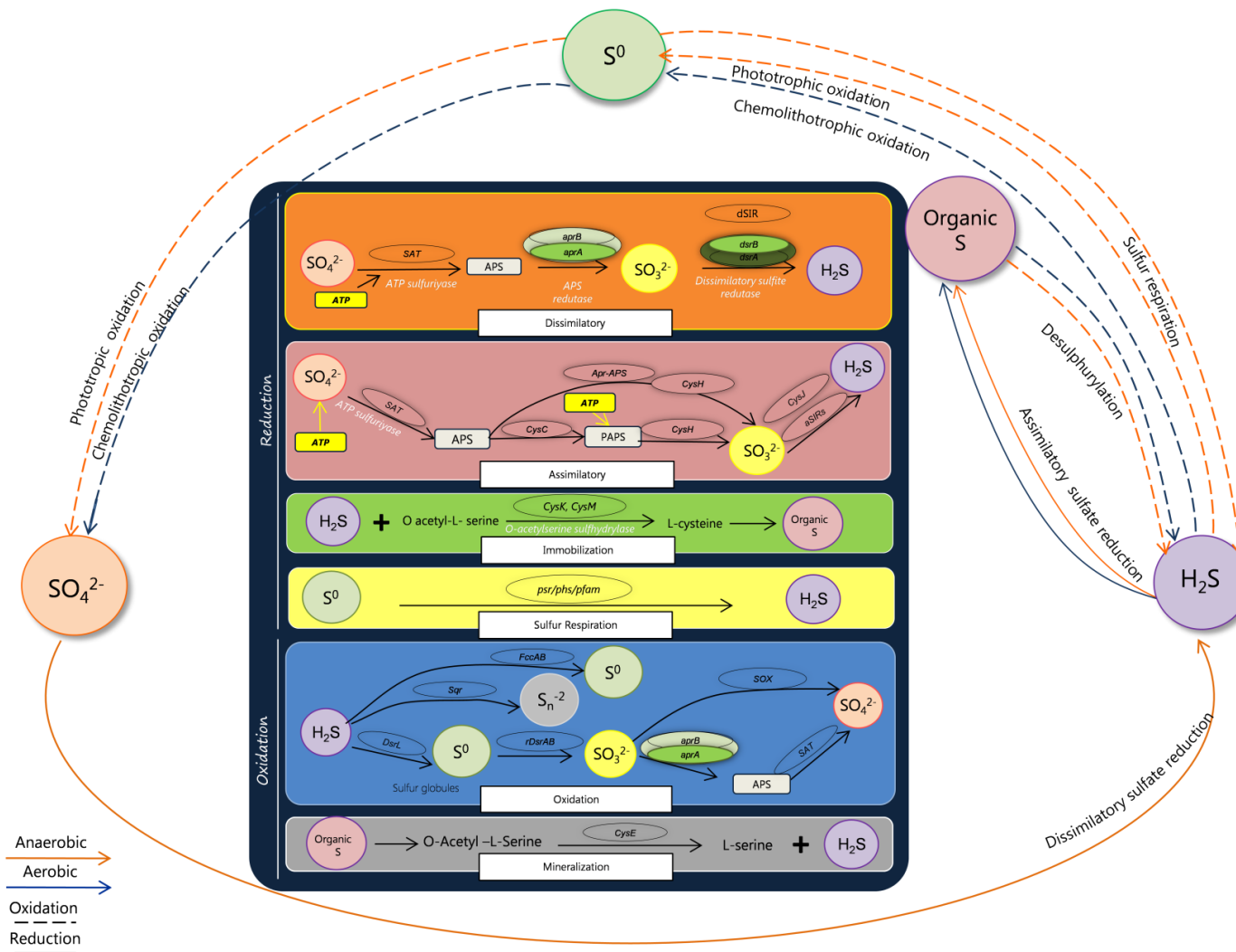


Figura 1.1 - Visão geral do ciclo do enxofre, mostrando as enzimas e os genes envolvidos (oval) na ciclagem (BURNS; DICHRISTINA, 2009; FORQUIN et al., 2011; GREIN et al., 2013; LOY et al., 2009; MUYZER; STAMS, 2008; RABUS; HANSEN; WIDDEL, 2006; STEWART, 2011; YAMAMOTO; TAKAI, 2011; ZHOU et al., 2011)

1.1.4.1 Redução do enxofre

1.1.4.1.1 A redução dissimilativa do sulfato

A redução dissimilativa ocorre quando os microrganismos utilizam o sulfato comoceptor final de elétrons, comumente combinado com outros elementos, o que resulta na degradação de compostos orgânicos, dando origem ao processo de produção de sulfeto. Os organismos promotores de tal processo são anaeróbicos e se encontram amplamente distribuídos na natureza, conhecidos como SRP. Tais organismos podem usar, por exemplo, até mesmo H_2 como um doador de elétrons para permitir a redução do sulfato. A redução de sulfato inicia-se com a entrada do sulfato no interior da célula. O sulfato citoplasmático é ativado a partir de uma fosforilação pela enzima ATP sulfurilase, resultando na formação de adenosina-APS (APS - adenilsulfatase) e pirofosfato (PPi) (MUYZER; STAMS, 2008). O APS formado é convertido a sulfito e AMP, catalisado pela enzima APS redutase. A redução de sulfito para sulfeto pode acontecer por dois caminhos. Uma é a via do tritionato, que forma tritionato e tiosulfato como intermediários e a outra é pela redução direta de sulfito a sulfeto. O sulfeto gerado é comumente liberado para o ambiente e grande parte se perde na forma de gás, dando o odor típico aos solos anaeróbios.

1.1.4.1.2 Redução assimilativa do sulfato e imobilização

É o processo que algumas plantas e microrganismos utilizam para incorporar o sulfeto de hidrogênio (S^{2-}) em aminoácidos ou outras moléculas com enxofre. O sulfato é transportado para o citoplasma, é fosforilado a adenosina-5-fosfosulfato (APS) pela ATP sulfurilase, consumindo energia (ATP) e produzindo pirofosfato (PPi). A APS pode ser reduzida a sulfeto por duas vias, dependendo das características do organismo; uma via de redução direta de APS ou uma via de fosforilação PAPS. Nesta última, uma segunda molécula de ATP é requerida (MUYZER; STAMS, 2008). O APS é reduzido passando para tiosulfonato e AMP, depois de tiosulfonato a sulfito e, posteriormente, a sulfeto. Na via PAPS, este é reduzido a sulfito e, depois, é reduzido a sulfeto. Seguidamente acontece a imobilização, em que o sulfeto é incorporado à síntese do aminoácido cisteína (O-acetilserina sulfidrilase), que é posteriormente assimilado em compostos orgânicos (LIU; BEER; WHITMAN, 2012; MUYZER; STAMS, 2008).

1.1.4.1.3 Respiração do enxofre elementar (redução dissimilativa)

Ocorre em bactérias que crescem utilizando compostos de carbono simples, como acetato, etanol e propanol, em combinação com o enxofre elementar (S^0) comoceptor final

de elétrons. Estes compostos de carbono são produtos da decomposição das plantas e da biomassa microbiana que existe nas regiões anaeróbicas. A habilidade de reduzir o enxofre elementar é encontrada em arqueias e bactérias, incluindo Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Epsilonproteobacteria, Cianobactéria e arqueias hipertermófilas (BURNS; DICHRISTINA, 2009).

1.1.4.2 Oxidação

1.1.4.2.1 Oxidação do enxofre

Na presença do oxigênio, compostos reduzidos de enxofre (como, por exemplo, sulfeto ou enxofre elementar) podem ser oxidados por bactérias quimioautotróficas, ou sob condições anóxicas por bactérias fototróficas. A oxidação fotoautotrófica do enxofre está limitada para bactérias verdes e púrpuras. Este grupo fixa carbono usando energia da luz, oxidando sulfeto para enxofre elementar. Os quimioautotróficos podem oxidar sulfeto de hidrogênio para enxofre elementar, o qual é depositado dentro da célula como grânulos. A energia produzida por esta oxidação é utilizada para fixar CO₂ para o crescimento celular (MUYZER; STAMS, 2008). Estas bactérias oxidantes do sulfeto podem utilizar dois caminhos para a oxidação do sulfeto. Um envolve o complexo multienzimático SOX catalizador da completa oxidação de sulfeto para sulfato e o outro inicia com a oxidação de sulfeto para polissulfureto.

1.1.4.2.2 Mineralização

É a liberação de enxofre desde formas orgânicas e acontece tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas. Várias enzimas participam desta composição, mas, pode-se destacar o papel das serina sulfidrilase, que pode remover sulfeto de hidrogênio a partir da cisteína e da enzima cisteína sulfidrilase, que degrada compostos orgânicos liberando sulfeto e amônio.

1.1.5 Genes *aprA* e *dsrB* no ciclo do enxofre

Na figura 1.1 podem ser observados, os diferentes genes que codificam para as enzimas mais estudadas do ciclo do enxofre e, na tabela 1.1 as transformações e os grupos mais importantes neste ciclo.

Tabela 1.1 - Bactérias envolvidas no ciclo do enxofre

Processo	Reação	Grupo	Grupo microbiano	Referência	
Redução	Redução dissimilatória do sulfato	$\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HS}^-$ $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{HS}^-$ $\text{S}^0 \rightarrow \text{HS}^-$ $\text{SO}_3^- \rightarrow \text{HS}^-$	Heterotróficos oxidantes de S	Deltaproteobacteria (23 gêneros e 112 espécies), Nitrospirae, Clostridia, Thermodesulfobiaceae, Thermodesulfobacteria Euryarchaeota (<i>Archaeoglobus</i>) Crenarchaeota (<i>Caldivirga</i> , <i>Pyrobaculum</i> e <i>Thermocladium</i>)	(FORQUIN et al., 2011; GREIN et al., 2013; LIU; BEER; WHITMAN, 2012; MEYER; KUEVER, 2007a;2007b; MUYZER; STAMS, 2008; ZHOU et al., 2011)
	Redução assimilatória do sulfato e Imobilização	$\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{proteína}$ $\text{HS}^- \rightarrow \text{proteína}$ $\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{DMSP}$	Microrganismos que utilizam SO_4^{2-} ou H_2S na biossíntese	<i>Maioria dos microrganismos</i> . Alguns exemplos, Crenarcheota hipertermófila, Methanococcales, Methanobacteriales, Methanosarcinales	
	Respiração do enxofre	$\text{S}^0 \rightarrow \text{H}_2\text{S}$		<i>Desulfovibrio vulgaris</i> , <i>Pelobacter carbinolicus</i> , <i>Geobacter sulfurreducens</i> <i>Desulfurella acetivorans</i> <i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Wolinella succinogenes</i> <i>Oscillatoria limnetica</i> , <i>Cenarchaeota</i> (<i>Thermoproteales</i> , <i>Sulfolobales</i> , <i>Desulfurococacale</i>) <i>Euyarchaeota</i> (<i>Thermococcales</i> , <i>Thermoplasmatales</i> e <i>muitas metanogênicas</i>)	(BURNS; DICHRISTINA, 2009; HEDDERICH et al., 1999; LIU; BEER; WHITMAN, 2012)
Oxidação	Oxidação do sulfeto, sulfito e enxofre	$\text{HS}^- \rightarrow \text{S}^0$ $\text{S}^0 \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$ $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$	Autotróficos que usam a redução de S como energia.	Betaproteobacteria (<i>Thiobacillus</i> , <i>Thiomicrospira</i> , <i>Achromatium Beggiatoa</i>)	(GHOSH; DAM, 2009; LOY et al., 2009; STEWART et al., 2011; YAMAMOTO; TAKAI, 2011)
		$\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{S}^0$ $\text{S}^0 \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$	Fototróficos anaeróbios	<i>Cholorobi</i> (<i>Chlorobium</i>), <i>Chromatium</i> , <i>Ectothiorhodospira</i> , <i>Thiopedia</i> , <i>Rhodospseudomonas</i>	
	Mineralização	$\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{S}^0$ $\text{S}^0 \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$ $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$	Quimioautotróficas obrigatórias ou facultativas	<i>Acidithiobacillus</i> , <i>Sulfobacillus</i> , <i>Thiomicrospira</i> , <i>Achromatium</i> , <i>Beggiatoa</i> , <i>Thermothrix</i>	
		$\text{S-org} \rightarrow \text{HS}^-$ $\text{S-org} \rightarrow \text{S-volátil}$ Éster $\text{SO}_4 \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$	Heterotróficos que usam S-orgânico (energia).	Diversos microrganismos	

Entre os genes mais utilizados como marcadores moleculares encontra-se a adenosina-5'-fosfosulfato (APS) redutase (Apr), codificada pelo gene *aprAB*, que catalisa a conversão de APS para adenosina monofosfato (AMP) e sulfito (SO_3^{2-}) em SRP. Proteínas homólogas estão também presentes em procariotos oxidantes de enxofre (sulphur-oxidising bacteria, SOB) (MEYER; KUEVER, 2007b), catalisando a transformação de sulfito para APS em condições aeróbias. Outro gene de grande importância neste ciclo é o *dsrAB* que, por apresentar regiões conservadas dentro os SRP, é um dos genes mais utilizados na caracterização de tais comunidades (MUYZER; STAMS, 2008). Este gene codifica para a enzima redutase dissimilatória de sulfito (dSiR), a qual é responsável pela redução do sulfito para sulfeto de hidrogênio, tendo funcionalidade apenas em condições anaeróbias (MUYZER; STAMS, 2008). As dSiR estão compostas de duas subunidades, DsrA e DsrB, originadas a partir da duplicação do gene primitivo de *dsr*, antes da separação dos domínios Archaea e Bacteria (OLIVEIRA et al., 2011).

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

1.1.6 Grupos microbianos envolvidos no ciclo do enxofre em diferentes ecossistemas

A degradação da matéria orgânica em ambientes aeróbios ocorre, principalmente, pelo processo de respiração, enquanto sob anaerobiose esta atividade ocorre devido à presença de organismos anaeróbios, como os SRP. Arqueias e bactérias têm a habilidade de usar compostos sulfurosos em uma série de reações de óxido-redução, e, assim, gerar energia nos processos do metabolismo dissimilatório (OLIVEIRA et al., 2011).

Nos sedimentos marinhos de zonas temperadas, a degradação de 53% da matéria orgânica é feita pelas SRP e, nas camadas anóxicas dos marismas salgados, estas bactérias são responsáveis por valores entre 70% e 90% do total da degradação de compostos orgânicos (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001), o que mostra a importância dos redutores de sulfato em ambos os ciclos, do enxofre e do carbono. As SRP têm um grande papel na mineralização do enxofre orgânico, na produção de ferro e fósforo solúvel, além de estarem envolvidos na fixação biológica do nitrogênio, dando origem a nutrientes que são utilizados por outros organismos nos manguezais (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). Além dos ambientes anóxicos ou extremos, as SRP também têm sido reportadas em vários ambientes expostos a condições temporárias de variações na quantidade de oxigênio, incluindo biofilmes, mantos microbianos e sistemas de tratamento de águas residuais (FAN et al., 2012).

Em alguns trabalhos foi avaliada a estrutura da comunidade microbiana envolvida nas transformações do enxofre, mediante a análise do gene ribossomal 16S DNAr (SCHAUER et al., 2011). No entanto, os genes funcionais estão sendo cada vez mais alvos para este tipo de estudo, já que permitem estudar com maior especificidade a capacidade metabólica dos grupos de interesse nos diferentes ambientes (MUYZER; STAMS, 2008). Assim, os genes funcionais *aprA* e *dsrB* têm permitido acessar a grande diversidade de SRP presentes em distintos ecossistemas, tais como os pântanos salinos (QUILLET et al., 2012), as fontes hidrotermais (FRANK et al., 2013; SCHAUER et al., 2011), os vulcões de lama (GREEN-SAXENA et al., 2012), as lagoas de estabilização de águas residuais (BELILA et al., 2013; KLEIKEMPER et al., 2002), os estuarinos (OAKLEY et al., 2010), e os sedimentos de manguezais (ANDRADE et al., 2012; TAKETANI et al., 2010), entre outros ecossistemas, permitindo, dessa maneira, aprofundar na grande diversidade e potencialidade deste grupo microbiano, nos diferentes ambientes explorados.

Com base em tais inferências, as mudanças nas profundidades dos sedimentos, nos teores de contaminantes como metais pesados e derivados de petróleo e distintos níveis de estabilização das lagoas de águas residuais, entre outros, podem causar alterações na composição de comunidades microbianas relacionadas ao ciclo do enxofre. Acredita-se, porém, que estes grupos ainda estejam para ser mais detalhadamente descritos e acessados. Um passo importante nesse sentido seria o emprego de análises mais profundas e acuradas sobre tais organismos, o que compõe o tema central do presente trabalho.

Referências

- ALONGI, D.M.; CHRISTOFFERSEN, P.; TIRENDI, F. The influence of forest type on microbial-nutrient relationships in tropical mangrove sediments. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 171, p. 201-223, 1993.
- ANDRADE, L.L.; LEITE, D.; FERREIRA, E.; FERREIRA, L.; PAULA, G.R.; MAGUIRE, M.; HUBERT, C.; PEIXOTO, R.; DOMINGUES, R.; ROSADO, A. Microbial diversity and anaerobic hydrocarbon degradation potential in an oil-contaminated mangrove sediment. **BMC Microbiology**, London, v. 12, n. 1, p. 186, 2012.
- ANDREOTE, F.D.; JIMENEZ, D.J.; CHAVES, D.; DIAS, A.C.F.; LUVIZOTTO, D.M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELLA, C.C.; LOPEZ, M.V.; BAENA, S.; TAKETANI, R.G.; DE MELO, I.S. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 6, p. 1-14, 2012.
- BATES, S.T.; BERG-LYONS, D.; CAPORASO, J.G.; WALTERS, W.A.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. **ISME Journal**, London, v. 5, n. 5, p. 908-917, 2011.
- BELILA, A.; ABBAS, B.; FAZAA, I.; SAIDI, N.; SNOUSSI, M.; HASSEN, A.; MUYZER, G. Sulfur bacteria in wastewater stabilization ponds periodically affected by the 'red-water' phenomenon. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, n. 1, p. 379-394, 2013.
- BURNS, J.L.; DICHRISTINA, T.J. Anaerobic respiration of elemental sulfur and thiosulfate by *Shewanella oneidensis* MR-1 requires psrA, a homolog of the phsA gene of *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 16, p. 5209-5217, 2009.
- BURNS, K.A.; GARRITY, S.D.; JORISSEN, D.; MACPHERSON, J.; STOELTING, M.; TIERNEY, J.; YELLE-SIMMONS, L. The galeta oil spill.II. Unexpected persistence of oil trapped in mangrove sediments. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, London, v. 38, p. 349-364, 1994.
- CASTINE, S.A.; BOURNE, D.G.; TROTT, L.A.; MCKINNON, D.A. Sediment microbial community analysis: establishing impacts of aquaculture on a tropical mangrove ecosystem. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 297, n. 1/4, p. 91-98, 2009.
- CAVICCHIOLI, R. Archaea--timeline of the third domain. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 9, n. 1, p. 51-61, 2011.
- CLARK, M.W.; MCCONCHIE, D.; LEWIS, D.W.; SAENGER, P. Redox stratification and heavy metal partitioning in *Avicennia*-dominated mangrove sediments: a geochemical model. **Chemical Geology**, Amsterdam, v. 149, n. 3/4, p. 147-171, 1998.
- DIAS, A.C.; ANDREOTE, F.D.; RIGONATO, J.; FIORE, M.F.; MELO, I.S.; ARAUJO, W.L. The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 98, n. 4, p. 541-551, 2010.

DIAS, A.C.F.; DINI-ANDREOTE, F.; TAKETANI, R.G.; TSAI, S.M.; AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S.; ANDREOTE, F.D. Archaeal communities in the sediments of three contrasting mangroves. **Journal of Soils and Sediments**, Landsberg, v. 11, n. 8, p. 1466-1476, 2011.

DOS SANTOS, H.F.; CURY, J.C.; DO CARMO, F.L.; DOS SANTOS, A.L.; TIEDJE, J.; VAN ELSAS, J.D.; ROSADO, A.S.; PEIXOTO, R.S. Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 3, p. 1-8, 2011.

DUKE, N.C.; MEYNECKE, J.O.; DITTMANN, S.; ELLISON, A.M.; ANGER, K.; BERGER, U.; CANNICCI, S.; DIELE, K.; EWEL, K.C.; FIELD, C.D.; KOEDAM, N.; LEE, S.Y.; MARCHAND, C.; NORDHAUS, I.; DAHDOUN-GUEBAS, F. A world without mangroves? **Science**, Washington, v. 317, n. 5834, p. 41-42, 2007.

FAN, L.F.; TANG, S.L.; CHEN, C.P.; HSIEH, H.L. Diversity and composition of sulfate- and sulfite-reducing prokaryotes as affected by marine-freshwater gradient and sulfate availability. **Microbial Ecology**, New York, v. 63, n. 1, p. 224-237, 2012.

FASANELLA, C.C.; DIAS, A.C.F.; RIGONATO, J.; FÁTIMA FIORE, M.; SOARES, F.L.; MELO, I.S.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ELSAS, J.D.; ANDREOTE, F.D. The selection exerted by oil contamination on mangrove fungal communities. **Water, Air, & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 223, n. 7, p. 4233-4243, 2012.

FORQUIN, M.P.; HEBERT, A.; ROUX, A.; AUBERT, J.; PROUX, C.; HEILIER, J.F.; LANDAUD, S.; JUNOT, C.; BONNARME, P.; MARTIN-VERSTRAETE, I. Global regulation of the response to sulfur availability in the cheese-related bacterium *Brevibacterium aurantiacum*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 4, p. 1449-1459, 2011.

FRANK, K.L.; ROGERS, D.R.; OLINS, H.C.; VIDOUDEZ, C.; GIRGUIS, P.R. Characterizing the distribution and rates of microbial sulfate reduction at Middle Valley hydrothermal vents. **ISME Journal**, London, v. 7, n. 7, p. 1-11, 2013.

GHOSH, W.; DAM, B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 33, n. 6, p. 999-1043, 2009.

GIRI, C.; OCHIENG, E.; TIESZEN, L.L.; ZHU, Z.; SINGH, A.; LOVELAND, T.; MASEK, J.; DUKE, N. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. **Global Ecology and Biogeography**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 154-159, 2011.

GOMES, M.N.C.; BORGES, L.R.; PARANHOS, R.; PINTO, F.N.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; SMALLA, K. Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forests. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 96-109, 2008.

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 Ecology**, Amsterdam, v. 55, n. 2, p. 311-321, 2006.

GREEN-SAXENA, A.; FEYZULLAYEV, A.; HUBERT, C.R.; KALLMEYER, J.; KRUEGER, M.; SAUER, P.; SCHULZ, H.M.; ORPHAN, V.J. Active sulfur cycling by diverse mesophilic and thermophilic microorganisms in terrestrial mud volcanoes of Azerbaijan. **Environmental microbiology**, Oxford, v. 14, n. 12, p. 3271-3286, 2012.

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

GUMEROV, V.M.; MARDANOV, A.V.; BELETSKY, A.V.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E.A.; RAVIN, N.V. Molecular analysis of microbial diversity in the Zavarzin Spring, Uzon Caldera, Kamchatka. **Microbiology**, London, v. 80, n. 2, p. 244-251, 2011.

GUPTA, R.S.; SHAMI, A. Molecular signatures for the Crenarchaeota and the Thaumarchaeota. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 99, n. 2, p. 133-157, 2011.

HEDDERICH, R.; KLIMMEK, O.; KROGER, A.; DIRMEIER, R.; KELLER, M.; STETTER, K.O. Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 22, p. 353-381, 1999.

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, n. 4, p. 265-278, 2001.

KLEIKEMPER, J.; SCHROTH, M.H.; SIGLER, W.V.; SCHMUCKI, M.; BERNASCONI, S.M.; ZEYER, J. Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 4, p. 1516-1523, 2002.

LIANG, J.-B.; CHEN, Y.-Q.; LAN, C.-Y.; TAM, N.F.Y.; ZAN, Q.-J.; HUANG, L.-N. Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment. **Marine Biology**, Leibniz, v. 150, n. 5, p. 739-747, 2006.

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

LOY, A.; DULLER, S.; BARANYI, C.; MUSSMANN, M.; OTT, J.; SHARON, I.; BEJA, O.; LE PASLIER, D.; DAHL, C.; WAGNER, M. Reverse dissimilatory sulfite reductase as phylogenetic marker for a subgroup of sulfur-oxidizing prokaryotes. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 11, n. 2, p. 289-299, 2009.

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

MENDES, L.W.; TAKETANI, R.G.; NAVARRETE, A.A.; TSAI, S.M. Shifts in phylogenetic diversity of archaeal communities in mangrove sediments at different sites and depths in southeastern Brazil. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 163, n. 5, p. 366-377, 2012.

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

_____. Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes--origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. **Microbiology**, London, v. 153, n. 7, p. 2026-2044, 2007b.

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

NOBREGA, G.N.; FERREIRA, T.O.; ROMERO, R.E.; MARQUES, A.G.; OTERO, X.L. Iron and sulfur geochemistry in semi-arid mangrove soils (Ceara, Brazil) in relation to seasonal changes and shrimp farming effluents. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 185, n. 9, p. 7393-7407, 2013.

OAKLEY, B.B.; CARBONERO, F.; VAN DER GAST, C.J.; HAWKINS, R.J.; PURDY, K.J. Evolutionary divergence and biogeography of sympatric niche-differentiated bacterial populations. **ISME Journal**, London, v. 4, n. 4, p. 488-497, 2010.

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

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

PIRES, A.C.; CLEARY, D.F.; ALMEIDA, A.; CUNHA, A.; DEALTRY, S.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; SMALLA, K.; GOMES, N.C. Denaturing gradient gel electrophoresis and barcoded pyrosequencing reveal unprecedented archaeal diversity in mangrove sediment and rhizosphere samples. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 16, p. 5520-5528, 2012.

PRADA-GAMERO, R.M.; VIDAL-TORRADO, P.; FERREIRA, T.O. Mineralogia e físico-química dos solos de mangue do Rio Iriri no canal de Bertioga (Santos, SP). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 28, p. 233-243, 2004.

QUILLET, L.; BESAURY, L.; POPOVA, M.; PAISSE, S.; DELOFFRE, J.; OUDDANE, B. Abundance, diversity and activity of sulfate-reducing prokaryotes in heavy metal-contaminated sediment from a salt marsh in the Medway Estuary (UK). **Mar Biotechnology**, New York, v. 14, n. 3, p. 363-381, 2012.

RABUS, R.; HANSEN, T.A.; WIDDEL, F.; DWORKIN, M.; FALKOW, S.; FALKOW, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. **The prokaryotes: dissimilatory sulfate- and sulfur reducing prokaryotes**. 3rd ed. New York: Springer Verlag, 2006. 768 p.

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

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

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRON-MOLERO, G.; ADAIME, R.R.; CAMARGO, T.M. Variability of mangrove ecosystems along the Brazilian Coast. **Estuaries**, Columbia, v. 13, p. 204-218, 1990.

SCHAUER, R.; RØY, H.; AUGUSTIN, N.; GENNERICH, H.-H.; PETERS, M.; WENZHOEFER, F.; AMANN, R.; MEYERDIERKS, A. Bacterial sulfur cycling shapes microbial communities in surface sediments of an ultramafic hydrothermal vent field. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 13, n. 10, p. 2633-2648, 2011.

SCHLEPER, C.; JURGENS, G.; JONUSCHEIT, M. Genomic studies of uncultivated archaea. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 3, n. 6, p. 479-488, 2005.

STEWART, F.J. Dissimilatory sulfur cycling in oxygen minimum zones: an emerging metagenomics perspective. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 39, n. 6, p. 1859-1863, 2011.

STEWART, F.J.; DMYTRENKO, O.; DELONG, E.F.; CAVANAUGH, C.M. Metatranscriptomic analysis of sulfur oxidation genes in the endosymbiont of *solemya velum*. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 2, p. 134, 2011.

TAKETANI, R.G.; YOSHIURA, C.A.; DIAS, A.C.; 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.

YAMAMOTO, M.; TAKAI, K. Sulfur metabolisms in epsilon- and gamma-proteobacteria in deep-sea hydrothermal fields. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 2, p. 192, 2011.

YAN, B.; HONG, H.; YU, Z.-N. Archaeal communities in mangrove soil characterized by 16S rRNA gene clones. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 44, n. 5, p. 566-571, 2006.

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

2 COMUNIDADES OXIDANTES DO ENXOFRE E REDUTORAS DE SULFATO EM SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS BRASILEIROS

Resumo

Os manguezais são ambientes predominantemente anaeróbicos, ricos em sulfato e em matéria orgânica. Embora o ciclo do enxofre tenha grande atuação neste ecossistema, pouco é conhecido com relação às comunidades microbianas nos solos de manguezal. Foram investigadas a abundância, a composição e a diversidade das bactérias oxidantes de enxofre (*sulphur-oxidising*, SOB) e redutoras de sulfato (*sulphate-reducing*, SRB) em sedimentos de três manguezais brasileiros, sendo dois contaminados, um com petróleo (OilMgv) e outro com resíduos antropogênicos (AntMgv), e um pristino (sem contaminação) (PrsMgv). A estrutura da comunidade foi estudada utilizando-se qPCR, PCR-DGGE e biblioteca de clones, usando os genes codificadores da enzima adenosine-5'-fosfosulfato redutase (APS) (*aprA*) e sulfito redutase (DSR) (*dsrB*). A abundância por qPCR mostrou que a razão *dsrB/aprA* é variável entre os manguezais e que houve relação com o gradiente observado no manguezal contaminado com petróleo (OilMgv). Os perfis do DGGE analisados por non metric multidimensional scaling (NMDS) revelaram diferenças na estrutura das comunidades presentes nos três manguezais estudados. A biblioteca de clones mostrou que, nos sedimentos dos manguezais, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Deltaproteobacteria são os grupos mais abundantes associados com o ciclo do enxofre. Neste estudo concluiu-se que as comunidades microbianas de SOB e SRB são diferentes em cada manguezal e que, possivelmente, podem ser utilizadas como um indicador da contaminação nos manguezais.

Palavras-chave: Ciclo do enxofre; DGGE; qPCR; Biblioteca de clones

Abstract

Mangrove soils are prevalent anaerobic environments rich in sulphate and organic matter. Although the sulphur cycle is one of the major actors in this ecosystem, little is known regarding the sulphur bacteria communities in mangrove soils. We investigated the abundance, composition and diversity of sulphur-oxidising (SOB) and sulphate-reducing (SRB) bacteria in sediments from three Brazilian mangrove communities: two contaminated, one with oil (OilMgv) and one with urban waste and sludge (AntMgv), and one pristine (PrsMgv). The community structures were assessed using qPCR, PCR-DGGE and clone libraries, using genes for the enzymes adenosine-5'-phosphosulphate (APS) reductase (*aprA*) and sulphite reductase (Dsr) (*dsrB*). The abundance for qPCR showed the ratio *dsrB/aprA* to be variable among mangroves and higher according to the gradient observed for oil contamination in the OilMgv. The DGGE patterns analysed by Nonmetric Multidimensional Scaling (NMDS) revealed differences among the structures of the three mangrove communities. The clone libraries showed that Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria and Deltaproteobacteria were the most abundant groups associated with sulphur cycling in mangrove sediments. We conclude that the microbial SOB and SRB communities in mangrove soils are different in each mangrove forest and that such microbial communities could possibly be used as a proxy for contamination in mangrove forests.

Keywords: Sulfur cycle; DGGE; qPCR; Clone libraries

2.1 Introdução

Os manguezais são ecossistemas costeiros de transição entre os ambientes terrestres e marinhos que são constantemente afetados pela inundação da água de mar (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). Estes ambientes podem ser encontrados em aproximadamente 60%-75% das áreas costeiras do planeta, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). Na América Latina há áreas de grande cobertura de florestas de manguezais, com 4 milhões de hectares nas costas do Pacífico e do Atlântico (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). Este ecossistema é de grande importância ecológica, uma vez que protege as costas das ações do mar (DUKE et al., 2007) e apresenta alta produtividade e altos níveis de matéria orgânica, atuando como base do ciclo da vida de muitas espécies (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). Embora a importância dos manguezais seja conhecida, eles são constantemente afetados por fatores naturais e antropogênicos, que os colocam em perigo de extinção (DUKE et al., 2007).

Os manguezais são, principalmente, anaeróbicos, com uma fina capa aeróbica (0-4 cm) (ATTRI; KERKAR; LOKABHARATHI, 2011; HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001), apresentando altos e variáveis níveis de salinidade, potencial redox, conteúdo de matéria orgânica e fontes de enxofre (CLARK et al., 1998; LYIMO; POL; OP DEN CAMP, 2002; PRADA-GAMERO; VIDAL-TORRADO; FERREIRA, 2004). Nestas condições ambientais, o enxofre, em suas diferentes formas, está sujeito a muitas transformações mediadas por microrganismos (BIDERRE-PETIT et al., 2011; FAN et al., 2012). Por exemplo, bactérias anoxigênicas fotolitotróficas e quimiolitotróficas sulfuro-oxidantes (SOB) e bactérias quimiolitotróficas e quimioheterotróficas anaeróbias restritas redutoras de sulfato (SRB) são muito importantes nas transformações do enxofre, desempenhando grande papel nas reações de oxidação e redução, e geração de energia metabólica (MUYZER; STAMS, 2008). As SOB compõem um grupo essencial para a detoxificação do sulfeto nos sedimentos (LIANG et al., 2006) e, da mesma maneira, as SRB estão também envolvidas nas reações de redução dissimilatória do sulfato, que é o maior processo anaeróbico de biomineralização (gerando H_2S), sendo, assim, responsáveis pela degradação de até 50% da matéria orgânica nos sedimentos marinhos (JØRGENSEN, 1982). Além disso, o sulfato pode também ser incorporado à biomassa pelas reações de assimilação (MUYZER; STAMS, 2008).

Os marcadores moleculares disponíveis para rastrear os organismos relacionados com o ciclo do enxofre estão baseados, principalmente, em genes funcionais que codificam enzimas fundamentais dentro do ciclo, tais como a adenosina-5'-fosfosulfato (APS) reductase

(Apr), codificada pelo gene *aprA*, e a redutase dissimilatória do sulfato (Dsr), codificada pelo gene *dsrB*. A enzima Apr catalisa a conversão de APS para adenosine monofosfato (AMP) e sulfito (SO_3^{2-}) em SRB. Proteínas homólogas estão também presentes em SOB (MEYER; KUEVER, 2007b). A enzima Dsr catalisa a redução de sulfito (SO_3^{2-}) para sulfeto (S^{2-}) em SRB (MUYZER; STAMS, 2008).

As comunidades de SOB e SRB são fisiologicamente e filogeneticamente diversas. As comunidades de SOB apresentam membros afiliados em α -, β -, γ -, e ϵ -proteobacteria, Chlorobia e Chloroflexi (BELILA; SNOUSSI; HASSAN, 2012; GHOSH; DAM, 2009). Em contrapartida, as SRB estão agrupadas dentro de sete grupos taxonômicos, cinco em bactérias e dois em arqueias. No entanto, maior número de SRB é encontrado nas classes δ -proteobactéria, bactérias gram-positivas e arqueias termófilas (BELILA; SNOUSSI; HASSAN, 2012; MUYZER; STAMS, 2008). SRB é também um grupo com capacidade de degradar substratos complexos, tais como hidrocarbonetos aromáticos e hidrocarbonetos derivados de petróleo em ambientes anóxicos (MUYZER; STAMS, 2008; PEREZ-JIMENEZ; KERKHOF, 2005), sugerindo que tais organismos sejam responsivos ao derramamento de petróleo nos manguezais.

A ocorrência destes grupos em vários ambientes tem sido demonstrada utilizando-se os genes marcadores *aprA* e *dsrB*. Com base na detecção do gene *dsrB*, a diversidade e a abundância de bactérias redutoras de sulfato foram avaliadas em pântanos salinos, indicando a prevalência de Desulfovibrionaceae na superfície desses ambientes contaminados com metais pesados (QUILLET et al., 2012). Estudos similares, usando os dois genes, têm sido realizados em fontes hidrotermais (FRANK et al., 2013), vulcões de lama (GREEN-SAXENA et al., 2012) e lagoas de estabilização de águas residuais (BELILA et al., 2013). Nestes estudos, as análises usando os dois genes são complementares e, com isso, os autores demonstram evitar o problema produzido pela análise de um gene só. Contudo, a presença desses grupos em sedimentos de manguezais tem sido reportada raramente. Taketani et al. (2010b) descreveram a diversidade de bactérias redutoras de sulfato (acessadas pelo gene *dsrB*) como um grupo sensível à profundidade de amostragem nos manguezais prístinos nativos no Brasil.

No presente estudo, foram determinadas a abundância, a estrutura da comunidade e a diversidade de SOB e SRB em sedimentos de três manguezais com diferentes tipos de intervenção, utilizando-se os genes funcionais *aprA* e *dsrB*, para avaliar a composição da comunidade. Este estudo foi também complementar a uma série de pesquisas realizadas por nosso grupo de pesquisa e que tiveram como objetivo acessar as comunidades microbianas

nesses manguezais. Nestes trabalhos prévios, caracterizaram-se os grupos microbianos presentes nestas áreas, descrevendo as mudanças no conteúdo de arqueias (DIAS et al., 2011), fungos (FASANELLA et al., 2012) e cianobactérias (RIGONATO et al., 2013). Em adição, um estudo metagenômico nas mesmas áreas descreveu as possíveis transformações biogeoquímicas que podem ocorrer nesses sedimentos (ANDREOTE et al., 2012), indicando a ocorrência de bases genéticas das transformações do enxofre neste nicho. Este trabalho foi publicado na *Environmental Microbiology* (EMI), DOI: 10.1111/1462-2920.12237.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

2.2.1.1 Descrição dos locais de coleta

O presente estudo foi desenvolvido em três manguezais no estado de São Paulo, sendo dois localizados no município de Bertioga [OilMgv (23°53'49" S e 46°12'28" W) e AntMgv (23°54'06" S e 45°15'03" W)] e um no município de Cananéia (PrsMgv) (25°08'02" S e 47°57'42" W). Estes manguezais apresentam diferentes estados de intervenção e conservação. O primeiro sofreu o impacto causado pelo derramamento de 35 milhões de litros de petróleo, ocorrido em 1983 (OilMgv); o segundo está medianamente afetado pela contaminação antropogênica causada pelos resíduos de esgoto (AntMgv), devido à sua proximidade com o centro da cidade (aproximadamente 6 km) e o terceiro pertence à área protegida da Ilha do Cardoso, que é considerada pristina (PrsMgv). As duas regiões dos manguezais têm diferente vegetação e condições de alagamento (ANDREOTE et al., 2012). Os manguezais de Bertioga são inundados com uma mistura da água do mar e a do rio Iriri, o qual cruza a área, enquanto o manguezal de Cananéia está constantemente inundado só pela água do mar.

A amostragem em cada manguezal foi realizada por transectos de aproximadamente 300 m, desde o mar até a costa. Três sub-regiões foram definidas: a primeira, próxima do mar (ponto 1); a segunda, no centro (ponto 2) e a terceira, próxima da costa (ponto 3). Em cada uma dessas três sub-regiões, três subamostras foram tomadas separadamente, a uma distância de, aproximadamente, 30 metros. Ao todo, foram obtidas 27 amostras, as quais pertencem a três manguezais, três pontos amostrais e três repetições por amostra. Cada amostra foi obtida com um amostrador cilíndrico de 30 cm de profundidade e 7 cm de diâmetro. As amostras foram colocadas em sacolas plásticas, fechadas e mantidas em gelo até serem levadas ao laboratório (aproximadamente 10 horas). O sedimento de cada amostra totalmente homogeneizado (aproximadamente 2 g) foi armazenado, a 80 °C, até a extração do DNA.

2.2.1.2 Caracterização do solo e extração do DNA

Algumas características químicas do solo dos manguezais já foram publicadas previamente (DIAS et al., 2011). Análises adicionais de enxofre total (S), conteúdo de sulfato (SO_4^{-2}), conteúdo de matéria orgânica e pH foram realizadas no Laboratório de Análises de Solo da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP, Piracicaba, Brasil), utilizando-se a metodologia descrita em Rajj et al. (2001) (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Caracterização de sedimentos de manguezais utilizados neste estudo. Os pontos amostrais foram divididos em área mais perto do mar (P1), meio do manguezal (P2) e mais próxima da terra (P3), como foi descrito em materiais e métodos

	OilMgv			AntMgv			PrsMgv		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
Conteúdo de água (%)	58,1	80,3	69,6	73,9	72,8	65,1	62,8	34,7	34,9
pH	5,2	6,3	6,3	5,1	7,3	6,6	6,9	6,9	6,9
Materia orgânica (g/dm ³)	131,0	323,0	219,0	243,0	247,0	210,0	57,0	112,0	58,0
Sulfato (mM)	10,2	11,9	7,2	9,9	10,2	7,2	13,0	3,9	2,1
Enxofre total (%)	0,31	0,36	0,32	0,24	0,26	0,20	0,23	0,14	0,14
Sulfato/enxofre total (%)	10,5	10,6	7,2	13,1	12,5	11,5	18,1	8,9	4,7

O DNA total de cada amostra foi extraído com o emprego do kit de isolamento PowerSoil DNA (Mobio, NY, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, a integridade e a quantificação do DNA foram determinadas por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x (Tris, ácido acético, EDTA), o qual revelou uma concentração média de 30 ng/ μL por amostra.

2.2.1.3 Quantificação dos genes *aprA* e *dsrB* por PCR em tempo real

O número de cópias dos genes *aprA* e *dsrB* foi determinado para cada repetição de cada amostra, utilizando-se 1 μL do DNA (aproximadamente 30 ng). A quantificação foi realizada no *StepOne plus Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), usando o sistema de SYBER Green I. As reações para os dois genes foram realizadas em um volume de 25 μL , contendo 12,5 μL do kit *Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Brasil) e 0,2 μM dos *primers* específicos de cada gene. Os *primers* de *aprA*-1-F (5'-TGGCAGATCATGATYMATGG-3') e *aprA*-5-R (5'-GCCCCAACYGGRCCRTA-3') (MEYER; KUEVER, 2007b) foram utilizados para o gene *aprA* em uma reação de amplificação com desnaturação inicial de 95 °C, por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94 °C,

por 15 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. Da mesma maneira, foi feita a quantificação do gene *dsrB* com os *primers* DSRp2060F (5'-CAACATCGTYCAYACCCAGGG-3') (GEETS et al., 2006) e DSR4R (5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3') (WAGNER et al., 1998), numa reação com 45 ciclos de 95 °C, por 45 segundos, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto.

Com o objetivo de verificar a especificidade da amplificação, foi feita uma curva de desnaturação, a qual foi realizada ao final de cada reação, em uma faixa de temperatura de 60 °C a 96 °C. Para a quantificação dos genes alvos, curvas padrões foram construídas para a amplificação de um número conhecido de cópias de DNA, usando uma série de reações com diluições seriadas. Os valores do threshold do ciclo (Ct) para a amplificação do DNA foram interpolados nas curvas padrões para determinar o número de genes por grama de solo de manguezal. A amplificação do DNA alvo das diferentes diluições também resultou na geração dos valores de eficiência da amplificação e na correlação logarítmica (R^2) entre o número de ciclos e a quantidade do DNA nas curvas padrões. Os resultados foram comparados utilizando-se ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$), realizados no programa PAST (versão 2.09) (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

2.2.1.4 Amplificação do gene *aprA* e *dsrB* para DGGE

O DNA de cada amostra foi utilizado para a amplificação dos genes *aprA* e *dsrB*. A amplificação destes genes para DGGE foi realizada utilizando-se reações de 50 µL contendo 1 µL de DNA. Os genes *aprA* e *dsrB* foram amplificados com os mesmos *primers* da PCR em tempo real, com as condições de amplificação descritas por Meyer e Kuever (2007b), para *aprA* e por Geets et al. (2006), para *dsrB*. Em seguida, o DGGE foi realizado usando o Ingeny PhorU2 system (Ingeny, Goes, the Netherlands), com um gradiente desnaturante de 45%-65% (100% desnaturante com 7 M ureia e 40% de formamida) e 6% para 8% poliacrilamida (GEETS et al., 2006; MEYER; KUEVER, 2007b). A eletroforese da corrida do DGGE foi realizada à temperatura de 60 °C e mantida a 100 V por 16 horas. Depois da eletroforese, o gel foi corado com SYBR Gold (a uma concentração final de 0,5 mg L⁻¹, Invitrogen, Breda, the Netherlands) e, posteriormente, os géis foram visualizados em um sistema fotodocumentador de luz UV.

Os dados de DGGE foram normalizados e analisados pelo software GelComparII (Applied Maths, SintMartens Latem, Belgium). Os perfis de DGGE foram convertidos em matrizes de presença e ausência, e a visualização das diferenças entre as amostras foi

realizada pelo NMDS, calculado pela matriz de similaridade Bray-Curtis. Análises de similaridade (ANOSIM) foram realizadas para suportar estatisticamente as diferenças entre os grupos. Adicionalmente, os modelos do DGGE foram correlacionados com as variáveis ambientais, incluindo umidade (%), matéria orgânica (g/dm^3), sulfato (mM), enxofre total (%) e S-sulfato/enxofre total (%) e variáveis nominais (distintos manguezais e distintas áreas em cada manguezal). A correlação entre essas variáveis foi examinada por análise multivariada, usando Canoco software (Canoco 4.5, Biometris, Wageningen, The Netherlands). Primeiro, uma análise de correspondência (DCA) foi calculada, sendo observada uma distribuição linear (tamanho do gradiente <3), a qual mostrou que o melhor modelo matemático para ser aplicado nos dados é a análise de redundância (RDA). Para mais informações, revisar Andreote et al. (2009). O modelo de redundância (RDA) foi determinado com base no teste de Monte Carlo, com 999 repetições, para determinar a significância dos parâmetros ambientais. Os valores de lambda 1 e o nível de significância das variáveis foram avaliados utilizando-se Forward Selection (*FS*).

2.2.1.5 Construção e análises das bibliotecas de clones dos genes *aprA* e *dsrB*

Bibliotecas dos genes *aprA* e *dsrB* foram construídas para cada manguezal, usando uma mistura dos produtos de PCR de cada gene, desde cada amostra (9 por área). Os genes *aprA* e *dsrB* foram amplificados com o mesmo grupo de *primer* usado para qPCR e PCR-DGGE, e as condições da reação de PCR foram as mesmas empregadas para o DGGE. O pool de amplicons foi purificado e clonado dentro de plasmídeos de *E.coli*, usando o kit pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison, USA), como descrito nas instruções do fabricante. As colônias contendo os insertos do vetor (sem cor) foram selecionadas e amplificadas com os *primers* M13R e M13F. Os clones com insertos do tamanho esperado (400 e 350 pb para *aprA* e *dsrB*, respectivamente) foram submetidos ao sequenciamento pelo ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems). As sequências obtidas neste estudo foram depositadas na base de dados do Genbank, com os números de acesso KC107373 a KC107439 e KC107293 a KC107372, para os genes *aprA* e *dsrB*, respectivamente.

Depois do sequenciamento todos os cromatogramas foram trimados da sequência do vetor por qualidade no Ribosomal Data Project Pipeline, usando LUCY (CHOU; HOLMES, 2001). As sequências trimadas foram analisadas com o Mothur (SCHLOSS et al., 2009) e as unidades taxonômicas operacionais (OTU) foram determinadas a 80% de similaridade, para curvas de rarefação, estimativa de cobertura, e os índices de riqueza (Chao 1) e diversidade

(Shannon H') (CHAO, 1984; CHAO; LEE, 1992). As análises filogenéticas foram realizadas utilizando-se uma sequência representante de cada OTU e foram comparadas com a base de dados do Fungene, e as sequências com maiores similaridades foram usadas para o alinhamento e a construção da árvore filogenética. A inferência filogenética foi realizada utilizando-se MEGA 5.0 software (TAMURA et al., 2011), com base no parâmetro do Kimura-2 e neighbour joining. A consistência dos ramos foi avaliada pelo teste de bootstrap, realizado com 1.000 repetições.

2.3 Resultados

2.3.1 Quantificação dos genes funcionais *aprA* e *dsrB* por PCR em tempo real

A abundância relativa das comunidades de SOB e SRB, nas três áreas, foi determinada usando os genes *aprA* e *dsrB* (Figura 2.1a), com valores de eficiência 0,97 e 0,73, para os genes *aprA* e *dsrB*, respectivamente, e um valor do R^2 de 0,99, para ambos os genes. Em geral, a abundância do *aprA* foi maior que a abundância do gene *dsrB*, variando de 5,0 a 5,6, para *aprA* e de 4,8 para 5,2, em *dsrB* (valores log do número de cópias por grama de sedimento). Os valores absolutos para ambos os genes foram similares entre as áreas de manguezais, sem diferenças significativas entre eles ($p < 0,05$). Um efeito mais claro dessa diferença foi observado quando a razão *dsrB/aprA* foi calculada, indicando, possivelmente, um balanço entre a abundância de SOB e de SRB nas áreas estudadas (Figura 2.1b). Valores similares para esta razão foram observados em todas as áreas de cada um dos manguezais estudados, desde as áreas sem contaminação com petróleo, de 23% e 40%, para AntMgv e PrsMgv, respectivamente. Dentro do manguezal contaminado com petróleo (OilMgv), os valores foram diferentes ($p < 0,05$) e proporcionais ao nível de contaminação, sendo de 35% para o ponto 1, de 65% para o ponto 2 e de 85% para o ponto 3 (Figura 2.1b).

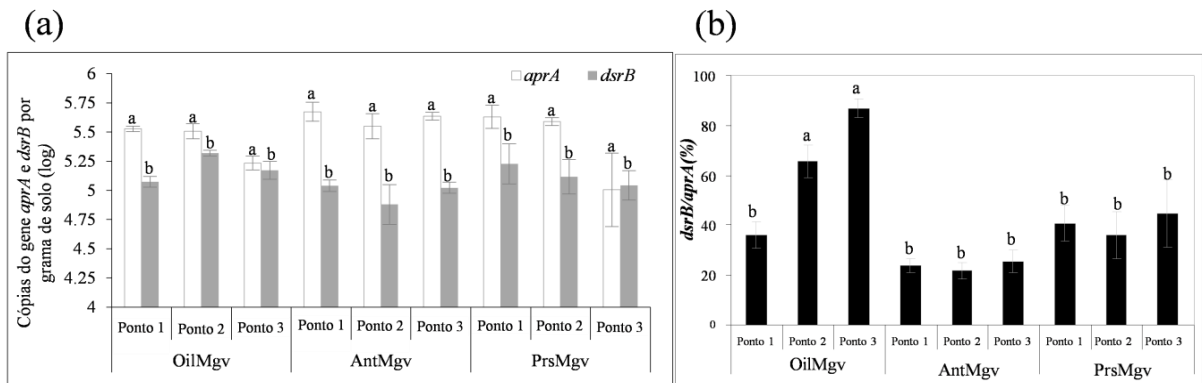


Figura 2.1 - Abundância dos genes *aprA* e *dsrB* (a) e razão na abundância de *dsrB/aprA* (b) em sedimentos de manguezais (OilMgv, AntMgv, PrsMgv) com diferentes tipos de intervenção. Valores são representados por um valor médio de 3 repetições e as barras indicam o erro padrão

2.3.2 Composição das comunidades de SOB e SRB reveladas por PCR-DGGE

A estrutura das comunidades de SOB e SRB presentes nos três manguezais foi acessada por PCR-DGGE, com base nos genes *aprA* e *dsrB*. Esta técnica revelou que esses manguezais possuem comunidades diversas, as quais foram mostradas pelos diferentes números e intensidade das bandas, nas duas análises (Figura 2.2 a, b). A análise do gene *aprA* indicou que o número de bandas variou desde 18 até 41, com valor médio de 30, enquanto o gel de DGGE do *dsrB* revelou que o número de bandas variou de 24 para 40, com valor médio de 33 (Tabela S 2.1).

Uma melhor visualização da similaridade das comunidades com base dos genes *aprA* e *dsrB* pode ser obtida no NMDS (Figura 2.2 c, d). Os manguezais mostraram clara separação dos perfis obtidos para os dois genes funcionais. Adicionalmente, no manguezal contaminado com petróleo (OilMgv), dois subgrupos podem ser observados, sendo um grupo nas amostras coletadas no ponto 1 e outro subgrupo nas amostras dos pontos 2 e 3. Esta distinção parece ocorrer devido à exposição dos últimos pontos a um maior nível de contaminação. Estes resultados foram confirmados pelo teste ANOSIM (Tabela 2.2), o qual permitiu identificar a diferente composição destas comunidades em cada amostra de manguezal.

Para o gene *aprA*, os valores de R variaram de 0,6046 para 0,7833, enquanto, para o gene *dsrB*, os valores foram de 0,7438 para 0,9897 (Tabela 2.2). No entanto, quando as amostras do ponto 1 foram comparadas com as amostras dos pontos 2 e 3, no mesmo manguezal (OilMgv), os valores do R foram 0,9568 e 1,00, para *aprA* e *dsrB* ($p < 0,05$), respectivamente, indicando que a comunidade microbiana envolvida na ciclagem do enxofre desde o ponto 1 é diferente da dos outros pontos (2 e 3). Nos outros manguezais, a diferença entre os pontos amostrais não foi significativa. Os modelos de correlação do DGGE com os

parâmetros ambientais (Tabela 2.3) baseados no RDA mostraram que a matéria orgânica e o conteúdo do enxofre total tiveram as maiores correlações com a estrutura da comunidade, para ambos os genes funcionais (*aprA* e *dsrB*).

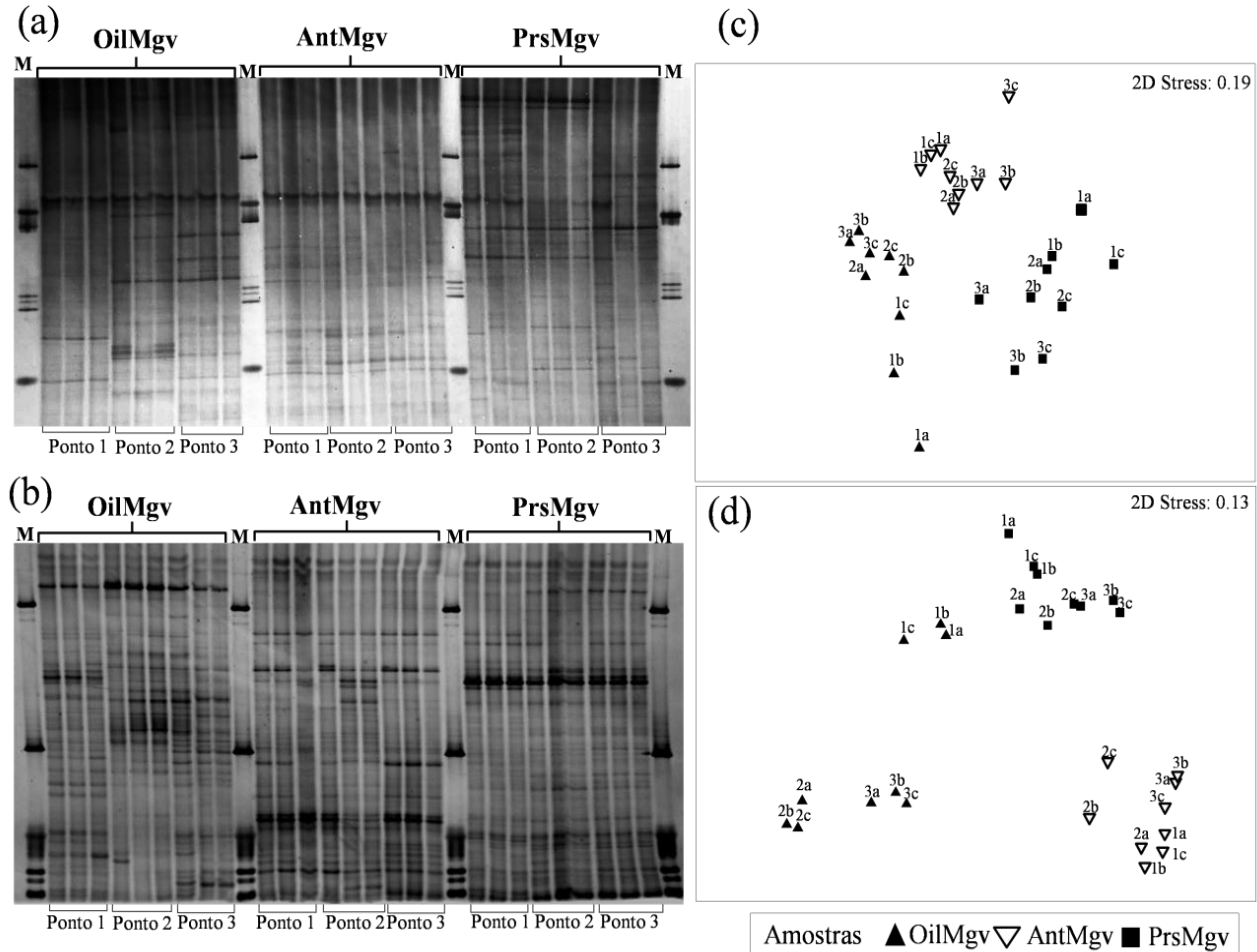


Figura 2.2 - Composição das comunidades de SOB e SRB em sedimentos de manguezal pelo perfil de DGGE baseado nos genes *aprA* (a) e *dsrB* (b). Análises de NMDS dos perfis de DGGE para *aprA* (a) e *dsrB*. M indicam os marcadores

Tabela 2.2 - Análises de similaridade (ANOSIM; Valores de R) das comunidades de SOB e SRB em três distintos manguezais, usando os modelos de DGGE baseados nos genes *aprA* e *dsrB*

Manguezal	<i>aprA</i>			<i>dsrB</i>		
	OilMgv	AntMgv	PrsMgv	OilMgv	AntMgv	PrsMgv
OilMgv	-	0.6046*	0.7339*	-	0.9897*	0.7438*
AntMgv	-	-	0.7833*	-	-	0.9537*
PrsMgv	-	-	-	-	-	-

*diferença significativa $p < 0.05$

Tabela 2.3 - Variáveis ambientais significativas na estrutura das comunidades de oxidantes de enxofre e redutoras de sulfato, baseadas nos perfis no DGGE para os genes *aprA* e *dsrB*, respectivamente. Os valores de lambda foram obtidos da seleção de *forward* nas análises de redundância

Variável	<i>aprA</i>		<i>dsrB</i>	
	Lambda 1	<i>p</i> Value	Lambda 1	<i>p</i> Value
Matéria orgânica (g/dm ³)	0,19	0,001	0,16	0,001
Sulfato/ Enxofre Total (%)	0,1	0,001	0,03	NS
Enxofre total (%)	0,11	0,001	0,14	0,001
Conteudo de agua (%)	0,06	0,002	0,13	0,001
Sulfato (mM)	0,07	0,002	0,06	0,001
pH	0,05	0,004	0,08	0,001

*NS, não diferença significativa $p < 0.05$

2.3.3 Análises de sequências dos genes *aprA* e *dsrB* nas bibliotecas de clones

Seis bibliotecas de clones foram construídas, uma por manguezal (OilMgv, AntMgv e PrsMgv) e para cada gene funcional (*aprA* e *dsrB*). Um total de 155 sequências foi obtido e, delas, 75 foram de *aprA* (agrupadas em 43 OTUs) e 80 sequências de *dsrB* (agrupadas em 36 OTUs). Com base no número de OTUs foram construídas as curvas de rarefação (Figura S 2.1) e calculados os índices de riqueza (Chao 1) e diversidade (Shannon) para cada gene (Tabela 2.4). As curvas de rarefação mostraram que o esforço amostral permitiu acessar uma fração significativa da diversidade dos genes *aprA* e *dsrB* presentes nos três manguezais, aproximadamente entre 64% e 85%, como estimado pelos valores de cobertura (Tabela 2.4).

As curvas de rarefação, suportadas pelos valores de Shannon, mostraram que OilMgv e AntMgv abrigaram mais diversidade associada a organismos contendo o gene *aprA*. Similarmente, a aplicação do estimador de riqueza (Chao 1) indicou que as comunidades de SOB e SRB medidas pelo gene *aprA* foram as mais ricas em OilMgv e AntMgv (27,0-27,2), enquanto a comunidade de SRB baseada no *dsrB* revelou maior similaridade entre os dados (alto intervalo de confiança). Além das estimativas de riqueza e diversidade, as OTUs foram também utilizadas para representar a afiliação taxonômica dos organismos envolvidos nas transformações do enxofre nos sedimentos dos manguezais (Figura S. 2.2).

Tabela 2.4 - Dados de biblioteca de clones dos genes *aprA* e *dsrB*. Estimativa de OTUs, diversidade, riqueza e cobertura em função do número de sequências

		Número de sequências	OTUs	Estimador de Chao1'	Shannon H'	Cobertura %
<i>aprA</i>	OilMgv	28	16	27,2 (18,6 - 63,7)	2,6 (2,3 - 2,9)	64
	AntMgv	29	18	27,0 (17,6 - 69,2)	2,5 (2,2 - 2,8)	68
	PrsMgv	18	9	9,5 (8,1 - 23,1)	1,9 (1,6 - 2,2)	83
<i>dsrB</i>	OilMgv	26	12	12,0 (10,2 - 26,0)	2,0 (1,8 - 2,4)	85
	AntMgv	30	11	17,5 (11,3 - 52,5)	1,7 (1,3 - 2,1)	80
	PrsMgv	24	13	20,0 (14,4 - 46,7)	2,3 (1,9 - 2,7)	67

As OTUs do gene *aprA* foram afiliadas a dois ramos na árvore filogenética (Figura 2.3), a qual foi criada para melhorar os alinhamentos das OTUs similares a uma sequência das bactérias não cultiváveis (*uncultured bacterium*) (Figura 2.3b). Comparado com as outras sequências, este grupo mostrou menos que 70% de similaridade. A primeira árvore (Figura 2.3a), abrangendo grupos com maiores níveis de afiliação taxonômica, foi dividida em cinco grupos, três de SRB conhecidos e dois de SOB. OTUs afiliadas com SOB formaram um clado pertencente a Betaproteobacteria e outro a Gammaproteobacteria, no qual a maioria das OTUs foi de OilMgv (13) e de AntMgv (6). A maior parte das OTUs oriundas da área PrsMgv foi afiliada com o clado de bactérias não cultivadas.

A árvore filogenética do gene *dsrB* (Figura 2.4) revelou que todas as OTUs foram afiliadas aos grupos de bactérias redutoras de sulfato e sulfito, taxonomicamente relacionadas com Deltaproteobacteria. Os dois maiores cladogramas observados foram relacionados com Desulfobacterales e Desulfovibrionales. No primeiro clado (Desulfobacterales), os três manguezais foram representados por um número similar de sequências dentro das OTUs geradas, enquanto, no segundo clado (Desulfovibrionales), a maioria das OTUs pertencia ou a AntMgv (16) ou a OilMgv (14). Em adição, outros dois pequenos grupos foram observados, abrangendo sequências oriundas de PrsMgv.

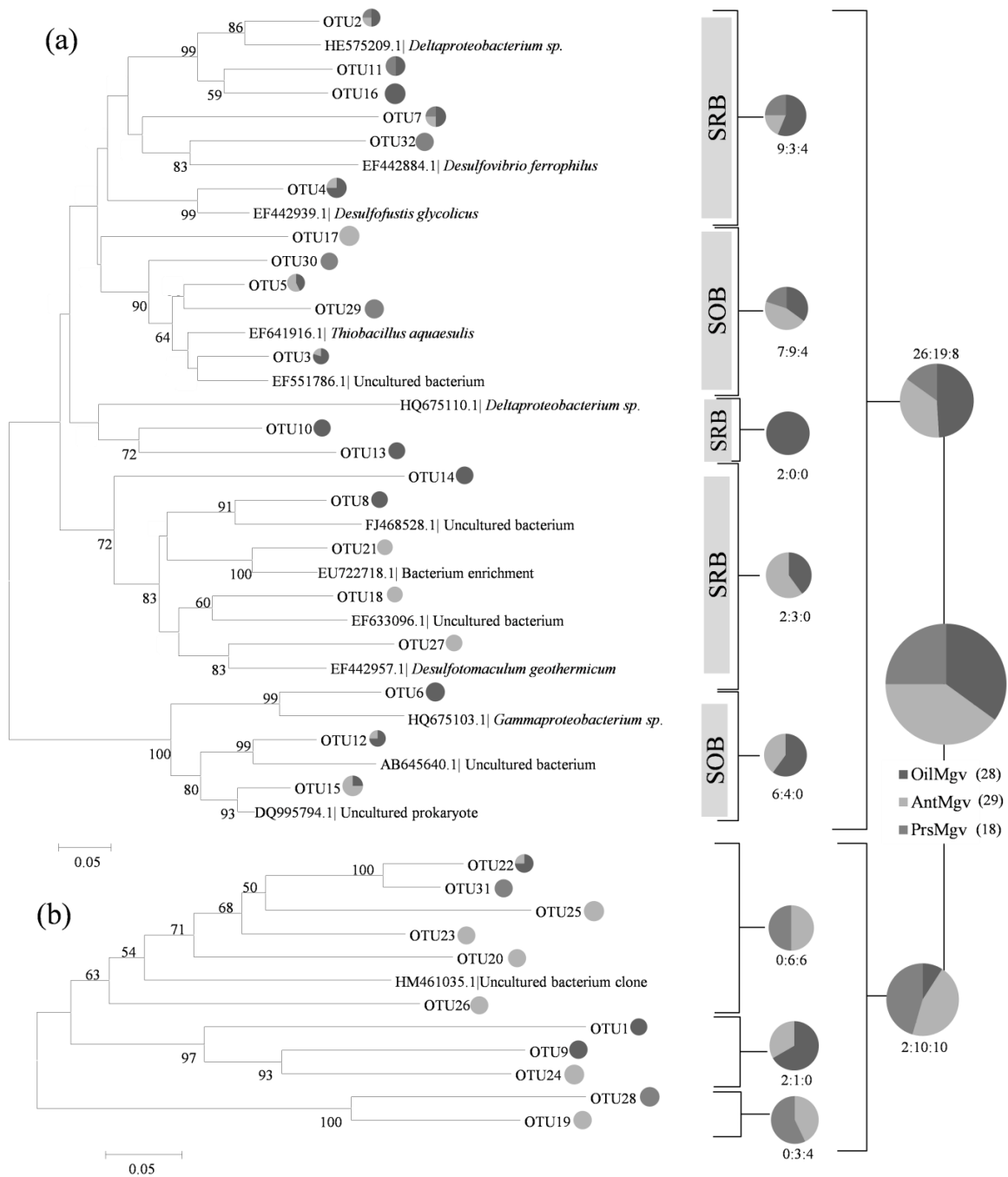


Figura 2.3 – Árvores filogenéticas baseadas na biblioteca de clones para os genes *aprA* desde sedimentos dos diferentes manguezais. Uma árvore está composta por OTUs que pertencem às comunidades de SOB e SRB (a) e a outra árvore está composta de OTUs que são afiliados com as bactérias não cultiváveis (b). Os diagramas de pie e os números abaixo do diagrama mostram o número de seqüências alocadas por manguezal (OilMgv, AntMgv e PrsMgv, respectivamente), em cada um dos 32 OTUs. Os valores nos nodos indicam porcentagens maiores de 50% (total de 1.000 repetições)

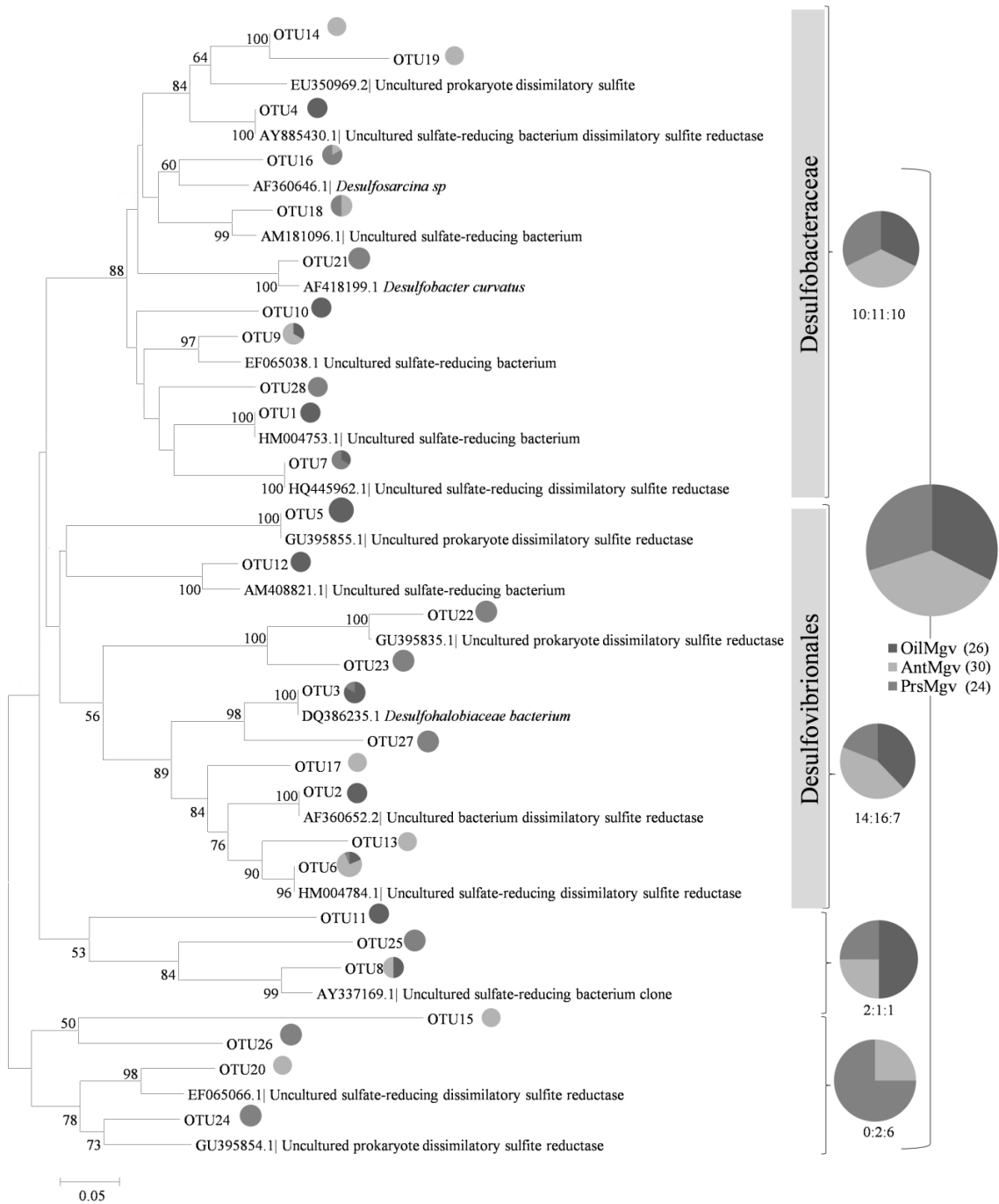


Figura 2.4 - Árvore filogenética da comunidade de SRB baseada na biblioteca de clones do gene *dsrB*, desde três diferentes manguezais. O diagrama de pie e os números abaixo do diagrama mostram o número de seqüências alocadas por manguezal (OilMgv, AntMgv and PrsMgv), em cada um dos 28 OTUs. Os valores nos nodos indicam a porcentagem dos valores de bootstrap maiores que 50% (total 1.000 repetições)

2.4 Discussão

Vários estudos em manguezais têm demonstrado que este ambiente alberga uma comunidade microbiana diversa e variável (ANDREOTE et al., 2012; DIAS et al., 2011; FASANELLA et al., 2012; GHOSH et al., 2010; LIANG et al., 2006; LYIMO; POL; OP DEN CAMP, 2002; GOMES et al., 2008; MENDES et al., 2012), cuja presença é muito importante para manter a estabilidade deste ecossistema. No entanto, o papel das SOB e SRB nos manguezais não tem sido totalmente explorado, uma vez que, nesses ambientes, as condições ambientais influenciam altamente a ocorrência e a atividade desses organismos.

Os manguezais são conhecidos por conterem altos níveis de matéria orgânica, sulfatos e condições anóxicas frequentes, fazendo que as transformações do enxofre sejam uma das mais ativas nestes ecossistemas (LYIMO; POL; OP DEN CAMP, 2002; MEYER; KUEVER, 2007a). A hipótese deste trabalho foi a de que as mudanças nestas comunidades microbianas podem ser relacionadas às alterações na contaminação dos manguezais e à consequente degradação dos poluentes, os quais podem ser oxidados durante os processos de redução de sulfato (SUAREZ-SUAREZ et al., 2011). Com base nesta hipótese, manguezais com distintas intervenções podem mostrar distintos grupos envolvidos com a ciclagem de enxofre e podem abrigar uma capacidade distinta de direcionar a degradação dos poluentes, sugerindo o uso dessas comunidades como indicadores da contaminação. Neste trabalho, é mostrada a diversidade dos organismos que respondem a tais transformações e foi descrita a alteração destes agrupamentos devido às variações nas condições nos manguezais, com base nas mudanças observadas na estrutura dos genes *aprA* e *dsrB*. Embora as mudanças nos números e nos perfis discutidos a seguir estejam fortemente relacionadas à presença de petróleo, tal efeito é mais explicitamente revelado no gradiente encontrado no OilMgv, em que a quantidade de petróleo decresce desde o ponto 3 para o ponto 1.

Em todas as amostras de manguezais, constatou-se que a abundância do gene *aprA* foi maior que a abundância do gene *dsrB*. A proporção maior deste primeiro gene pode ser explicada pelo duplo papel do gene *aprA* nas duas comunidades de SOB e SRB (BELILA; SNOUSSI; HASSAN, 2012; GEETS et al., 2006). O valor médio de cópias por grama de sedimento dos genes *aprA* e *dsrB* (log de 5,3 e 5,0, respectivamente) foi mais baixo que os que têm sido reportados em outros sedimentos. Blazejak e Schippers (2011) encontraram valores de 10^8 para *aprA* e Foti et al. (2007), Quillet et al. (2012) e Andrade et al. (2012) observaram quantidades de 10^6 , $6,6 \times 10^9$ e $4,6 \times 10^8$, para o gene *dsrB*. Tais diferenças podem ocorrer devido à variação da profundidade do sedimento amostrado junto com a

disponibilidade da matéria orgânica e a concentração de sulfato (ANDRADE et al., 2012; QUILLET et al., 2012).

Com relação à razão entre estes genes, os valores de SRB variaram em cada manguezal, com um incremento na comunidade de SRB nas áreas contaminadas com petróleo. Resultados similares foram obtidos em observações prévias, em que as SRB aumentaram sua abundância quando poluentes foram adicionados aos sedimentos (LYIMO; POL; OP DEN CAMP, 2002; MIRALLES et al., 2007; TAKETANI et al., 2010b). Esta resposta pode estar relacionada ao efeito do óleo na vegetação dos manguezais, por exemplo, limitando o crescimento das plantas e, com isso, removendo as raízes, que são fonte de oxigênio nos sedimentos de manguezais (CLARK et al., 1998), tornando, assim, as condições mais propícias para a redução do sulfato.

Com relação à diversidade da comunidade microbiana medida por PCR-DGGE usando os genes *aprA* e *dsrB*, foram observadas diferenças entre as estruturas das comunidades devido à separação das amostras, indicando a ocorrência de mudanças na comunidade microbiana, induzidas pelas características de cada manguezal. Além disso, foi possível verificar a diferenciação das duas comunidades ao longo do gradiente de contaminação (pontos dentro de OilMgv). A diferença das comunidades microbianas do ciclo do enxofre foi descrita por Perez-Jimenez e Kerkhof (2005), que indicaram que os agrupamentos respondem ao estresse exercido pelos poluentes de petróleo e outros poluentes orgânicos (PEREZ-JIMENEZ; KERKHOF, 2005; TAKETANI et al., 2010a; ZHANG et al., 2008). Especificamente, é conhecido que o enxofre suporta o metabolismo de organismos que podem se desenvolver em ambientes contaminados com petróleo e seus constituintes (KLEIKEMPER et al., 2002) ou com outros contaminantes (por exemplo, Cu, Pb e Zn) (KLEIKEMPER et al., 2002; ZHANG et al., 2008).

As sequências geradas neste estudo descrevem os grupos de maior ocorrência nas áreas analisadas. Assim, as abordagens taxonômicas independentes de cultivo revelaram altos valores de cobertura (64-83% para *aprA* e 67-85% para *dsrB*), além de permitir a inferência sobre a riqueza e a diversidade de cada área. Neste ponto, uma tendência da maior riqueza dos genes *aprA* foi observada nas áreas contaminadas (OilMgv e AntMgv), a qual pode ser derivada da localização dos manguezais (ambos na mesma cidade) ou pelos efeitos da contaminação sobre a comunidade dominante, conduzindo a um decréscimo no número de grupos abundantes e tornando, assim, o sistema mais apto a detectar um maior número de grupos, porém, todos com enorme abundância em tais áreas. Os valores de diversidade para este gene corroboraram esta conclusão, indicando a presença de baixo número de grupos com

alta abundância (resultando em baixa diversidade) em áreas de pristino, enquanto mais grupos são encontrados em outras áreas, criando uma maior abundância (maior diversidade). Para o gene *dsrB*, os dados são similares entre as áreas, limitando tais inferências.

A árvore filogenética do gene *aprA* mostrou que as comunidades de SOB mais frequentes são Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria, e, para SRB, a comunidade mais frequente foi Deltaproteobacteria, similar ao reportado em trabalhos prévios (ANDREOTE et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2011; PEIXOTO et al., 2011). Em adição, Betaproteobacteria foi um grupo frequente em amostras de AntMgv e OilMgv, o que corrobora os dados da literatura, uma vez que a presença deste grupo é relacionada com a contaminação nos manguezais. Gomes et al. (2008) encontraram, na Baía da Guanabara (Brasil), em manguezais contaminados devido à proximidade com a cidade, um incremento na complexidade das comunidades de Actinobacteria e Betaproteobacteria. Peixoto et al. (2011) descreveram o incremento nos níveis de petróleo como um controlador das alterações na comunidade de Betaproteobacteria nos sedimentos de manguezal. Gammaproteobacteria e Deltaproteobacteria têm sido reportados por serem grupos estimulados pela poluição de petróleo (TAKETANI et al., 2009, 2010a). Em uma abordagem metagenômica, o grupo mais prevalente de bactéria foi Deltaproteobacteria, o qual esteve presente em todas as amostras analisadas e apresentou os genes envolvidos no metabolismo de carbono, nitrogênio e enxofre (ANDREOTE et al., 2012).

Para a comunidade de SRB, a classe Deltaproteobacteria foi encontrada como o grupo mais abundante. Uma análise mais detalhada de tais afiliações revelou a ocorrência de duas ordens conhecidas, Desulfobacterales e Desulfovibrionales. Desulfobacterales é composta exclusivamente por bactérias redutoras de sulfato, congruente com os resultados de DOS SANTOS et al. (2011), que têm descrito este grupo como abundante em sedimentos de manguezal (ANDREOTE et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2011; LYIMO et al., 2009; TAKETANI et al., 2010b). Desulfobacterales é um grupo frequente em ambientes poluídos (ZHANG et al., 2008) e está associado com os processos de degradação de hidrocarbonetos (TAKETANI et al., 2010a). Os Desulfovibrionales encontrados neste estudo também têm sido reportados como fortemente adaptados às condições ambientais de estresse, tal como as de contaminação antropogênica, contaminação por metais pesados (CABRERA et al., 2006; QUILLET et al., 2012) e contaminação por petróleo (MIRALLES et al., 2007; VOORDOUW et al., 1996). A presença de tais organismos e as mudanças observadas nas suas comunidades são indicativos dos efeitos do petróleo sobre o funcionamento do manguezal, os quais podem

exercer pressão de seleção sobre a comunidade de SRB, suportando as inferências feitas anteriormente nas análises de quantificação e de *fingerprinting*.

Em resumo, neste trabalho, foi reportado, pela primeira vez, o uso conjunto de genes funcionais para estudar as comunidades de SOB e SRB em manguezais brasileiros com diferentes tipos de intervenção. Os resultados mostraram que o uso desses dois diferentes genes (*aprA* e *dsrB*) é complementar na caracterização da comunidade microbiana. Do mesmo modo, foi encontrado que a abundância, a estrutura e a diversidade de SOB e SRB mudam entre os manguezais, em resposta ao tipo de contaminação, relacionando a atividade de tais grupos com a recuperação das áreas contaminadas. SOB e SRB podem ser exploradas com mais detalhes, com a finalidade de acessar a diferenciação destes organismos, tornando-os importantes alvos durante os processos de remediação dos manguezais.

2.5 Conclusões

Neste capítulo foram estudadas a abundância, a composição e a diversidade das comunidades de SOB e SRB, utilizando-se os genes funcionais *aprA* e *dsrB*, em três manguezais com diferentes estados de intervenção, no estado de São Paulo. Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- a abundância acessada pelo gene *aprA* foi maior do que a abundância obtida com o gene *dsrB*. Os valores absolutos de abundância de cada gene foram similares nos três manguezais, independente do tipo de intervenção;
- a razão entre os genes *aprA* e *dsrB* foi calculada, sendo possível observar uma diferença na abundância do manguezal contaminado com petróleo (OilMgv), o qual apresentou maior abundância proporcional de *dsrB*, de acordo com o nível de contaminação;
- a estrutura das comunidades acessadas pelos genes *aprA* e *dsrB* mostrou uma clara distinção, relacionada com o tipo de intervenção do manguezal. Adicionalmente, no manguezal contaminado com petróleo (OilMgv), foi observada uma subdivisão equivalente com o nível de contaminação;
- a filogenia mostrou que o gene *aprA* permitiu acessar grupos de SOB e SRB, sendo as comunidades de SOB mais frequentes Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria, e de SRB, a Deltaproteobacteria;

- a filogenia do gene *dsrB* mostrou que o grupo mais abundante de SRB foi a classe Deltaproteobacteria, junto com as ordens Desulfobacterales e Desulfovibrionales.

Referências

- ANDRADE, L.L.; LEITE, D.; FERREIRA, E.; FERREIRA, L.; PAULA, G.R.; MAGUIRE, M.; HUBERT, C.; PEIXOTO, R.; DOMINGUES, R.; ROSADO, A. Microbial diversity and anaerobic hydrocarbon degradation potential in an oil-contaminated mangrove sediment. **BMC Microbiology**, London, v. 12, n. 1, p. 186, 2012.
- ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 3, p. 417-432, 2009.
- ANDREOTE, F.D.; JIMENEZ, D.J.; CHAVES, D.; DIAS, A.C.F.; LUVIZOTTO, D.M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELLA, C.C.; LOPEZ, M.V.; BAENA, S.; TAKETANI, R.G.; DE MELO, I.S. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 6, p. 1-14, 2012.
- ATTRI, K.; KERKAR, S.; LOKABHARATHI, P.A. Ambient iron concentration regulates the sulfate reducing activity in the mangrove swamps of Diwar, Goa, India. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, London, v. 95, n. 1, p. 156-164, 2011.
- BELILA, A.; ABBAS, B.; FAZAA, I.; SAIDI, N.; SNOUSSI, M.; HASSEN, A.; MUYZER, G. Sulfur bacteria in wastewater stabilization ponds periodically affected by the 'red-water' phenomenon. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, n. 1, p. 379-394, 2013.
- BELILA, A.; SNOUSSI, M.; HASSAN, A. Rapid qualitative characterization of bacterial community in eutrophicated wastewater stabilization plant by T-RFLP method based on 16S rRNA genes. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v. 28, n. 1, p. 135-143, 2012.
- BIDERRE-PETIT, C.; BOUCHER, D.; KUEVER, J.; ALBERIC, P.; JEZEQUEL, D.; CHEBANCE, B.; BORREL, G.; FONTY, G.; PEYRET, P. Identification of sulfur-cycle prokaryotes in a low-sulfate lake (Lake Pavin) using *aprA* and 16S rRNA gene markers. **Microbial Ecology**, New York, v. 61, n. 2, p. 313-327, 2011.
- BLAZEJAK, A.; SCHIPPERS, A. Real-time PCR quantification and diversity analysis of the functional genes *aprA* and *dsrA* of sulfate-reducing prokaryotes in marine sediments of the Peru Continental Margin and the Black Sea. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 2, p. 253, 2011.
- CABRERA, G.; PEREZ, R.; GOMEZ, J.M.; ABALOS, A.; CANTERO, D. Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio sp.* strains. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 135, n. 1/3, p. 40-46, 2006.
- CHAO, A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, Stockholm, v. 11, p. 265-270, 1984.

CHAO, A.; LEE, S.-M. Estimating the number of classes via sample coverage. **American Statistical Association**, New York, v. 87, p. 210-217, 1992.

CHOU, H.H.; HOLMES, M.H. DNA sequence quality trimming and vector removal. **Bioinformatics**, Oxford, v. 17, n. 12, p. 1093-1104, 2001.

CLARK, M.W.; MCCONCHIE, D.; LEWIS, D.W.; SAENGER, P. Redox stratification and heavy metal partitioning in Avicennia-dominated mangrove sediments: a geochemical model. **Chemical Geology**, Amsterdam, v. 149, n. 3/4, p. 147-171, 1998.

DIAS, A.C.F.; DINI-ANDREOTE, F.; TAKETANI, R.G.; TSAI, S.M.; AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S.; ANDREOTE, F.D. Archaeal communities in the sediments of three contrasting mangroves. **Journal of Soils and Sediments**, Landsberg, v. 11, n. 8, p. 1466-1476, 2011.

DOS SANTOS, H.F.; CURY, J.C.; DO CARMO, F.L.; DOS SANTOS, A.L.; TIEDJE, J.; VAN ELSAS, J.D.; ROSADO, A.S.; PEIXOTO, R.S. Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 3, p. 1-8, 2011.

DUKE, N.C.; MEYNECKE, J.O.; DITTMANN, S.; ELLISON, A.M.; ANGER, K.; BERGER, U.; CANNICCI, S.; DIELE, K.; EWEL, K.C.; FIELD, C.D.; KOEDAM, N.; LEE, S.Y.; MARCHAND, C.; NORDHAUS, I.; DAHDOUTH-GUEBAS, F. A world without mangroves? **Science**, Washington, v. 317, n. 5834, p. 41-42, 2007.

FAN, L.F.; TANG, S.L.; CHEN, C.P.; HSIEH, H.L. Diversity and composition of sulfate- and sulfite-reducing prokaryotes as affected by marine-freshwater gradient and sulfate availability. **Microbial Ecology**, New York, v. 63, n. 1, p. 224-237, 2012.

FASANELLA, C.C.; DIAS, A.C.F.; RIGONATO, J.; FÁTIMA FIORE, M.; SOARES, F.L.; MELO, I.S.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ELSAS, J.D.; ANDREOTE, F.D. The selection exerted by oil contamination on mangrove fungal communities. **Water, Air, & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 223, n. 7, p. 4233-4243, 2012.

FOTI, M.; SOROKIN, D.Y.; LOMANS, B.; MUSSMAN, M.; ZACHAROVA, E.E.; PIMENOV, N.V.; KUENEN, J.G.; MUYZER, G. Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 7, p. 2093-2100, 2007.

FRANK, K.L.; ROGERS, D.R.; OLINS, H.C.; VIDOUDEZ, C.; GIRGUIS, P.R. Characterizing the distribution and rates of microbial sulfate reduction at Middle Valley hydrothermal vents. **ISME Journal**, London, v. 7, n. 7, p. 1-11, 2013.

GEETS, J.; BORREMANS, B.; DIELS, L.; SPRINGAEL, D.; VANGRONSVELD, J.; VAN DER LELIE, D.; VANBROEKHOVEN, K. DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 194-205, 2006.

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

GHOSH, W.; DAM, B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 33, n. 6, p. 999-1043, 2009.

GOMES, M.N.C.; BORGES, L.R.; PARANHOS, R.; PINTO, F.N.; MENDONCA-HAGLER, L.C.; SMALLA, K. Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forests. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 96-109, 2008.

GREEN-SAXENA, A.; FEYZULLAYEV, A.; HUBERT, C.R.; KALLMEYER, J.; KRUEGER, M.; SAUER, P.; SCHULZ, H.M.; ORPHAN, V.J. Active sulfur cycling by diverse mesophilic and thermophilic microorganisms in terrestrial mud volcanoes of Azerbaijan. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 14, n. 12, p. 3271-3286, 2012.

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

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, n. 4, p. 265-278, 2001.

JØRGENSEN, B.B. The sulfur cycle of a coastal marine sediment (Limfjorden, Denmark). **Limnology and Oceanography**, Texas, v. 22, p. 814-834, 1982.

KLEIKEMPER, J.; SCHROTH, M.H.; SIGLER, W.V.; SCHMUCKI, M.; BERNASCONI, S.M.; ZEYER, J. Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 4, p. 1516-1523, 2002.

LIANG, J.-B.; CHEN, Y.-Q.; LAN, C.-Y.; TAM, N. F. Y.; ZAN, Q.-J.; HUANG, L.-N. Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment. **Marine Biology**, Leibniz, v. 150, n. 5, p. 739-747, 2006.

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

LYIMO, T.J.; POL, A.; HARHANGI, H.R.; JETTEN, M.S.; OP DEN CAMP, H.J. Anaerobic oxidation of dimethylsulfide and methanethiol in mangrove sediments is dominated by sulfate-reducing bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 70, n. 3, p. 483-492, 2009.

MENDES, L.W.; TAKETANI, R.G.; NAVARRETE, A.A.; TSAI, S.M. Shifts in phylogenetic diversity of archaeal communities in mangrove sediments at different sites and depths in southeastern Brazil. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 163, n. 5, p. 366-377, 2012.

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

_____. Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes--origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. **Microbiology**, London, v. 153, n. 7, p. 2026-2044, 2007b.

MIRALLES, G.; GROSSI, V.; ACQUAVIVA, M.; DURAN, R.; CLAUDE BERTRAND, J.; CUNY, P. Alkane biodegradation and dynamics of phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria in an anoxic coastal marine sediment artificially contaminated with oil. **Chemosphere**, Oxford, n. 7, p. 1327-1334, 2007.

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

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

PEREZ-JIMENEZ, J.R.; KERKHOF, L.J. Phylogeography of sulfate-reducing bacteria among disturbed sediments, disclosed by analysis of the dissimilatory sulfite reductase genes (*dsrAB*). **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 2, p. 1004-1011, 2005.

PRADA-GAMERO, R.M.; VIDAL-TORRADO, P.; FERREIRA, T.O. Mineralogia e físico-química dos solos de mangue do Rio Iriri no canal de Bertioga (Santos, SP). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 28, p. 233-243, 2004.

QUILLET, L.; BESAURY, L.; POPOVA, M.; PAISSE, S.; DELOFFRE, J.; OUDDANE, B. Abundance, diversity and activity of sulfate-reducing prokaryotes in heavy metal-contaminated sediment from a salt marsh in the Medway Estuary (UK). **Mar Biotechnology**, New York, v. 14, n. 3, p. 363-381, 2012.

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

RIGONATO, J.; KENT, A.D.; ALVARENGA, D.O.; ANDREOTE, F.D.; BEIRIGO, R.M.; VIDAL-TORRADO, P.; FIORE, M.F. Drivers of cyanobacterial diversity and community composition in mangrove soils in south-east Brazil. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 1103-1114, 2013.

SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.B.; LESNIEWSKI, R.A.; OAKLEY, B.B.; PARKS, D.H.; ROBINSON, C.J.; SAHL, J.W.; STRES, B.; THALLINGER, G.G.; VAN HORN, D.J.; WEBER, C.F.

Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

SUAREZ-SUAREZ, A.; LOPEZ-LOPEZ, A.; TOVAR-SANCHEZ, A.; YARZA, P.; ORFILA, A.; TERRADOS, J.; ARNDS, J.; MARQUES, S.; NIEMANN, H.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; AMANN, R.; ROSSELLO-MORA, R. Response of sulfate-reducing bacteria to an artificial oil-spill in a coastal marine sediment. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 13, n. 6, p. 1488-1499, 2011.

TAKETANI, R.G.; DOS SANTOS, H.F.; VAN ELSAS, J.D.; ROSADO, A.S. Characterisation of the effect of a simulated hydrocarbon spill on diazotrophs in mangrove sediment mesocosm. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Washington, 96, n. 3, p. 343-354, 2009.

TAKETANI, R.G.; FRANCO, N.O.; ROSADO, A.S.; VAN ELSAS, J.D. Microbial community response to a simulated hydrocarbon spill in mangrove sediments. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 48, n. 1, p. 7-15, 2010a.

TAKETANI, R.G.; YOSHIURA, C.A.; DIAS, A.C.; 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, 2010b.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

VOORDOUW, G.; ARMSTRONG, S.M.; REIMER, M.F.; FOUTS, B.; TELANG, A.J.; SHEN, Y.; GEVERTZ, D. Characterization of 16S rRNA genes from oil field microbial communities indicates the presence of a variety of sulfate-reducing, fermentative, and sulfide-oxidizing bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 5, p. 1623-1629, 1996.

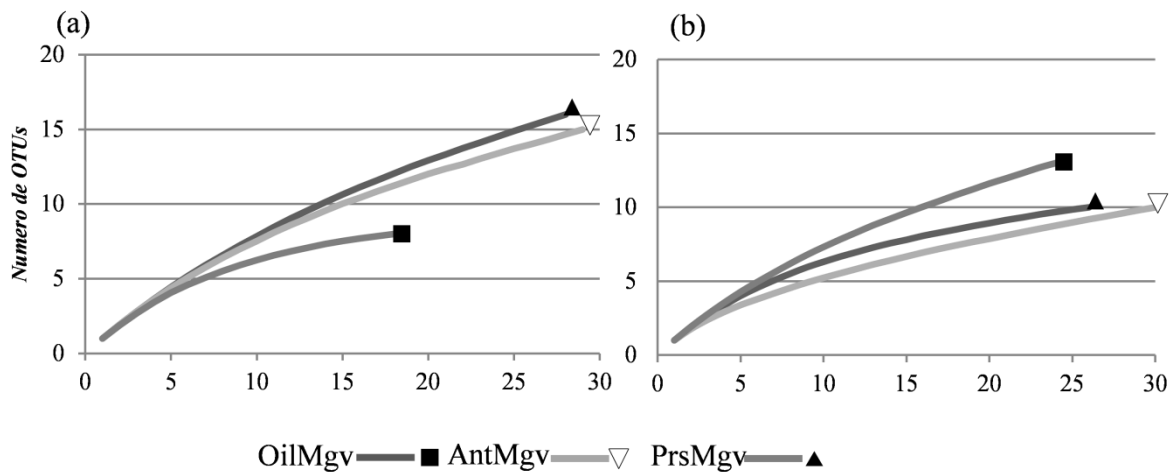
WAGNER, M.; ROGER, A.J.; FLAX, J.L.; BRUSSEAU, G.A.; STAHL, D.A. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, n. 11, p. 2975-2982, 1998.

ZHANG, W.; SONG, L.S.; KI, J.S.; LAU, C.K.; LI, X.D.; QIAN, P.Y. Microbial diversity in polluted harbor sediments II: Sulfate-reducing bacterial community assessment using terminal restriction fragment length polymorphism and clone library of *dsrAB* gene. **Estuarine Coastal and Shelf Science**, London, v. 76, n. 3, p. 682-691, 2008.

Anexo

Tabela S 2.1 - Número de bandas do DGGE obtido desde biblioteca de clones para os genes *aprA* e *dsrB*, em três manguezais com diferentes tipos de intervenção

Mangrove	<i>aprA</i>			<i>dsrB</i>		
	OilMgv	AntMgv	PrsMgv	OilMgv	AntMgv	PrsMgv
Ponto 1	27 ± 0,6	29 ± 0,0	36 ± 0,5	36 ± 0,5	31 ± 0,5	38 ± 2,0
Ponto 2	28 ± 0,3	29 ± 0,6	37 ± 0,8	24 ± 0,3	34 ± 0,3	34 ± 1,4
Ponto 3	20 ± 1,2	26 ± 1,1	41 ± 0,3	35 ± 0,3	34 ± 0,5	34 ± 0,3

Figura S 2.2 - Curvas de rarefação para as bibliotecas de *aprA* e *dsrB* desde três manguezais com diferentes tipos de intervenção. Os clones foram agrupados baseados na distancia de similaridade de 80%

3 ESTRUTURA E DIVERSIDADE DE ARQUÉIAS E BACTÉRIAS, COM ENFOQUE EM BACTÉRIAS REDUTORAS DO SULFATO, EM MANGUEZAIS

Resumo

Apesar de os manguezais serem essenciais para a existência de muitas espécies, eles são constantemente impactados por diversos poluentes que influenciam sua estabilidade. Este ambiente é caracterizado como uma região anóxica rica em matéria orgânica, em que o sulfato atua como importante aceptor de elétrons. Este ambiente hospeda uma comunidade microbiana diversa e produtiva, a qual está diretamente relacionada com a ciclagem de nutrientes e com a degradação dos contaminantes. No intuito de conhecer esta comunidade e o efeito dos contaminantes sobre sua estrutura, foram avaliadas a abundância por qPCR, a diversidade por pirosequenciamento junto com modelos de co-ocorrência por análises de correlação, de arqueias, bactérias, e bactérias redutoras de sulfato (*sulphate-reducing bacteria*- SRB), além da análise funcional do ciclo do enxofre por meio da técnica de GeoChip. Tais análises foram realizadas em quatro áreas de manguezais, com diferentes estados de intervenção, dois deles contaminados com baixo (BrMg01) e alto (BrMg02) teor de petróleo, um com poluentes antropogênicos (BrMg03) e outro sem contaminação (BrMg04). Maior abundância de bactérias (log 10,4), arqueias (log 8,68) e SRB (log 5,27) foi encontrada na área BrMg02. O pirosequenciamento revelou que no domínio Archaea, Euryarcheota (34%-62%) e Crenarcheota (39%-66%) foram os filos mais abundantes, sem diferença significativa entre os manguezais. No domínio Bacteria, os filos mais abundantes foram Proteobacteria (46%-59%), Bacteroidetes (12%-29%) e Acidobacteria (3%-11%). Dentro do filo Proteobacteria, as classes dominantes foram Deltaproteobacteria (48,2%-65,6%) e Gammaproteobacteria (19,4%-27,3%). As análises de co-ocorrência mostraram que a contaminação simplifica a estrutura das comunidades pelo decréscimo das interações e das correlações negativas entre os grupos microbianos, possivelmente indicando a habilidade destes grupos em usar estes contaminantes como fonte de energia, o que permite sua sobrevivência nos ambientes mais poluídos. O pirosequenciamento do gene funcional *dsrB* confirmou a dominância da classe Deltaproteobacteria, a ordem Desulfobacterales e a família Desulfobacteracea, como o grupo dominante de SRB nestes nichos. O ciclo do enxofre acessado pelo GeoChip mostrou a abundância e a diversidade dos grupos envolvidos com a redução e a oxidação deste elemento, e indicou a maior frequência de tais grupos no ambiente com alta contaminação de petróleo. Assim, os resultados obtidos neste estudo mostraram que a densidade, a composição e as interações das comunidades microbianas respondem aos estados de intervenção nos manguezais, tanto acessados pela base taxonômica (genes ribossomais) como funcional (*dsrB* e GeoChip).

Palavras-chave: Análises de co-ocorrência; *dsrB*; GeoChip; Pirosequenciamento

Abstract

Although the mangrove ecosystems are essential for the existence of many species, they are continuously impacted by many pollutants that affect its stability. This environment is characterized as an anoxic region rich in organic matter, where sulfate acts as an important electron acceptor. It hosts a diverse and productive microbial community, which is directly related to nutrient cycling and degradation of organic matter and contaminants. In order to explore this community and the effect of contaminants on the structure, we evaluated the abundance by qPCR, the diversity by pyrosequencing and the networks by correlation analyses of Archaea, Bacteria, and Sulfate-reducing bacteria (SRB), communities and the

functional analyses of sulfur cycle by GeoChip. such attempts were applied to four mangroves under different stages of intervention [low content of oil contamination (BrMg01), 2 high content of oil contamination (BrMg02), 3 anthropogenic pollutants (BrMg03), 4 pristine (BrMg04)]. Higher abundances of Bacteria (log 10.4), Archaea (log 8.68) and SRB (log 5.27) were presented in BrMg02. Pyrosequencing revealed that in the domain Archaea, Euryarcheota (34-62%) and Crenarcheota (39-66%) were the most abundant phyla with no significant difference among the mangroves. In the Bacteria domain, the most abundant phyla were Proteobacteria (46-59%), Bacteroidetes (12-29%) and Acidobacterias (3-11%). Among the Proteobacteria, the dominance was observed for classes Deltaproteobacteria (48.2-65.6%) and Gammaproteobacteria (19.4-27.3%). Network analyses showed that contamination simplifies the community structure by decreasing the interactions and negative correlations among microbial groups, possibly indicating the ability to use the contaminants as source of energy as the main characteristic to survive in the oil-polluted environment. Pyrosequencing of functional gene *dsrB* confirmed the dominance of Deltaproteobacteria class, Desulfobacterales order and Desulfobacteraceae family as the most frequent group of SRB in this niche. The sulfur cycle accessed by GeoChip showed that the abundance and diversity of the groups involved in the reduction and oxidation of this element were larger and distinct in the mangrove with high oil contamination. Thus, the results of this study showed that the composition and interactions of microbial communities respond to the state of intervention of the mangroves, either based on taxonomical (ribosomal genes) or function-related genes (*dsrB* and GeoChip).

Keywords: Network; *dsrB*; GeoChip; Pyrosequencing

3.1 Introdução

Os manguezais são ecossistemas amplamente distribuídos, com aproximadamente 137,760 km², presentes em 118 países, dos quais o Brasil ocupa o terceiro lugar, com 962,683 hectares, equivalente a 7% da porcentagem global (GIRI et al., 2011). No país encontram-se ao longo do litoral, estendendo-se desde o extremo norte, no estado do Amapá, ao sul, no estado de Santa Catarina (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 1990).

Caracterizam-se por ter uma vegetação que varia com a sua distribuição geográfica e com as condições físicas e químicas dos solos (CRUZ et al., 2013; GIRI et al., 2011), os quais têm, predominantemente, frações de argila e silte, elevadas quantidades de matéria orgânica, de sais solúveis (PRADA-GAMERO; VIDAL-TORRADO; FERREIRA, 2004) e potencial redox variável (CLARK et al., 1998).

Estes ecossistemas são altamente produtivos e estão constituídos por diversos grupos de organismos (arqueias, bactérias, fungos, microalgas, pássaros e mamíferos), que têm a função de fazer a reciclagem e a conservação dos nutrientes presentes nestas áreas (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). Dentro destes grupos encontram-se as comunidades microbianas, que são abundantes e diversas, com representante dos três domínios - Bacteria, Archaea e Eukarya (ANDREOTE et al., 2012; FASANELLA et al.,

2012), os quais estão envolvidos em diversos processos, como a renovação da matéria orgânica (JØRGENSEN, 1982), a biodegradação dos poluentes (PEREZ-JIMENEZ; KERKHOF, 2005) e a ciclagem do nitrogênio, do enxofre e do carbono (RABUS; HANSEN; WIDDEL, 2006), sendo, assim, de grande importância nos ciclos biogeoquímicos nesses ecossistemas (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001).

Alguns estudos em manguezais têm mostrado que, no domínio Archaea, os filos Euryarcheota e Crenarcheota são predominantes (DIAS et al., 2011; MENDES et al., 2012; PIRES et al., 2012) e, no domínio Bacteria, predomina o filo Proteobacteria, com destaque para as classes Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria, é o mais frequente (ANDREOTE et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2011). Estes grupos de bactérias participam da redução do sulfato (*sulphate-reducing* - SRB) e oxidação do enxofre (*sulphur-oxidising* - SOB) e sua alta abundância indica a prevalência das comunidades envolvidas com o ciclo do enxofre nas áreas de manguezais (ANDREOTE et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2011).

As comunidades microbianas têm sido acessadas utilizando-se diferentes métodos independentes de cultivo, como DGGE (DIAS et al., 2011), T-RFLP (MENDES et al., 2012) e biblioteca de clones (DIAS et al., 2010), gerando uma valiosa informação sobre os grupos microbianos presentes nestas áreas. No entanto, com o advento das novas técnicas, incluindo o pirosequenciamento e o GeoChip, se abrem novas possibilidades para explorar, com mais acurácia, rapidez e detalhe, tais comunidades (DESANTIS et al., 2007; HE et al., 2010).

O pirosequenciamento gera uma maior cobertura das comunidades e dá maior profundidade de análise aos dados, gerando milhares de sequências que permitem a detecção de espécies raras que, possivelmente, não são acessadas com os outros métodos, como os baseados em sequenciamento pela metodologia de Sanger (DESANTIS et al., 2007). O GeoChip é vantajoso por detectar funções metabólicas específicas, com características quantitativas e de alta resolução, que permitem obter informações relacionadas aos grupos envolvidos nos ciclos biogeoquímicos, nas relações ecológicas, dentre outros (HE et al., 2010). Além disso, com os dados obtidos do pirosequenciamento e do GeoChip, podem-se gerar modelos de co-ocorrência (BARBERAN et al., 2012; ZHOU et al., 2010), os quais podem mostrar, de outra forma, a estrutura das comunidades, destacando a relação entre seus membros e medindo as interações positivas e negativas que ocorrem dentre os diferentes grupos microbianos (PROSSER et al., 2007).

Estes modelos de co-ocorrência (*networks*) são ferramentas muito utilizadas na macroecologia e têm a finalidade de auxiliar no entendimento do ecossistema, medindo o quanto da conformação das comunidades alvo se dá pela interação entre seus componentes

bióticos e quanto se explica pela relação dos organismos vivos com as condições ambientais (ZHOU et al., 2010). Esta visão é de grande utilidade, já que pode ajudar a prever a resposta das comunidades aos efeitos das perturbações do ambiente, o que, a longo prazo, poderia ajudar no uso das comunidades microbianas em estratégias de recuperação ambiental (FAUST; RAES, 2012).

Embora essas ferramentas forneçam uma grande quantidade de informação, elas também estão sujeitas a erros (bias), os quais são inerentes à preparação das amostras, à amplificação da PCR e ao sequenciamento (ACINAS et al., 2005; KANAGAWA, 2003). Assim, a descrição das comunidades bacterianas, usando estas diferentes aproximações, pode resultar em perfis que se complementam, mesmo que não sejam completamente consistentes entre si, podendo fornecer uma visão mais geral e complementar da estrutura das comunidades microbianas (BOHORQUEZ et al., 2012).

Estudos das comunidades microbianas dos manguezais por pirosequenciamento têm permitido confirmar que os microrganismos são abundantes e diversos nesses ecossistemas (DOS SANTOS et al., 2011; PIRES et al., 2012). As áreas de manguezais objeto do presente estudo têm sido alvo de diferentes caracterizações microbiológicas, as quais têm permitido observar que as comunidades de arqueias (DIAS et al., 2011), bactérias (ANDREOTE et al., 2012) e fungos (FASANELLA et al., 2012), além de organismos que hospedam genes relacionados com o ciclo do nitrogênio (DIAS et al., 2012), são responsivas aos diferentes tipos de intervenção presentes nesses ambientes. Estes trabalhos mostraram respostas das comunidades a estas mudanças, tornando interessante aprofundar o estudo desses grupos. Assim, no presente trabalho, foi determinada a abundância por qPCR, e a estrutura e a diversidade foram acessadas por pirosequenciamento das comunidades de arqueias e bactérias. Adicionalmente, com a finalidade de se obter uma abordagem holística, foram consideradas as características físicas e químicas dos diferentes ambientes e as interações entre os componentes das comunidades microbianas encontradas em tais ecossistemas. Ao final, foi feita uma abordagem funcional, avaliando-se os grupos relacionados com ciclo do enxofre, usando o pirosequenciamento do gene funcional *dsrB* e os genes relacionados à oxidação e à redução de tal elemento, utilizando-se dados oriundos da técnica de GeoChip.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Descrição dos locais de coleta

O presente projeto foi desenvolvido em quatro áreas de manguezais com diferentes estados de intervenção, localizados no estado de São Paulo, sendo três localizados no município de Bertioga e um em Cananéia (Ilha do Cardoso) (Figura 3.1).

A área de estudo situa-se entre as coordenadas $23^{\circ}53'49''$ e $23^{\circ}54'06''$ de Latitude Sul e $46^{\circ}12'28''$ e $45^{\circ}15'28''$ de Longitude Oeste, no manguezal de Bertioga e $25^{\circ}05'03'$ de Latitude Sul e $47^{\circ}57'754''$ de Longitude Oeste, para o manguezal de Cananéia (Figura 2). Em Bertioga, as amostras correspondentes aos dois primeiros manguezais (BrMg01 e BrMg02) estão na mesma área e ainda sofrem o impacto causado pelo derramamento de 35 milhões de litros de petróleo, ocorrido no ano de 1983. Estes manguezais encontram-se separados fisicamente por um pequeno córrego, causando um efeito menor (BrMg01) e outro maior (BrMg02), em decorrência da contaminação, sendo tal separação devido ao fato de o último estar mais próximo ao ponto de derramamento do petróleo (do continente para o mar) (Figura 3.1). Esta separação tem sido comprovada pelas características morfológicas (observações da vegetação e ocorrência de caranguejos), químicas e microbiológicas dos manguezais.

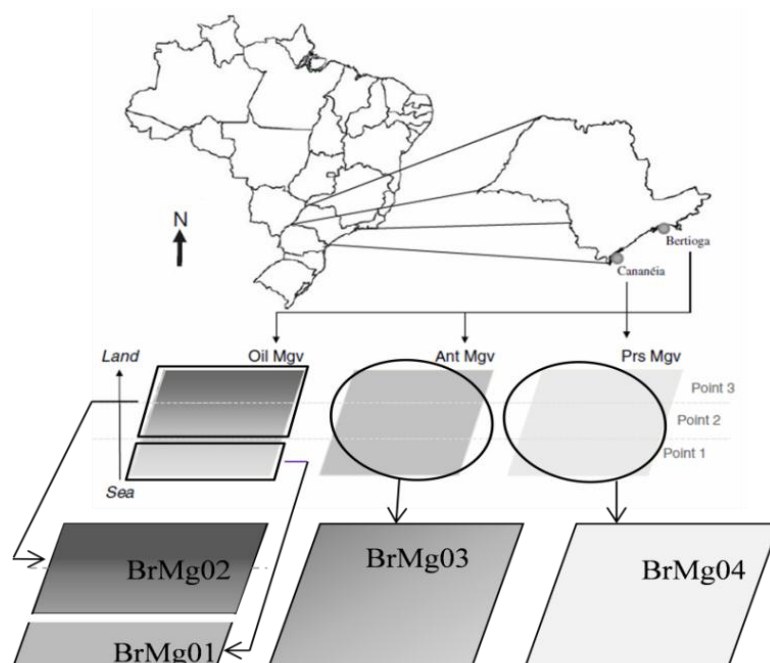


Figura 3.1 – Esquema da localização geográfica dos manguezais avaliados, situados em Bertioga, sendo BrMg01 e BrMg02 contaminados com baixo e alto teor de petróleo e BrMg03 com contaminação antropogênica, e um localizado em Cananéia, BrMg04, sendo o manguezal preservado. Modificado de Dias et al. (2011)

O terceiro manguezal encontra-se próximo da área urbana de Bertioga e sofre um leve efeito da contaminação antropogênica (BrMg03), enquanto o quarto manguezal (BrMg04) está localizado em Cananéia, uma área de manguezal preservada e sem nenhuma intervenção (natural). Estes últimos são bastante uniformes ao longo do transecto do continente para o mar.

As duas regiões de manguezais (Cananéia e Bertioga) apresentam, adicionalmente, uma diferença nas condições de inundação. Os manguezais de Bertioga são inundados por uma mistura entre as águas do mar e do rio Iriri. O manguezal de Cananéia apresenta inundações constantes apenas do mar.

Estas áreas fazem parte de um grupo de pesquisas em manguezais do estado de São Paulo e as suas propriedades físico-químicas e mineralógicas já foram bem caracterizadas (ANDREOTE et al., 2012; FERREIRA et al., 2007; PRADA-GAMERO; VIDAL-TORRADO; FERREIRA, 2004; RIGONATO et al., 2012); No entanto, para se ter uma melhor caracterização dessas áreas, foram feitas análises físicas e químicas dos elementos disponíveis nos sedimentos, do teor de sulfato e do potencial redox.

3.2.2 Amostragem

Em cada manguezal, foi determinado um transecto, com orientação do mar para o continente, delineando três sub-regiões que são claramente diferenciadas; uma primeira região próxima ao mar ou ao rio; a segunda região no centro do manguezal e a terceira, numa área próxima ao continente, chamada de restinga. Cada amostra foi constituída de uma quantidade de sedimento obtida por amostrador de tubo de PVC de 30 cm, com 7 cm de diâmetro, que foi introduzido no sedimento dos manguezais e retirado, contendo o material a ser analisado.

A composição das amostras foi realizada com duas repetições de cada ponto em cada manguezal. Assim, o sedimento do ponto 1 do primeiro manguezal de Bertioga corresponde a BrMg01 e os pontos 2 e 3 do mesmo manguezal correspondem a BrMg02. Para o segundo manguezal de Bertioga foram misturadas as duas repetições dos três pontos e obtida uma amostra composta denominada de BrMg03. O mesmo procedimento foi feito para o manguezal de Cananéia (BrMg04). Dessa maneira, foram obtidas oito amostras (4 áreas de manguezais x 2 repetições).

3.2.3 Análises físicas, químicas e quantificação de hidrocarbonetos nos sedimentos dos manguezais

Em cada manguezal foram misturados os pontos amostrais para se obter duas amostras compostas, as quais foram seladas e transportadas em uma caixa com gelo e mantidas a 4 °C até serem analisadas. A análise física (conteúdo de areia-silte-argila) e química dos elementos disponíveis foi realizada no Laboratório de Análises de Solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP, Piracicaba, Brasil), utilizando-se a metodologia descrita por Raij et al. (2001). A caracterização físico-química adicional pode ser encontrada em (DIAS et al., 2011).

Além dos dados físicos e químicos descritos anteriormente, foram determinados o potencial redox, o teor de sulfato e o teor de sulfeto nas amostras úmidas. O potencial redox foi medido *in situ*, após retirar-se o sedimento do amostrador e deixar equilibrar o eletrodo por, aproximadamente, 2 minutos. As medidas foram tomadas no centro de cada bloco da amostra, para evitar o contato com a atmosfera, utilizando-se um eletrodo de platina (combo meter pH/ORP-H198120). As leituras finais foram corrigidas por adição do potencial (+244mV) de um eletrodo de referência de calomelano (NOBREGA et al., 2013). O teor de sulfato foi determinado em amostras de 10 g de sedimento úmido, utilizando-se a metodologia descrita por Raij et al. (2001). O teor de sulfeto foi analisado no Laboratório de Ciência do Solo da Universidade Federal do Ceará (UFC), seguindo a metodologia descrita em Nobrega et al. (2013).

Foram realizadas análises de hidrocarbonetos (HPAs), no Laboratório de Oceanografia Química do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (USP), seguindo a metodologia descrita em Martins et al. (2004), dados que fazem parte da tese de doutorado em Ciências de Lima (2012).

3.2.4 Extração do DNA

Em cada uma das amostras, o DNA foi extraído utilizando o kit Power Soil DNA Isolation (MoBio, EUA), com uma quantidade inicial de 0,25g de sedimento. Após a extração, a integridade e a qualidade dos DNAs obtidos foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1% (w/v).

3.2.5 PCR em tempo real

A abundância do gene ribossomal 16S DNAr de arqueias e bactérias e do gene *dsrB* foi quantificada utilizando-se qPCR. A amplificação do gene das arqueias foi feita utilizando-se os *primers* 1000R (5'-GAG ARG WRG TGC ATG GCC-3') e 340F (5'-CCC TAY GGG GYG CAS CAG-3') (GANTNER et al., 2011) e os ciclos iniciaram-se com desnaturação de 98 °C, por 2 minutos, seguida de 35 ciclos a 95 °C, por 30 segundos; 57 °C, por 30 segundos e 72 °C, por 90 segundos.

Para o domínio *Bacteria*, foram utilizados os *primers* 341F(5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') e 534R (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (MEDLIN et al., 1988; MUYZER; WAAL; UITTERLINDEN, 1993), numa amplificação com uma desnaturação inicial a 95 °C, por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94 °C, por 30 segundos; 55 °C, por 30 segundos e 72 °C, por 30 segundos.

O gene *dsrB* foi quantificado utilizando-se os *primers* DSRp2060F (5'-CAACATCGTYCAYACCCAGGG-3') (GEETS et al., 2006) e DSR4R (5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3') (WAGNER et al., 1998) em uma reação com ciclos de 95 °C, por 45 segundos; 55 °C, por 1 minuto e 72 °C, por 1 minuto.

Em todas as reações, uma curva de desnaturação foi realizada no final, com temperatura variando entre 72 °C e 96 °C. Todas as reações de PCR em tempo real foram feitas em volume de 25 µL, contendo 12,5 µL do kit Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG kit (Invitrogen, Brasil) e 0,2 µM dos oligonucleotídeos.

As análises de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, no equipamento Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Austrália), com o sistema de detecção SYBR Green I. A aquisição dos dados foi feita por meio do software do mesmo equipamento (Rotor Gene Real Time Analysis 1.7.65 - Corbett), o qual calcula os valores de *cycle threshold* (Ct), a correlação logarítmica (R^2) entre o número de ciclos e a quantidade de DNA nas amostras, além da eficiência da reação (E).

Antes da determinação do número de cópias dos genes alvo, foram construídas curvas padrões, amplificando quantidades conhecidas dos genes alvo (10^2 até 10^9 cópias/µL). Este processo serviu como ponto inicial para o cálculo da quantificação do gene nas amostras. Assim, os dados da amplificação do DNA extraído das amostras ambientais (Ct) foram interpolados para determinar o número de cópias do gene de interesse na amostra avaliada.

Para avaliar se existiam diferenças significativas entre os pontos amostrados, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando-se o programa Sisvar, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.2.6 Pirosequenciamento

3.2.6.1 Pirosequenciamento do gene 16S DNAr de arqueias e bactérias

Para o pirosequenciamento do gene 16S DNAr de arqueias e bactérias foram realizadas reações de amplificação em duas repetições de cada uma das áreas estudadas.

A amplificação da região V3 em arqueias foi feita utilizando-se os *primers reverse* ArcR (5'- TTA CCG CGG CKG CTG-3') e *forward* ArcF (5'- CCC CTA CGC CCY GCA SCA G-3') (ØVREÅS et al., 1997). Em bactérias, foi feita a amplificação da região V4, utilizando-se uma mistura dos *primers* 520F (5'-AYT GGG YDT AAA GNG-3') e 820R (5'-TAC CRG GGT HTC TAA TCC-3', 5'-TAC CAG AGT ATC TAA TTC-3', 5'-CTA CDS RGG TMT CTA ATC-3', 5'-TAC NVG GGT ATC TAA TCC-3') (RDP's *Pyrosequencing Pipeline*: <http://pyro.cme.msu.edu/pyro/help.jsp>). Esta mistura de *primers* reversos teve o objetivo de amostrar o maior número de grupos bacterianos possível dentro da amostra a ser analisada, como descrito no Ribosomal Data Project. Nos dois *primers* foram adicionadas sequências adaptadoras, conforme o manual do fabricante do equipamento (Roche, EUA). Adicionalmente, nos *primers forward* foi adicionada uma tag de identidade (BARCODE/MID) composta de 6 a 8 bases, que serviu para identificar a origem de cada uma das sequências obtidas (Tabela S 3.1).

A PCR de arqueias foi feita em uma reação de 50 µL contendo 5 µL de tampão 10X (750 mM Tris-HCl pH 8,8, 200 mM (NH₄)₂SO₄ e 0,1% de Tween 20) 3 µL de 25 mM MgCl₂, 4 µL de dNTP 2,5 mM, 0,5 µL de 5 U µL⁻¹ de *Taq* DNA Platinum DNA polimerase recombinante (Invitrogen), 1 µL de cada iniciador (10 pmoles µL⁻¹) e 1 µL de DNA, sendo o volume restante completado com água deionizada estéril. As condições de amplificação foram 5 minutos a 95 °C; 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55,8 °C e 1 minuto a 72 °C, e extensão final por 10 minutos, a 72 °C.

A PCR de bactérias foi feita também para 50 µL e a reação constituiu-se de 5 µL de tampão 10X (Invitrogen), 3,75 µL de 25 mM MgCl₂, 4,0 µL de dNTP 2,5 mM, 0,6 µL de 5 U µL⁻¹ de *Taq* DNA polimerase recombinante, 0,5 µL de cada um dos quatro *primers* reversos e 1 µL do *primer forward* (10 pmoles µL⁻¹) e 1 µL de DNA, sendo o volume restante completado com água deionizada estéril. As condições de amplificação foram 3 minutos a 95 °C; 30 ciclos de 45 segundos a 95 °C, 1 minuto e 45 segundos a 57 °C e 1 minuto a 72 °C, e extensão final por 4 minutos a 72 °C.

O produto da PCR de cada uma das amostras foi verificado e quantificado em gel de agarose 1%. Posteriormente, os produtos foram enviados para Helixxa (Campinas, São Paulo,

Brasil), onde foram purificados (Beads AMPure-Agencourt), quantificados novamente (Picogreen, Invitrogen) e pirosequenciados em equipamento GS FLX Titanium series.

3.2.6.2 Pirosequenciamento do gene *dsrB*

As mesmas amostras utilizadas para análise dos genes ribossomais foram também alvo do pirosequenciamento do gene *dsrB*. A amplificação desta região foi feita com os *primers* DSRp2060f (5'-CAACATCGTYCAYACCCAGGG-3') (GEETS et al., 2006) e DSR4R (5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3') (WAGNER et al., 1998). Os dois *primers* (*reverse* e *forward*) receberam adaptadores. O *primer forward* recebeu também uma *tag* de identidade (BARCODE/MID) composta de 8 bases, a qual serviu para identificar as sequências de cada manguezal (Tabela S 3.1).

A PCR foi feita em uma reação de 25 μ L contendo 2,5 μ L de 10X tampão 10X (750 mM Tris-HCl pH 8,8, 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,1% de Tween 20) 1,5 μ L de 25 mM MgCl_2 , 2 μ L de dNTP 2,5 mM, 0,3 μ L de 5 U μ L⁻¹ de Taq DNA Platinum DNA polimerase recombinante (Invitrogen), 0,25 μ L de cada iniciador (10 pmoles μ L⁻¹) e 2 μ L de DNA, sendo o volume restante completado com água deionizada estéril. As condições de amplificação foram 4 minutos a 94 °C; 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C e 1 minuto a 72 °C, e extensão final por 10 minutos a 72 °C. O produto da PCR de cada uma das amostras foi verificado e quantificado em gel de agarose 1% e Nanodrop. Posteriormente, os produtos da amplificação foram enviados para Macrogen (Coreia do Sul), onde foram purificados e quantificados novamente, antes de seu sequenciamento na plataforma 454 Titanium (Roche, EUA).

3.2.6.3 Análise dos dados obtidos por pirosequenciamento

As análises das sequências obtidas do gene ribossomal de arqueias e bactérias foram realizadas utilizando-se dois diferentes *pipelines*, *the Ribosomal Database Project* (RDP) *Pyrosequencing pipeline* (<http://pyro.cme.msu.edu>) e *The Quantitative Insights into Microbial Ecology* (QIIME) (CAPORASO et al., 2010). Utilizando-se o mesmo set de dados (arquivo em SFF) nos dois *pipelines*, as sequências foram classificadas por qualidade, sendo removidas aquelas com um escore de qualidade menor que 25, tamanho menor que 120 pb para arqueias e 150 (RDP) ou 200 pares de bases (QIIME) para bactérias, sendo também removidas sequências com uma ou mais bases ambíguas. As sequências foram agrupadas por barcode, separando-as por amostra, sendo feita, posterior a isso, a remoção das sequências dos *primers*.

A partir do *pipeline* do RDP, as sequências foram analisadas como descrito por Dos Santos et al. (2011), utilizando-se o RDP-II *classifier* a um threshold de 80% de confiança. Em seguida, as análises foram processadas em MOTHUR, utilizando-se a matrix de distância (*uncorrected*) como arquivo de entrada. As unidades taxonômicas operacionais (*operational taxonomic unit* - OTUs) foram determinadas a 3% de dissimilaridade, o que foi utilizado para obter o índice de riqueza de espécies (Chao1), diversidade (Shannon) e a construção das curvas de rarefação.

As análises de pirosequenciamento do gene *dsrB* foram realizadas utilizando-se o *pipeline* QIIME, em que foi criado um *workflow* dentro da interface do Galaxy (GOECKS; NEKRUTENKO; TAYLOR, 2010). Inicialmente, foram detectados os erros de sequenciamento usando a ferramenta *Denoiser* versão 1.3.0. O processamento dos dados foi similar ao desenvolvido para os genes ribossomais. As sequências, inicialmente, foram separadas por amostra (usando os Tags/Mids), sendo, posteriormente, retiradas as sequências dos *primers* e das tags utilizados. A seguir, as sequências foram traduzidas em aminoácidos e removidos os códons de parada. As sequências de aminoácidos foram traduzidas novamente a nucleotídeos e foram removidas aquelas com tamanho menor a 300 pares de bases. Posteriormente, as sequências de boa qualidade foram agrupadas em OTUs, usando ESPIRIT2 (SUN et al., 2009) com cutoff de 80%. Este valor de cutoff foi previamente calculado utilizando-se uma análise de *pairwise* entre a identidade dos organismos com base no gene ribossomal *16S DNAr* e o gene *dsrB*, usando, como base de dados, as sequências presentes no Fungene. Com sequências representativas de cada uma das OTUs, foi feito o alinhamento e a afiliação filogenética das OTUs foi determinada por meio da inferência Amphora (WU; EISEN, 2008), usando a base de dados do FunGene. Com o mesmo *pipeline* QIIME foi calculada a curva de rarefação e estimados os valores de riqueza Chao1 e o índice de diversidade de Shannon (CHAO, 1984; CHAO; LEE, 1992).

Com base nos dados obtidos, foram realizadas análises estatísticas utilizando-se os programas PAST (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001), PRIMER v5 (www.primmer-e.com) e o software R (GHOSH et al., 2010). A análise de variância (*one way ANOVA*) foi utilizada para testar a diferença dos parâmetros físico e químicos, além da diferença entre a frequência relativa de grupos taxonômicos entre os diferentes manguezais. O método de Simper foi empregado para avaliar a similaridade entre os dados e a dissimilaridade das comunidades microbianas entre os manguezais, além de determinar o fator com maior contribuição para as dissimilaridades observadas.

3.2.7 Modelos de co-ocorrência

As diferentes correlações entre os OTUs (contendo, no mínimo, 5 seqüências) de arqueias e bactérias, e os *networks* de associação entre os grupos microbianos nos diferentes manguezais foram construídos utilizando-se o pacote “multtest” no programa R (versão 2.15.0 The R Foundation for Statistical Computing). Foi calculada uma matriz de correlação de Pearson ($> 0,5$ de significância estatística e $p\text{-value}<0,01$), sendo tais valores retificados com a correção de Bonferroni. Após isso, estes dados foram utilizados como matriz de entrada no programa Gephi 0.8 software (BASTIAN; HEYMANN, 2009), em que foi possível visualizar os modelos de co-ocorrência por análises de *network*.

3.2.8 Análises de GeoChip

Os dados de GeoChip utilizados neste trabalho foram cedidos por Lima (2012), e informações mais detalhadas sobre tal análise podem ser obtidas no documento dessa tese. De forma sucinta, foi utilizado o Geochip4.3, contendo 83.992 sondas relacionadas a genes funcionais de diferentes processos biogeoquímicos e funções microbianas. Para a realização desta técnica, o DNA ambiental foi concentrado ($>150\text{ ng}/\mu\text{L}$) e purificado. Posteriormente, houve a marcação do DNA com o corante fluorescente cianina 3 (Cy-3) (WU et al., 2006), seguida de nova purificação, concentração e reidratação com solução de hibridização. Este DNA em solução foi aquecido e mantido a $50\text{ }^\circ\text{C}$, para aplicação na lâmina de microarranjo pré-aquecida ($42\text{ }^\circ\text{C}$), seguindo-se uma hibridização de 16 horas. Após a hibridização, as lâminas foram lavadas, incubadas e, finalmente, secas. A captura da imagem foi feita no escâner *NimbleGen MS200* (Roche, Madison, WI, USA) e o programa NimbleScan 2,5, foi utilizado para o alinhamento das imagens e a obtenção dos dados brutos, os quais foram submetidos ao programa de análises de microarranjo disponível na página na internet do Institute Environmental Genomics (<http://ieg.ou.edu/microarray/>) (LIMA, 2012).

Dos dados obtidos na análise, foram selecionados para este estudo os pertencentes ao ciclo do enxofre. Com eles foi construído o *heatmap* usando o programa R versão 2.15.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010) para os processos de oxidação e redução. Dessa maneira, foi determinado o agrupamento dos manguezais de acordo com as funções e os organismos relacionados com o ciclo do enxofre.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Diferenças entre os manguezais baseados na caracterização física e química

Estes manguezais têm ampla caracterização física e química, determinada e reportada em outros trabalhos do nosso grupo (DIAS et al., 2011; TAKETANI et al., 2010b), nos quais foram encontradas pequenas variações no pH e maiores variações no conteúdo de carbono total, carbono orgânico e nitrogênio total, principalmente com uma diferenciação mais clara da área BrMg04 em relação às demais (DIAS et al., 2011). No presente estudo foram determinados outros fatores, como o potencial redox, o teor de sulfato e os elementos disponíveis (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Características químicas das amostras de sedimentos das quatro áreas de manguezais, coletadas no município de São Paulo. Os valores correspondem a elementos disponíveis nos sedimentos

	BrMg01	BrMg02	BrMg03	BrMg04
Areia	27 ± 0,0	53,0 ± 16,0	48,5 ± 2,5	78,5 ± 6,5
Silte	42,5 ± 3,5	37,0 ± 16,0	32 ± 2,0	7,0 ± 2,0
Argila	30,5 ± 2,5	10,0 ± 0,0	19,5 ± 0,5	14,5 ± 4,5
Umidade (%)	59,1 ± 3,0	75,0 ± 5,4	71,4 ± 2,5	48,8 ± 14,0
pH	5,4 ± 0,5	6,3 ± 0,0	6 ± 0,9	6,9 ± 0,0
MO g/dm ³	129,5 ± 1,5	271,0 ± 52,2	235,7 ± 7,3	71,0 ± 14,0
P	24,5 ± 9,5	37,0 ± 8,0	56 ± 5,0	6,0 ± 1,0
K	4,8 ± 1,9	11,7 ± 1,9	12,4 ± 0,8	7,25 ± 1,0
Ca	51,0 ± 2,0	183,0 ± 9,0	78,5 ± 7,8	51,0 ± 15,0
Mg	124,0 ± 29,1	239,5 ± 92,8	161,75 ± 8,3	93,5 ± 22,6
H+Al	48,0 ± 10,0	36,5 ± 5,5	31,2 ± 3,3	27,5 ± 5,5
SB	179,4 ± 29,5	434,4 ± 85,6	253,2 ± 1,3	151,4 ± 38,6
CTC	227,4 ± 39,5	470,9 ± 79,7	284,2 ± 2,1	179,0 ± 43,8
V	79,0 ± 1,0	91,5 ± 2,5	88,75 ± 1,3	82,7 ± 0,3
Eh	390,5 ± 44,6b	123,0 ± 101,3	180,2 ± 18,3	438,0 ± 22,1
Sulfato (mM)	10,3 ± 0,3	9,5 ± 2,4	9,2 ± 0,6	8,0 ± 5,0
Enxofre(S) (%)	0,3 ± 0,02	0,34 ± 0,0	0,23 ± 0,0	0,18 ± 0,0
Sulfato/ Enxofre	11,1 ± 0,7	8,9 ± 1,7	12,5 ± 0,6	12,4 ± 5,7
Ferro piritico (FeS ₂) (μmol g ⁻¹)	172,2 ± 15,6	279,5 ± 61,3	308,4 ± 31,2	174,3 ± 134,3
DOP (%)	56,4 ± 3,0	84,0 ± 2,6	74,1 ± 4,9	79,3 ± 3,2

Empregando-se os dados físicos e químicos, foi realizada uma análise de Simper com a matriz de Bray Curtis no programa Primer5, tendo sido observado que os manguezais com maior dissimilaridade são BrMg02 com BrMg04 (44,6%) e BrMg01 com BrMg02 (35,92%), revelando, assim, que este último é o mais diferente de todos, com base nas características analisadas. Nesta análise, os fatores que tiveram mais contribuição para a separação das

amostras foram o Eh, com 20,7% e 20,5 %; CTC, com 19,23% e 18,9%; SB, com 18,6% e 19,77% e MO, com 13,15% e 10,9% entre BrMg02 e BrMg04 e BrMg01 e BrMg02, respectivamente. A correlação de Pearson com base em tais fatores (Tabela S 3.2) mostrou correlações negativas entre Eh e MO (-0,96), Eh e SB (-0,87) e Eh e CTC (-0,86) e, em contrapartida, correlações positivas de SB e MO (0,88) e CTC e MO (0,88).

Os valores de Eh variaram desde +22 até +460, sendo inversamente proporcionais ao nível de contaminação. Assim, os valores mais baixos foram encontrados no manguezal com maior contaminação (BrMg02), seguido do manguezal com contaminação antropogênica (BrMg03), o manguezal com leve contaminação de petróleo (BrMg01) e o manguezal pristino (BrMg04). Estes valores de potencial redox (Eh) foram similares aos reportados para outros manguezais (CLARK et al., 1998; LYIMO; ARJAN; OP DEN CAMP, 2002; MCKEE, 1993). Assim, os maiores valores de Eh observados nos manguezais BrMg01 e BrMg04, provavelmente, devem-se à sua maior abundância de espécies de mangues (*Rhizophora mangle*, *Avicennia shaueriana* e *Laguncularia racemosa*), os quais geram uma maior areação pela liberação do oxigênio desde as raízes, aumentando, conseqüentemente, o valor do Eh (CLARK et al., 1998; LYIMO; ARJAN; OP DEN CAMP, 2002; MCKEE, 1993). Da mesma maneira, os manguezais com maior abundância de indivíduos de *R. mangle* tendem a possuir um potencial redox mais positivo que os que apresentam maior abundância de outras espécies (MCKEE, 1993).

Já os valores mais baixos de potencial redox e mais altos de matéria orgânica foram observados no BrMg02. Neste manguezal é observada uma menor quantidade de plantas, principalmente devido à inibição causada pela contaminação sobre o crescimento de plantas de *R. mangle*. Os altos valores de MO devem-se ao fato de que a mineralização decresce com o decréscimo do potencial redox, já que a oxigenação é requerida para uma mais rápida degradação da matéria orgânica, além de ser fundamental na rápida decomposição dos hidrocarbonetos (HAMBRICK; DELAUNE; PATRICK Jr., 1980).

Em condições de anaerobioses, a degradação do petróleo é feita por microrganismos redutores de sulfato. Sendo assim, o sulfato o principal acceptor de elétrons na biodegradação de hidrocarbonetos em sedimentos anaeróbios. Os sulfatos são reduzidos para sulfitos, os quais são usualmente precipitados como sulfitos de metal (pirita Fe_2S) ou liberados como gás (sulfeto de hidrogênio) (HAMBRICK; DELAUNE; PATRICK Jr., 1980; PRADA-GAMERO; VIDAL-TORRADO; FERREIRA, 2004). Além da caracterização física e química, foi feita a análise de hidrocarbonetos (LIMA, 2012) nos quatro manguezais avaliados no presente estudo (BrMg01-BrMg04) (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Análises de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (ng.g⁻¹ peso seco) (fonte: LIMA, 2012) nas amostras de sedimento dos manguezais estudados

Hidrocarbonetos	Manguezais			
	BrMg01	BrMg02	BrMg03	BrMg04
1-Naftaleno	4,70	2,31	5,49	1,60
2-Metilnaftalenos	1,30	1,92	7,76	1,30
3-Bifenilo	1,30	1,30	1,70	1,30
4-Etilnaftalenos	2,60	2,60	2,60	2,60
5-Dimetilnaftalenos	2,60	8,26	6,31	2,60
6-Acenaftileno	3,70	3,70	3,70	3,70
7-Acenafteno	1,30	1,30	1,30	1,30
8-Trimetilnaftalenos	2,53	3,76	1,94	1,30
9-Fluoreno	1,30	1,60	1,30	1,30
10-Metilfluorenos	1,76	5,05	1,44	1,30
11-Dibenzotiofeno	1,30	1,58	1,30	1,30
12-Fenantreno	2,60	3,01	2,90	2,60
13-Antraceno	1,10	1,56	1,13	1,10
14-Dimetilfluorenos	1,30	5,76	1,30	1,30
15-Metildibenzotiofenos	1,30	1,30	1,30	1,30
16-Metilfenantrenos	2,49	5,73	3,09	2,20
17-Dimetildibenzotiofenos	1,30	1,88	1,30	1,30
18-Dimetilfenantrenos	3,46	10,68	2,55	2,20
19-Fluoranteno	8,68	8,60	8,57	1,50
20-Pireno	7,27	10,81	6,37	1,30
21-Metilfluorantenos	3,82	34,45	2,90	1,30
22-Reteno	1,30	1,72	1,30	1,30
23-Metilpireno	3,92	36,34	2,26	1,30
24-Benzo(c)fenantreno	1,20	1,20	1,25	1,20
25-Benzo(a)antraceno	4,89	5,06	4,40	1,50
26-Criseno	5,07	49,41	4,83	1,20
27-Metilcriseno	8,78	119,22	6,35	1,20
28-Dimetilcrisenos	7,96	145,60	2,66	1,20
29-Benzo(b)fluoranteno	5,38	7,96	5,35	1,30
30-Benzo(j)fluoranteno	4,11	6,86	2,99	1,30
31-Benzo(k)fluoranteno	5,10	6,05	3,57	1,30
32-Benzo(e)pireno	6,02	35,02	5,61	1,30
33-Benzo(a)pireno	4,72	4,73	4,82	1,10
34-Perileno	110,36	37,58	23,80	43,30
35-Indeno[1,2,3-c,d]pireno	38,89	15,30	2,94	6,70
36-Dibenzo(a,h)antraceno	7,65	11,07	2,78	1,00
37-Benzo(b)criseno	4,29	1,33	1,45	1,10
38-Benzo(g,h,i)perileno	27,85	39,92	13,11	5,78
39-Coroneno	10,89	5,50	5,41	3,00
Σ-HPAs	316,09	647,03	161,13	112,1

Algumas inferências foram realizadas, sendo, primeiro, observado que BrMg02 foi o manguezal que teve o maior teor de hidrocarbonetos (647,03 ng.g⁻¹), apresentando valores de contaminação 5,7 vezes maiores que BrMg04 (112,1 ng.g⁻¹), 4 vezes maiores que BrMg03 (161,13 ng.g⁻¹) e 2 vezes maiores que BrMg01 (316,09 ng.g⁻¹). Os componentes dimetilcriseno (145,6 ng.g⁻¹) e metilcriseno (119,2 ng.g⁻¹) foram os contaminantes com maior teor no BrMg02 e o perileno foi o composto mais abundante no BrMg01 (110,36 ng.g⁻¹), no BrMg04 (43,3 ng.g⁻¹) e no BrMg03 (23,8 ng.g⁻¹). Apesar de BrMg02 ser o manguezal com

maior teor na maioria dos contaminantes, vale ressaltar alguns mais abundantes nos outros manguezais, como, por exemplo, perileno, indeno [1,2,3-c,d] pireno (citados acima), benzo(b) criseno (4,29 ng.g⁻¹) e coroneno (10,89 ng.g⁻¹), no BrMg01 e naftaleno (5,49 ng.g⁻¹), metilnaftaleno (7,76 ng.g⁻¹) e bifenilo (1,7 ng.g⁻¹), no BrMg03.

3.3.2 Quantificação dos grupos alvo nos sedimentos estudados

A metodologia de qPCR foi utilizada na quantificação do gene ribossomal 16S DNAr de arqueias e bactérias e do gene funcional *dsrB* nos diferentes manguezais estudados. Os valores de eficiência da amplificação foram de 0,71, para arqueias; 0,88, para bactérias e 0,73, para *dsrB*. Os valores de regressão logarítmica das curvas obtidas (R^2) foram de 0,99, para todas as quantificações.

A análise quantitativa mostrou que as bactérias foram o grupo mais abundante, com valores de 9,68 a 10,4 (cópias/g Log), seguidas das arqueias com valores de 7,67 a 8,68 (cópias/g Log) e, por fim, da quantificação do gene *dsrB*, com valores entre 4,98 a 5,27 (Tabela 3.3). Os três grupos microbianos avaliados foram mais abundantes em BrMg02, com valores de 10,4 de bactérias, 8,68 de arqueias e 5,27 de SRB (cópias/g Log).

Tabela 3.3 - Quantificação por qPCR do gene ribossomal 16S DNAr de arqueias e bactérias, do gene funcional *dsrB* e da razão do número de cópias do gene 16S em bactérias e arqueias. Valores apresentados em log. Letras iguais mostram que não existem diferenças entre as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

	BrMg01	BrMg02	BrMg03	BrMg04
Arqueias	8,1 b	8,68 c	7,67 a	8,16 b
Bactérias	10 b	10,4 c	10,2 c	9,68 a
<i>dsrB</i>	5,07 a	5,27 a	4,98 a	5,12 a

A maior abundância das arqueias, bactérias e SRB na área BrMg02 sugere que a contaminação com petróleo favorece o desenvolvimento (abundância) desses microrganismos nestas áreas. No entanto, este estímulo foi diferente em arqueias de sedimentos estuarinos do Reino Unido (ROLING et al., 2004), onde foi verificado um decréscimo na abundância de tal grupo em área com contaminação. Em relação às bactérias, o efeito positivo do óleo tem sido reportado, mostrando que a densidade (TAKETANI et al., 2009) e a diversidade (DOS SANTOS et al., 2011) de bactérias podem aumentar com a adição de petróleo a sedimentos de manguezais (KOSTKA et al., 2011; TAKETANI et al., 2009). Isto se deve, possivelmente, ao fato de o petróleo constituir-se de uma abundante fonte de carbono, o que permite o incremento de espécies que têm a capacidade de utilizar algumas frações degradáveis dos

hidrocarbonetos, aumentando a biomassa e a diversidade microbiana presente nesses ambientes.

Dessa forma, como é citado por Dos Santos et al. (2011), o fator limitante na degradação de petróleo nos manguezais não é a capacidade intrínseca da sua comunidade para degradar esses compostos, mas sim o desequilíbrio que pode ser causado pelo alto teor de carbono e as baixas fontes de nutrientes disponíveis nos manguezais (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). Assim, o óleo pode causar um consumo rápido do nitrogênio e fósforo presente, gerando um desequilíbrio e o consequente aumento nas comunidades que são favorecidas com os altos teores de carbono (DOS SANTOS et al., 2011).

A abundância de SRB obtida por qPCR foi similar em todos os manguezais, com valores de 4,98 a 5,27 Log/g ($p > 0,05$) (Tabela 3.3). Estes valores foram menores que os publicados em outros sedimentos, os quais reportam abundâncias de 10^6 , em lagoas salinas e hipersalinas da Rússia (FOTI et al., 2007); $6,6 \times 10^9$, em pântanos de sal da Inglaterra (QUILLET et al., 2012) e $4,6 \times 10^8$, em manguezais do Rio de Janeiro (ANDRADE et al., 2012). Tal diferença pode ter ocorrido, dentre outros fatores, devido à variação da profundidade do sedimento junto com a variação na disponibilidade da matéria orgânica e a concentração de sulfato nos manguezais aqui estudados (ANDRADE et al., 2012; QUILLET et al., 2012).

3.3.3 Diversidade de arqueias e bactérias por pirosequenciamento usando RDP e QIIME

Os resultados das análises de arqueias e bactérias usando as plataformas de RDP e QIIME encontram-se na Tabela S3.3. Com o QIIME, as sequências foram limpas de erros de sequenciamento, enquanto que, com RDP, não foi feita esta limpeza, parâmetros que são importantes na qualidade e na confiabilidade dos dados (BAROTT et al., 2011; LEGG et al., 2012).

Usando QIIME, foi obtido um total 4.255 e 30.947 sequências para arqueias e bactérias, valores 15,0% e 5,2% menores que os encontrados com o RDP, respectivamente. A comparação destes dois *pipelines* já tem sido feita em outros trabalhos (BAROTT et al., 2011; MAO; YANNARELL; MACKIE, 2011), os quais têm mostrado uma diminuição similar (12,2%) no número de sequências quando é empregado o QIIME (MAO; YANNARELL; MACKIE, 2011). No entanto, o QIIME permitiu classificar 54,4% mais de sequências de arqueias (threshold 80%), quando comparado com os resultados do RDP. Em bactérias, a porcentagem de sequências classificadas foi igual nos dois *pipelines*, com valor de 99,6%.

Utilizando-se os dois *pipelines*, foram calculados os índices de Chao1 e Shannon e feitas as curvas de rarefação (Tabela S3.4 e Figura S3.1 dados do RDP), encontrando-se alta variação, dependendo do *pipeline* utilizado. No entanto, esta esperada variação, possivelmente causada pela remoção de quimeras e a correção de erros pelo denoising, feitos com QIIME, foi proporcional entre os manguezais, levando a uma diminuição geral do número de OTUs (BAROTT et al., 2011).

Para facilitar a discussão dos dados, foram escolhidos, para serem apresentados no corpo principal da tese, apenas os resultados obtidos a partir das análises feitas no QIIME (Tabela 3.4 e Figura 3.2), por serem mais acuradas, permitindo, assim, uma interpretação melhor dos dados.

Tabela 3.4 – Índices de riqueza e diversidade calculados usando o QIIME para arqueias e bactérias em manguezais com diferentes estados de intervenção

Grupo	Amostra	NS	OTUs	Chao 1	Shannon
Arquéias	BrMg01	406	101	130 (\pm 15,23)	5,98 (\pm 0,007)
	BrMg02	277	93	135 (\pm 11,47)	6,01 (\pm 0,042)
	BrMg03	373	91	113 (\pm 8,64)	5,89 (\pm 0,030)
	BrMg04	253	82	109 (\pm 9,142)	5,78 (\pm 0,047)
	Total	1,309	367		
Bactérias	BrMg01	2765	1112	2163(\pm 129,6)	9,39(\pm 0,014)
	BrMg02	1721	839	1760(\pm 62,9)	9,11(\pm 0,056)
	BrMg03	2939	1239	2230(\pm 11,6)	9,66(\pm 0,023)
	BrMg04	1547	836	1731(\pm 156.3)	9,28(\pm 0,078)
	Total	8.972	4.026		

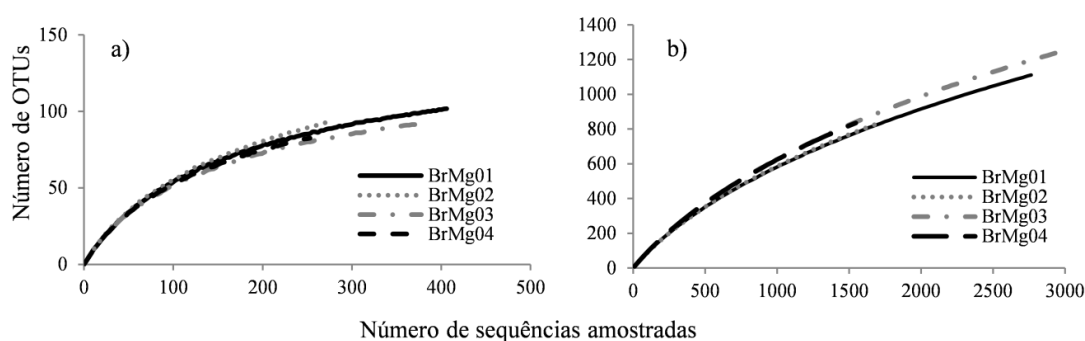


Figura 3.2 - Curvas de rarefação usando os dados do QIIME para arqueias (a) e bactérias (b) em manguezais com diferentes estados de intervenção

Para analisar as sequências com base em OTUs, as repetições de cada manguezal foram unidas e foi obtido um compilado de dados para cada ambiente. Os índices calculados mostraram que, em valores absolutos, BrMg02 teve o maior índice de riqueza (135) e

diversidade (6,01) na comunidade de arqueias (Tabela 3.4). Comportamento similar nestes índices já tinha sido observado por Mendes et al. (2012), que encontraram que manguezais antropizados apresentam uma riqueza de arqueias maior que ambientes sem contaminação. O mesmo efeito foi observado com base nas curvas de rarefação (Figura 3.2a), que revelaram que BrMg02 e BrMg01 tiveram menor tendência de chegar à assíntota, indicando uma maior ocorrência de grupos diferentes nestas áreas.

Em bactérias foi feito o mesmo procedimento que, em arqueias, unindo-se as repetições de cada manguezal. Os resultados dos índices de riqueza e diversidade mostraram que os maiores valores foram encontrados em BrMg03 (2.230-9,66), seguido de BrMg01 (2.163 e 9,39) (Tabela 3.4). Isso indica que a comunidade de bactérias pode ser favorecida pela contaminação antropogênica e por baixos níveis de contaminação de petróleo. Em alguns trabalhos em manguezais têm sido mostrado o mesmo efeito, sugerindo que os contaminantes em baixos níveis estimulam a riqueza e a diversidade das comunidades microbianas. Mas, quando os teores são aumentados, o efeito é contrário (DOS SANTOS et al., 2011; TAKETANI et al., 2010a), possivelmente devido à inibição do desenvolvimento de vários grupos anteriormente dominantes nessas áreas.

3.3.4 Diversidade de arqueias por pirosequenciamento

A análise da comunidade do domínio *Archaea*, usando pirosequenciamento da região V3, permitiu obter 4.255 *reads*, com média de 532 sequências por amostra, com um tamanho médio de 118 pares de bases.

Dentro deste domínio, dentre os seis filos já reportados (Crenarcheota, Euryarcheota, Thaumarchaeota, `Aigarchaeota`, Korarcheota e Nanoarchaeota), (BROCHIER-ARMANET; FORTERRE; GRIBALDO, 2011; GUPTA; SHAMI, 2011), apenas Crenarcheota e Euryarcheota foram detectados (Figura 3.3). Os valores absolutos não foram significativamente diferentes (Tukey $P < 0,05$), no entanto, pode ser observada uma tendência a uma maior predominância de Crenarchaeota em BrMg01 (62%) e BrMg03 (61%) e Euryarcheota em BrMg02 (59%) e BrMg04 (66%). Os filos Crenarchaeota e Euryarchaeota já foram reportados como predominantes em diferentes manguezais (LYIMO et al., 2009; MENDES et al., 2012; YAN; HONG; YU, 2006), sendo o Crenarcheota o mais abundante em áreas profundas e Euryarcheota, nas áreas superficiais (QIAN et al., 2011). Da mesma maneira, o grupo de pesquisa em sedimentos de manguezais da linha costeira de São Paulo, onde este trabalho está inserido, encontrou, em um trabalho prévio, os grupos Thaumarcheota-

trabalhos tem sido reportado que a classe Methanomicrobia aumenta em áreas com histórico de contaminação com petróleo (MIRALLES et al., 2010), principalmente pela promoção da maior e mais constante anaerobiose, o que facilita o processo metanogênico realizado por tal grupo.

Com isso, foi observado que, nos manguezais, as arqueias são um grupo abundante e diverso (DIAS et al., 2011; MENDES et al., 2012; TAKETANI et al., 2010b), o que pode ser atribuído à condição dinâmica desses ambientes, como, por exemplo, pelas alterações promovidas pelas fases de inundação e seca, o que fornece uma alta mudança nas condições físicas e químicas no ambiente, permitindo a presença desses grupos fisiologicamente diversos (KIM et al., 2005). Os grupos de arqueias não detectados no presente estudo são descritos em condições específicas, ou ambientais extremas, o que os torna pouco adaptados a *ever-shifting* ambientes.

Com a análise de NMDS (Figura S3.2), usando a classificação taxonômica ao nível de família, foi observado que as repetições de cada um dos manguezais se agrupam, com exceção das amostras da área BrMg04. Observa-se, assim, que a estrutura da comunidade de arqueias de BrMg04b foi mais similar com as amostras BrMg02. Tal indicação já foi realizada por Dias et al. (2011) que, avaliando a diversidade de arqueias por meio de DGGE nas mesmas áreas, encontraram este mesmo comportamento, sendo isso explicado, pelos autores, como agrupamento causado devido às maiores similaridades das características físicas e químicas (especificamente nos valores de salinidade e condutividade elétrica) entre os pontos amostrados nessas áreas. No presente trabalho foi observado o mesmo comportamento para os parâmetros de ferro pirítico (FeS_2) e grau de piritização (DOP), com valores de 308,1 e 82,5, para BrMg04b e de 279, 5 e 84,0, para BrMg02, mostrando, assim, que esta tendência se repete para processos relacionados com o ciclo do enxofre.

Os resultados deste trabalho confirmam que, devido ao fato de os manguezais serem ambientes anaeróbicos, com alto teor de matéria orgânica e sulfato (LYIMO; POL; OP DEN CAMP, 2002), eles são propícios para o desenvolvimento de organismos envolvidos com o ciclo do enxofre e do carbono. Esta correlação pode explicar a alta abundância das classes Thermoprotei e Methanomicrobia, as quais variaram com as condições de intervenção dos manguezais. Na classe Thermoprotei são encontradas ordens (Thermoproteales, Sulfolobales e Desulfurococcales) conhecidas por realizarem a redução do enxofre em condições anaeróbicas (LIU; BEER; WHITMAN, 2012) e, assim mesmo, dentro da classe Methanomicrobia, existem grupos importantes na redução de sulfato e na metanogênese (LYIMO et al., 2009). Estas ordens têm sido recentemente reportadas, por outros autores

(MENDES et al., 2012; PIRES et al., 2012), como presentes em áreas de manguezais, corroborando, assim, os resultados obtidos neste trabalho.

3.3.5 Diversidade de bactérias por pirosequenciamento

Foram obtidas 30.947 sequências do domínio *Bacteria*, com média por manguezal de 7.736 sequências e tamanho de 245 pb. A classificação taxonômica para este domínio (Figura 3.4) mostrou como predominantes em todas as áreas os filos Proteobacteria (51,8%), Bacteroidetes (19,5%) e Acidobacteria (7%).

A abundância de Proteobacteria usando diversas ferramentas moleculares já foi amplamente citada, tanto em manguezais brasileiros (ANDREOTE et al., 2012; DIAS et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2011; PEIXOTO et al., 2011; TAKETANI et al., 2009, 2010b) como em manguezais de outras regiões do mundo (GHOSH et al., 2010; LIANG et al., 2006). Em relação aos filos Bacteroidetes e Acidobacteria, estes foram descritos como grupos abundantes em manguezais brasileiros (DIAS et al., 2010; PEIXOTO et al., 2011).

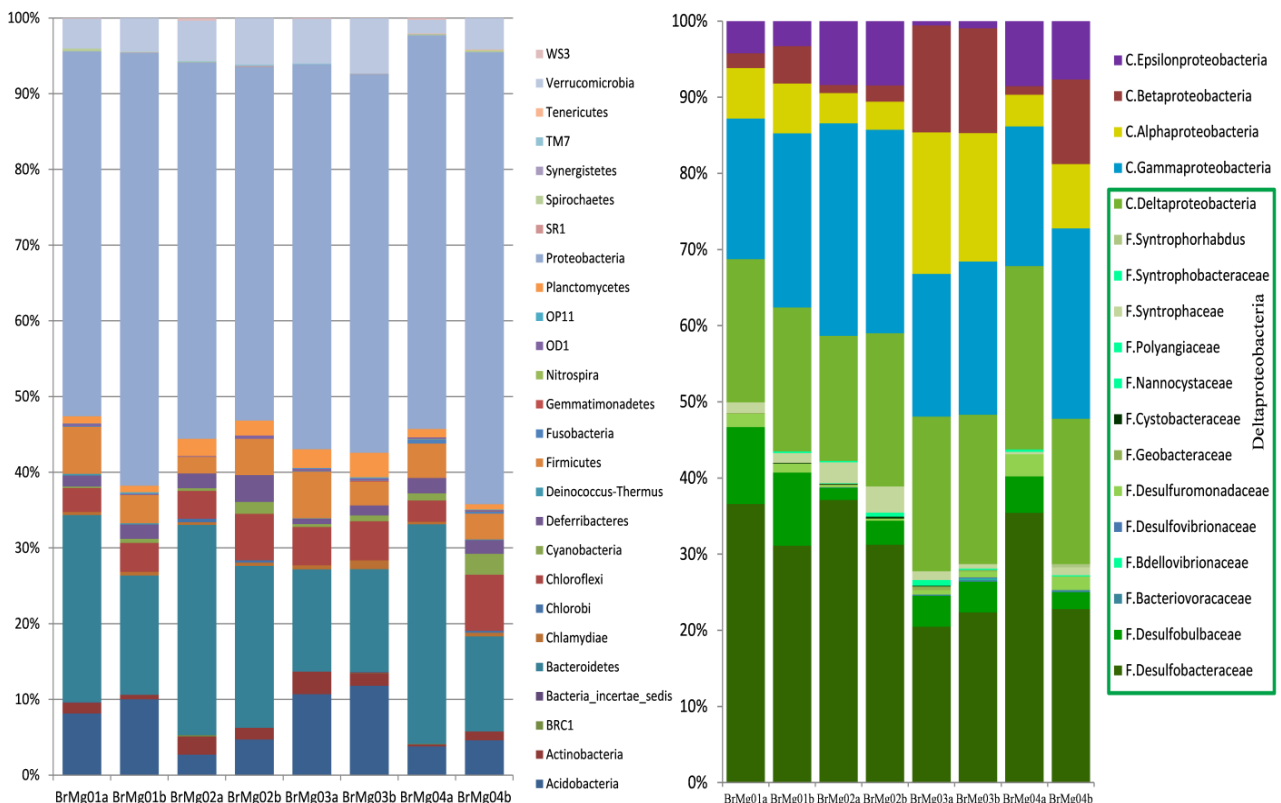


Figura 3.4 - Frequência de diferentes grupos de bactérias em manguezais do estado de São Paulo. Classificação realizada usando a plataforma QIIME com o sistema de classificação do RDP com um threshold de 80%

Dentro do filo Proteobacteria, os grupos mais abundantes foram os relacionados com alguma etapa do ciclo do enxofre. Assim, Deltaproteobacteria (57%), seguida da Gammaproteobacteria (22%), foram as classes dominantes. Estes grupos participam da redução de sulfato/sulfito e da oxidação de sulfeto/enxofre, respectivamente, sendo esta proporção congruente com os valores encontrados em outros trabalhos (ANDREOTE et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2011). Em menor frequência também foram encontradas Alphaproteobacteria (9%) (significativamente mais abundante, 17%, $p > 0,05$, no BrMg03), Betaproteobacteria (6,3%) e Epsilonproteobacteria (5,3%), também já reportadas como classes frequentes em manguezais (ANDREOTE et al., 2012; CLEARY et al., 2012; DIAS et al., 2012; LIANG et al., 2006).

Dentro da classe Deltaproteobacteria, a ordem mais frequente foi Desulfobacterales (64%) e, dentro dela, foi observada a predominância de sequências afiliadas às famílias Desulfobacteracea (51,1%), Desulfobulbacea (8,3%), Syntrophaceae (2,6%) e Desulfuromonadaceae (2%). Destas, Desulfobacteracea (58,1%) e Syntrophaceae (5,2%) tiveram uma frequência maior em BrMg02 em relação às demais, assim como Desulfobulbaceae foi mais abundante em BrMg01 (15,1%) e Syntrophaceae em BrMg04 (4,0%).

A ordem Desulfobacterales é composta exclusivamente por bactérias redutoras de sulfato, descrita frequentemente em manguezais (LYIMO et al., 2009; SANTOS et al., 2010; TAKETANI et al., 2010b), onde, por vezes, está relacionada com processos de degradação anaeróbica de hidrocarbonetos (TAKETANI et al., 2010b). A classe Gammaproteobacteria inclui as bactérias púrpuras sulfurosas, as quais predominam em ambientes marinhos, onde têm a capacidade de utilizar o sulfeto de hidrogênio (H_2S) como doador de elétrons (IKENAGA et al., 2010). A classe Gammaproteobacteria foi a segunda mais abundante nas áreas estudadas, diferente do encontrado em outros manguezais, onde esta se apresenta como o grupo mais abundante (GHOSH et al., 2010; LIANG et al., 2006; PEIXOTO et al., 2011). Estas diferenças podem ocorrer devido às características intrínsecas de cada área, já que as comunidades microbianas podem variar de acordo com as condições físicas e químicas, de localidade, a sazonalidade e a profundidade de amostragem em cada manguezal (DIAS et al., 2010).

Outra possível razão para a divergência dos dados, possivelmente, são as metodologias empregadas, incluindo o método de extração do DNA e a ferramenta molecular para analisá-la. Na maioria destes trabalhos empregou-se biblioteca de clones, técnica que, embora permita ter acesso à diversidade dos microrganismos não cultiváveis, gera poucos clones por amostra,

o que não permite representar a total extensão da diversidade presente na área (ZHANG, 2011). Estes problemas tentam ser superados com o pirosequenciamento e a metagenômica, os quais são capazes de incrementar a resolução das análises da comunidade microbiana, permitindo conhecer melhor sua complexidade e interações dentro das amostras, além de ajudar a inferir na sua funcionalidade (CARDENAS; TIEDJE, 2008).

3.3.6 Modelos de co-ocorrência de arqueias e bactérias

Diversos trabalhos têm avaliado a diversidade e a estrutura das comunidades microbianas presentes nos manguezais. No entanto, uma abordagem da ecologia microbiana destes ecossistemas, caracterizando as comunidades e sua estrutura, observada desde as relações entre os grupos microbianos (PROSSER et al., 2007), ainda não tem sido empregada, visão que poderia aportar bastante conhecimento e é obtida pelos modelos de co-ocorrência (BARBERAN et al., 2012) de organismos presentes nos manguezais. Usando os dados de frequência de arqueias e bactérias obtidos do pirosequenciamento da região 16S, foram construídos os modelos de co-ocorrência nos manguezais com os diferentes tipos de intervenção (Figura 3.5).

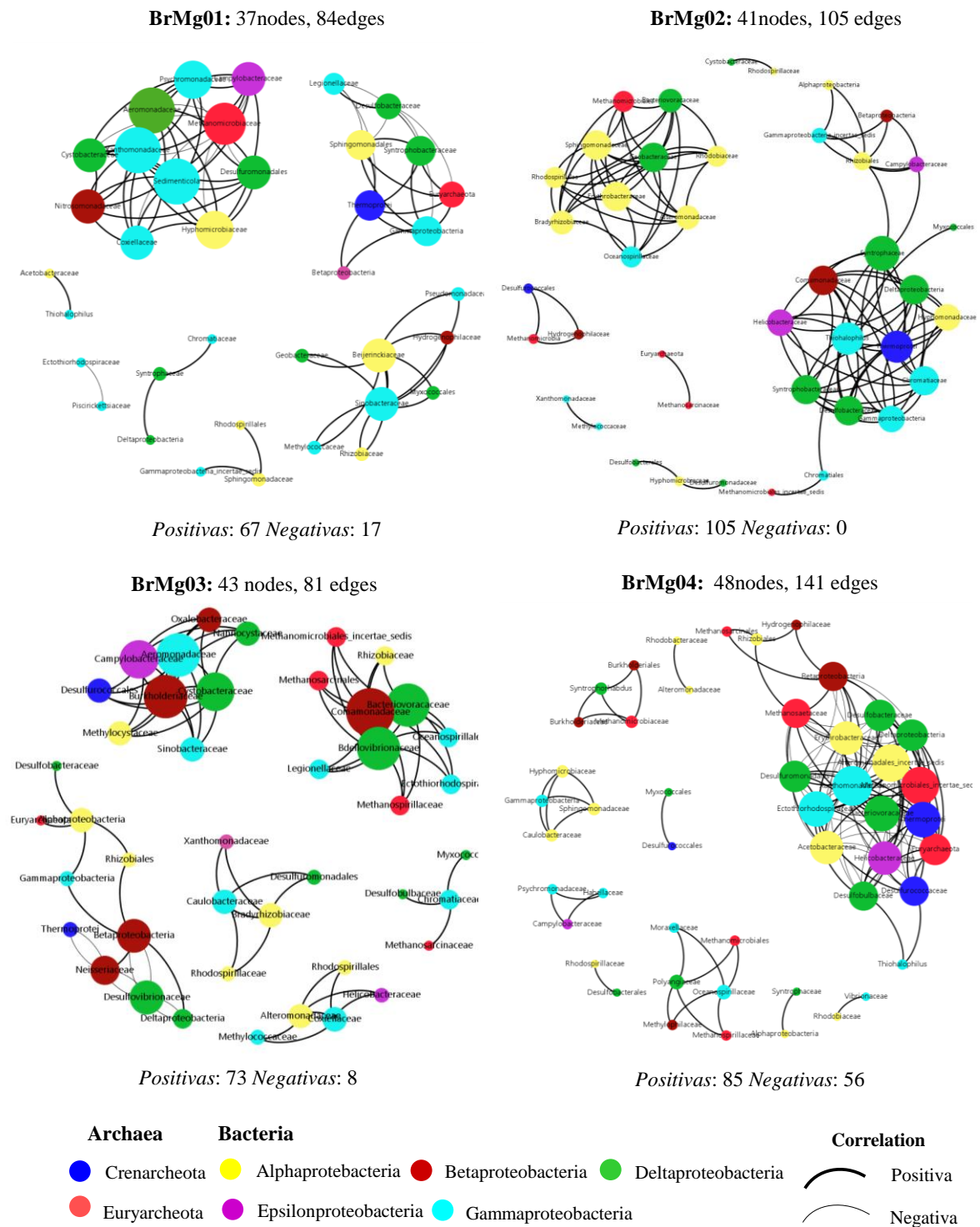


Figura 3.5 – Modelos de co-ocorrência baseados na análise de correlação Pearson (> 0,5 de significância estatística e P-value<0,01) usando o número de OTUs de arqueias e bactérias dos manguezais com diferentes estados de intervenção (BrMg01= com baixa e BrMg02 = com alta contaminação de petróleo, BrMg03 = contaminação antropogênica e BrMg04 = sem contaminação)

Os dados mostraram que a contaminação de tais áreas simplifica as correlações, o que é evidenciado ao se observar que o manguezal sem contaminação (BrMg04) teve o maior número de grupos (nodes) (48) e interações (edges-linhas) (85 positivas e 56 negativas 56). Em relação às demais áreas, foi observado que a contaminação diminuiu as correlações negativas, revelando que os manguezais contaminados não possuem (BrMg02 - 0) ou possuem poucas (BrMg01 - 17 e BrMg03 - 8) interações negativas. Nesse tipo de análise, quando duas espécies co-ocorrem ou mostram um modelo de abundância similar em várias amostras, uma relação positiva é assumida, enquanto que, quando estas possuem uma mútua exclusão ou anticorrelação, uma correlação negativa é indicada. No entanto, a interpretação ecológica de tal resultado é variada, já que a correlação positiva pode estar presente devido à alimentação cruzada (*cross feeding*), à coagregação em biofilmes, à cocolonização, aos nichos compartilhados ou outros motivos. Ao contrário, uma correlação negativa pode ser resultado de amensalismo, uma relação preza-predador, competição, entre outros (FAUST; RAES, 2012). Assim, as correlações positivas e negativas observadas nos diferentes modelos podem estar relacionadas a qualquer um desses motivos, o que torna necessárias validações com metodologias específicas para definir exatamente os tipos de interação que regem tais observações. No entanto, pode-se sugerir, no presente trabalho, que áreas contaminadas tornam o ambiente mais seletivo, o que torna a competição (indicada pelo número de correlações negativas) menos importante para a sobrevivência dos organismos, enquanto que a capacidade de utilizar os recursos do meio, de forma independente ou dependente de interações (indicada pelo número de correlações positivas), seria de grande importância para a sobrevivência neste novo ambiente.

Em relação aos grupos que apresentaram co-ocorrência, cada manguezal teve representantes de todas as classes de Proteobacteria, mas os grupos (gêneros e espécies) e o número de correlações mudaram com a condição do manguezal. Em BrMg01, a maioria das interações foi entre Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria; em BrMg02, foi entre Alphaproteobacteria e Deltaproteobacteria; em BrMg03, foi Deltaproteobacteria e Betaproteobacteria e, em BrMg04, foi entre Deltaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Crenarcheota e Euryarcheota. Estes resultados mostram que, em todos os manguezais, Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria foram os grupos com maior frequência e maior correlação, seguidos de Alphaproteobacteria, que não foi um grupo abundante, porém, com alta interação. Isso indica que tais grupos estão relacionados ao funcionamento do sistema, onde podem exercer funções centrais, como, por exemplo, na ciclagem de nutrientes, como descrito anteriormente por Andreote et al. (2012).

Os grupos (famílias, gêneros e espécies) dentro das classes Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria foram diferentes em cada manguezal, apesar de o número de interações entre estes grupos serem similares. Isso indica que as funções exercidas por tais grupos, dentre elas a redução de sulfato e a oxidação do enxofre, estão sendo feitas em todos os ambientes, porém, promovidas por grupos distintos. Uma maior interação (número de interações positivas e negativas) entre arqueias (Methanomicrobiales, Methanosarcinales, Thermoprotei e Desulfurococcaceae), Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria foi observada em BrMg04, destacando-se a interação entre organismos de domínios diferentes e indicando que tais interações podem ser mais sensíveis à alteração do ambiente (MUYZER; STAMS, 2008). Tal observação reforça os resultados encontrados por Boetius et al. (2000), que descreveram a presença de consórcios de arqueias e SRB em sedimentos marinhos e por Dubilier et al. (2001), que encontraram SRB e SOB interagindo dentro de oligoquetas marinhos. Nestas relações ecológicas, as SRB podem produzir sulfeto, o que pode servir como fonte de energia para as bactérias e/ou arqueias oxidadoras do sulfeto (DUBILIER et al., 2001).

3.3.7 Diversidade de bactérias redutoras de sulfato (*Sulfate reducing bacteria* - SRB) determinada por pirosequenciamento do gene funcional *dsrB*

Na literatura descrevem-se mais de 220 espécies, pertencentes a 60 gêneros de BRS, divididos 7 grupos filogenéticos, 5 de bactérias (Deltaproteobacteria, Nitrospirae, Clostridia, Thermodesulfobiaceae, Thermodesulfobacteria) e 2 de arqueias (Euryarchaeota (gênero *Archaeoglobus*) e Crenarchaeota (gênero *Caldivirga e Thermocladium*). Todos estes grupos são possíveis de serem detectados com base no estudo do gene funcional *dsrB*, o que o converte em uma poderosa ferramenta para a detecção deste grupo microbiano (BARTON; FAUQUE, 2009; MUYZER; STAMS, 2008).

Usando o pirosequenciamento com base no gene funcional *dsrB*, foi obtido um total de 34.653 sequências, com tamanho médio de 365 pb e média de 8.663 sequências por manguezal. Utilizando-se as ferramentas do programa QIIME foram obtidas as OTUs e, a partir do valor médio entre as repetições de cada manguezal, foram construídas as curvas de rarefação (Figura 3.6) e determinados os índices de riqueza (Chao1) e o índice de diversidade (Shannon) (Tabela 3.5).

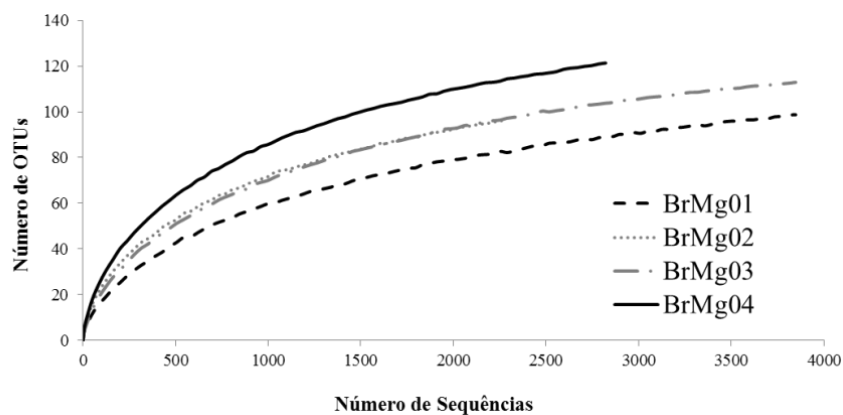


Figura 3.6 - Curva de rarefação e índices de diversidade do gene funcional *dsrB* proveniente das quatro áreas de manguezais estudadas

Tabela 3.5 - Índices de riqueza e diversidade calculados usando o QIIME para o gene funcional *dsrB*, a partir de dados de pirosequenciamento em manguezais com diferentes estados de intervenção

Amostra	OTUs	Chao1	Shannon
BrMg01	99	132 ± 9,8	2,92 ± 0,16
BrMg02	97	127 ± 10,6	3,71 ± 0,20
BrMg03	113	129 ± 2,3	3,15 ± 0,17
BrMg04	121	153 ± 1,6	4,14 ± 0,40
Total	430		

Os valores de Chao 1 variaram de 127 a 153 e o índice de Shannon foi de 2,92 até 4,14. Valores menores que estes são reportados nos estuários da costa leste da Inglaterra (Colne), onde foi utilizada a mesma estratégia metodológica (pirosequenciamento de *dsrB*), observando-se valores de riqueza (Chao1) de 40-102 e de diversidade (Shannon) de 1,7-3,21 (OAKLEY et al., 2012). Usando a biblioteca de clones com este gene funcional e nos mesmos manguezais foram encontrados valores de riqueza de 12-20 e de diversidade, de 1,7-2,3 (Ver capítulo 2, Tabela 2.4). Apesar de estes valores serem menores, foi observado que, independente das estratégias metodológicas, as SRB tiveram maior riqueza e diversidade no manguezal pristino (BrMgv04). Isso pode indicar que qualquer tipo de contaminação destas áreas leva a uma seleção sobre tal grupo, estreitando a diversidade genética microbiana relacionada ao processo de redução de sulfato nos sedimentos de manguezais. Vale, ainda, destacar que, na classificação taxonômica do *dsrB* por pirosequenciamento (Figura 3.7), BrMg04 apresentou a maior proporção de sequências afiliadas a bactérias não classificadas

(36,5%), o que pode indicar que esse manguezal apresenta um amplo grupo de microrganismos ainda não descritos ou endêmicos, envolvidos na redução do sulfato, corroborando os resultados observados por Taketani et al. (2010b).

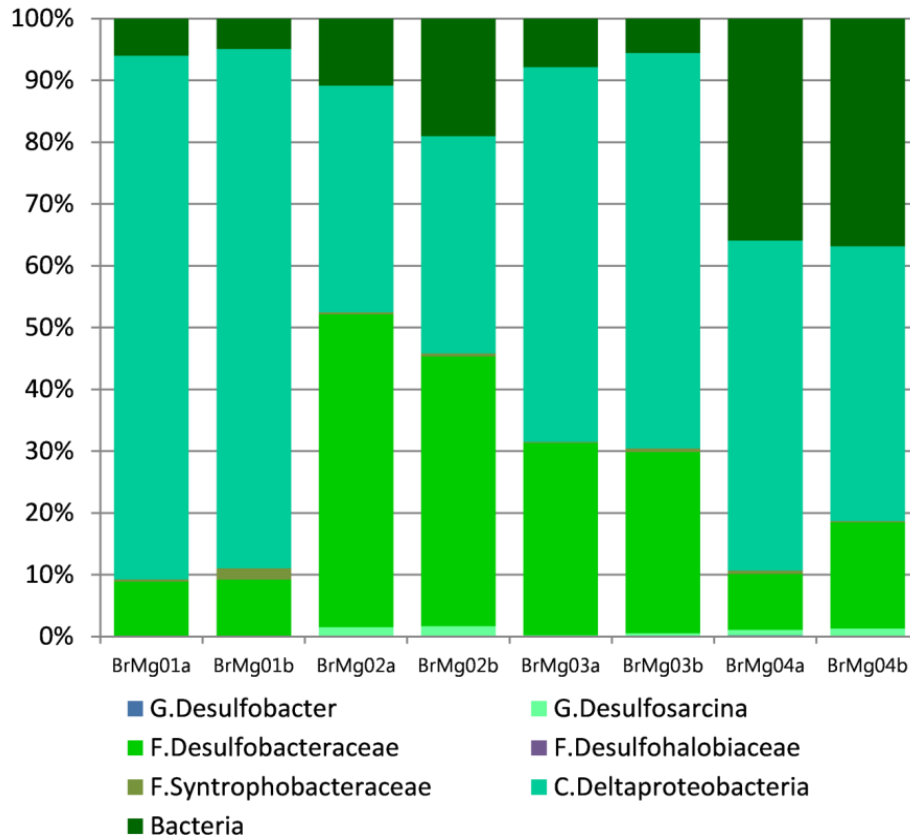


Figura 3.7 - Frequência dos diferentes grupos acessados, usando pirosequenciamento, com base no gene funcional *dsrB*, em manguezais do estado de São Paulo

As frequências dos grupos acessados pela identidade do gene *dsrB* mostraram que, em todos os manguezais, a classe Deltaproteobacteria foi a mais abundante (84,1%), com a maior e a menor frequência em BrMg01 (94,5%) e BrMg04 (63,5%), respectivamente. Além desta classe, apenas sequências afiliadas a bactérias não classificadas foram observadas. Dentro da classe Deltaproteobacteria destacaram-se as famílias Desulfobacteraceae (24,9%) e Syntrophobacteraceae (0,6%). Desulfobacteraceae foi mais abundante em BrMg02 (46,9%), seguida de BrMg03 (30,1%). Em alguns trabalhos é reportado que membros desta família têm um importante papel na degradação de benzeno (MUSAT; WIDDEL, 2008; OKA et al., 2008), o que poderia indicar que o aumento na frequência de tal grupo neste manguezal (BrMg02) pode estar relacionado com a sua importância na degradação dos contaminantes ali presentes. Dentro da família Desulfobacteraceae foram encontrados, embora em baixas porcentagens, os gêneros *Desulfosarcina* (0,75%) e *Desulfobacter* (0,05%). A detecção de

Desulfobacteracea como o grupo mais abundante confirma outros trabalhos em manguezais (naturais e contaminados), em que as SRB são um grupo frequente (ANDREOTE et al., 2012; TAKETANI et al., 2009), especialmente pelo favorecimento de seu metabolismo devido ao ambiente altamente redutor, ótimo para a ocorrência de organismos relacionados à redução de sulfato e metanogênicos (TAKETANI et al., 2010b).

Estas condições podem favorecer também as arqueias redutoras de sulfato. No entanto, não foi verificada a presença delas, nem com pirosequenciamento do gene ribossomal 16S DNAr nem com o gene funcional *dsrB*. Isto pode estar ligado ao fato de tais organismos terem a característica hipertermófila (LIU; BEER; WHITMAN, 2012), o que limitaria seu crescimento em manguezais ou às estratégias metodológicas que não têm conseguido detectá-las (MENDES et al., 2012; PIRES et al., 2012; TAKETANI et al., 2010b). De qualquer maneira, os resultados aqui apresentados dão base para afirmar que o processo de redução de sulfato é, predominantemente, realizado por bactérias nos sedimentos estudados.

3.3.8 Análises de GeoChip

O GeoChip é uma das tecnologias de análise independente de cultivo, recentemente com ampla aplicação no estudos de diferentes ambientes ao redor do mundo (CHAN, 2013; ZHANG et al., 2012; ZHOU et al., 2010), onde é empregada como ferramenta para analisar e monitorar a funcionalidade dos ecossistemas (HE et al., 2010).

A detecção das funções da comunidade microbiana nos manguezais com diferentes tipos de intervenção foi acessada utilizando-se o GeoChip (Tabela 3.6), sendo tal análise realizada num trabalho de doutorado prévio dentro de nosso grupo de colaboradores (LIMA, 2012). De maneira geral, foi detectada uma média de 16,544 genes pertencentes a 13 categorias. Comparando-se entre funções, foi observado que BrMg02, seguido de BrMg01, foi o ambiente com o maior número de genes detectados, em especial envolvidos nos processos de degradação de compostos orgânicos, respostas ao estresse, ciclo de carbono e resistência a metais. BrMg03 e BrMg04 apresentaram frequências menores e muito similares entre os genes detectados.

Tabela 3.6 – Número de sondas com hibridização positiva dos diferentes processos e ambientes analisados

	BrMg01	BrMg02	BrMg03	BrMg04
Ciclo do carbono	1815	2626	1596	1532
Ciclo de enxofre	598	928	520	504
Ciclo do fosforo	215	312	201	197
Ciclo do nitrogênio	1232	1782	1064	1010
Degradação de compostos orgânicos	3654	5279	3109	2868
Estresse	3157	4438	2775	2591
Genes de Bacteriófagos	83	115	78	75
Marcador Filogenético <i>gyrB</i>	284	426	253	238
Processos energéticos	212	201	137	138
Resistência a antibióticos	563	805	498	481
Resistência a metais	1780	2552	1563	1468
Virulência	594	815	540	520
Outros	1800	2677	1625	1638
	15.987	22.962	13.965	13.264

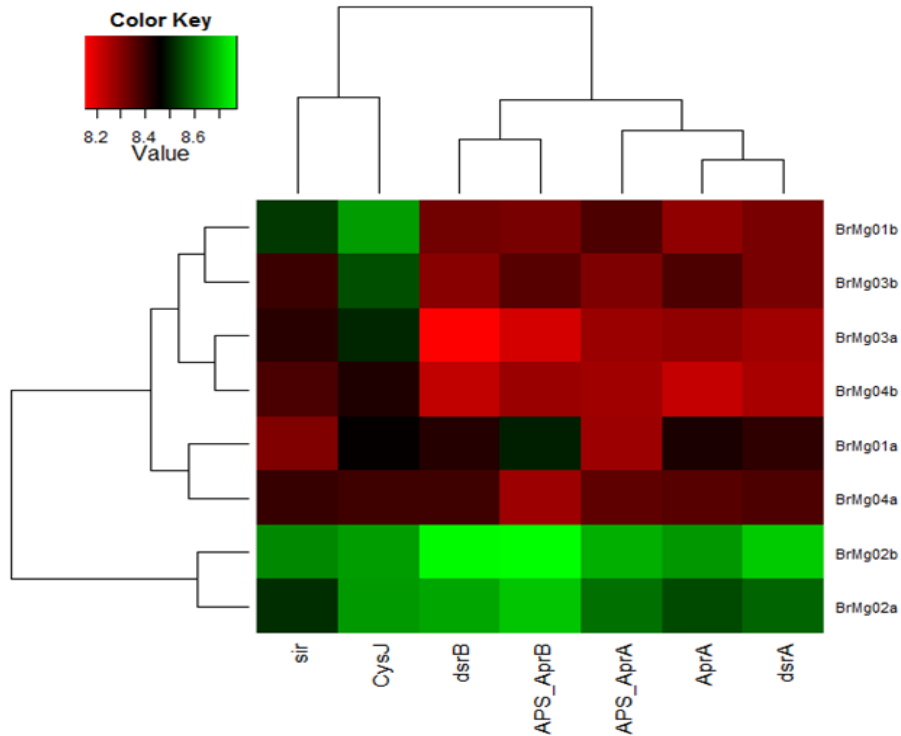
Neste trabalho, dentre os processos funcionais estudados por meio do GeoChip, foi escolhido o ciclo do enxofre, do qual foram selecionados os genes envolvidos com a redução e a oxidação dos componentes que envolvem tal elemento. As enzimas codificadas pelos genes estudados são consideradas como importantes nas diferentes etapas do ciclo do enxofre (Figura 1.1, Figura S3.3), e a verificação dos grupos microbianos que possuem tais genes no ambiente estudado permite ter uma idéia dos grupos realizadores de tais processos nos manguezais estudados. Bai et al. (2012), usando GeoChip, avaliaram o sedimento de cinco manguezais com diferenças em sua vegetação, encontrando quase todas as categorias do GeoChip. Quando focado o ciclo do enxofre, estes autores encontraram uma maior abundância de genes relacionados com a redução de sulfito (*dsrAB*), seguido da oxidação do sulfito (*sox*) e a redução de APS (*aprAB*), concluindo que a os processos de redução e oxidação variam com a vegetação presente em cada manguezal.

Inicialmente, foram construídos dendrogramas de distância euclidiana entre os manguezais, com suas respectivas repetições (Figura 3.8).

Em ambos os dendrogramas, feitos com base nos dados de genes relacionados aos processos de oxidação e redução do enxofre, foi observado um agrupamento diferenciado das amostras da área BrMg02, sendo as duas repetições bastante similares, e distintas das demais. Em relação às outras áreas (BrMg01, BrMg03 e BrMg04), os perfis de GeoChip obtidos não foram capazes de distinguir as áreas, indicando uma presença similar de tais genes e suas frequências nas áreas estudadas. Isto é um forte indicativo de que a ciclagem do enxofre, aqui

representada pelos genes relacionados aos processos de oxidação e redução de tal elemento, respondem à alta contaminação de petróleo em sedimentos de manguezais (diferenciação da área BrMg02) de forma mais clara do que outras intervenções antrópicas.

a)



b)

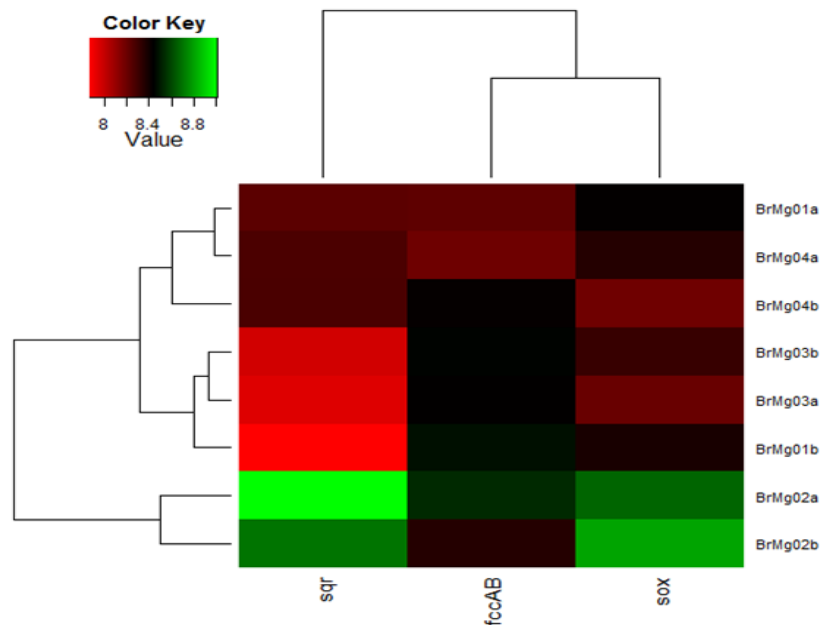


Figura 3.8 - Dendrograma dos genes relacionados com a redução (a) e a oxidação (b) do ciclo do enxofre, em manguezais com diferentes estados de intervenção

Os genes envolvidos com a redução, *dsrAB*, *APS_AprAB* e *aprA*, tiveram uma abundância maior em BrMg02 (8,6), quando comparado com o valor médio das demais áreas

(BrMg01, BrMg03 e BrMg04) (8,3). Os genes *cysJ* e *sir* não tiveram diferença significativa entre os manguezais. Em relação às funções de tais genes, sabe-se que os genes *dsrAB* (MUYZER; STAMS, 2008) e *sir* (CRANE; GETZOFF, 1996) codificam a enzima sulfito redutase, que catalisa a redução de sulfito a sulfeto presente em condições anaeróbias; *aprAB* (GREIN et al., 2013; MEYER; KUEVER, 2007), codifica para a enzima APS redutase, a qual catalisa a redução de APS para sulfito em condições anaeróbias, ou de sulfito para APS em condições aeróbias, e o gene *cysJ* (FORQUIN et al., 2011) codifica para a enzima que catalisa a redução assimilativa de sulfito para sulfeto.

Dos genes envolvidos com a oxidação no ciclo do enxofre, o *sqr* foi o mais abundante, apresentando um maior valor em BrMg02 (8,9), comparado com o valor médio de BrMg01, BrMg03 e BrMg04 (8,1). Os outros genes (*sox* e *fccAB*) apresentaram valores similares entre os manguezais. O gene *sqr* (que codifica para a sulfeto quinona redutase) e o *fccAB* (codificante da flavocitocromo c sulfeto desidrogenase) participam da oxidação de sulfeto para enxofre elementar e estão presentes, principalmente, em bactérias púrpuras e verdes sulfurosas (STEWART et al., 2011). Já o complexo codificado pelos genes *sox* (STEWART et al., 2011; YAMAMOTO; TAKAI, 2011) realiza a oxidação de sulfito para sulfato.

Estes resultados indicam que os genes relacionados com a redução do sulfato (RS) e a oxidação do sulfeto foram mais abundantes em BrMg02, que pode ser explicado pelo fato de o sulfeto ser um dos produtos finais da RS (OTERO et al., 2009; YUCEL et al., 2010). Assim quanto maior a RS, maior será a geração de sulfeto e dos grupos microbianos relacionados com estes processos. O sulfeto gerado pode ser reoxidado ou precipitado na presença de formas reativas de ferro como sulfeto de ferro (FeS) ou ferro pirítico (FeS₂), o qual foi corroborado pelos altos valores de FeS₂ encontrados nas análises físico-químicas deste manguezal.

As enzimas codificadas pelos genes estudados são consideradas importantes nas diferentes etapas do ciclo do enxofre (Figura 1.1, Figura S 3.3) e a verificação dos grupos microbianos que têm tais genes no ambiente estudado permite ter uma idéia dos grupos realizadores de tais processos nos manguezais estudados. BAI et al. (2012), usando GeoChip, avaliaram o sedimento de cinco manguezais com diferenças em sua vegetação, encontrando quase todas as categorias do GeoChip. Quando focado o ciclo do enxofre, estes autores encontraram maior abundância de genes relacionados com a redução de sulfito (*dsrAB*), seguida da oxidação do sulfito (*sox*) e a redução de APS (*aprAB*), concluindo que os processos de redução e oxidação variam com a vegetação presente em cada manguezal.

Uma análise adicional do presente trabalho contemplou a identidade dos genes envolvidos na redução e na oxidação do ciclo do enxofre obtidos do GeoChip (Figura 3.9). O agrupamento foi feito utilizando-se os dados de afiliação dos genes com sinais positivos no GeoChip, revelando a formação de dois grandes grupos, um do manguezal com alta contaminação de petróleo (BrMg02) e outro dos manguezais com baixa contaminação (BrMg01 e BrMg03) e sem intervenção (BrMg04).

Os resultados obtidos revelaram que quase todos os genes tiveram grupos compartilhados entre as duas áreas de manguezais (Figura 3.9a). Os genes *dsrAB* e *aprAB* evidenciaram que a classe mais dominante foi Deltaproteobacteria, com as ordens Desulfovibrionales e Desulfobacterales. Da mesma maneira, utilizando-se estes dois genes, foram detectados o grupo de arqueias redutoras de sulfito/sulfato, pertencentes ao gênero *Pyrobaculum* (Euryarchaeota) e o gênero *Archeoglobus* (Crenarchaeota). Esta é a primeira evidência da presença de arqueias redutoras de sulfato em manguezais.

A detecção deste grupo de arqueias só com GeoChip evidencia a importância do emprego de diferentes estratégias metodológicas, já que, embora cada ferramenta permita obter uma boa informação, existem deficiências que só podem ser superadas com a complementariedade das metodologias (BOHORQUEZ et al., 2012). Dessa maneira, o pirosequenciamento permite ter uma boa profundidade na cobertura dos dados, além de permitir a detecção de novas sequências, mas, em contrapartida, é susceptível a erros de amostragem, detectando, principalmente, os grupos dominantes (DESANTIS et al., 2007). Já o GeoChip é melhor na detecção de grupos relacionados aos genes funcionais, aos pouco abundantes ou aos que possuem menos representantes nas bases de dados (HE et al., 2010).

A maioria dos grupos detectados com o gene *SIR* pertence à classe Gammaproteobacteria e ao filo Cianobactéria. Já o gene *CysJ* indicou uma alta frequência de grupos de Gammaproteobacteria e Actinobacteria. A presença de cianobactérias nesses ambientes já tem sido reportada, sendo este grupo importante em promover a produtividade do ambiente por meio da fixação de nitrogênio e da fotossíntese (RIGONATO et al., 2013).

No processo de oxidação (Figura 3.9b), a afiliação dos genes *aprAB* (reação reversa) e *rdsrB* com sinais positivos, destaca a predominância das classes Gammaproteobacteria e Betaproteobacteria. Tais genes codificam para a reação reversa de sulfeto/enxofre a sulfato (HIPPEL et al., 1997; LOY et al., 2009). Usando o gene *Sox*, os grupos detectados foram Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria e Alphaproteobacteria, enquanto a afiliação dos

genes *fccAB* permitiu encontrar as classes Betaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Deinococci.

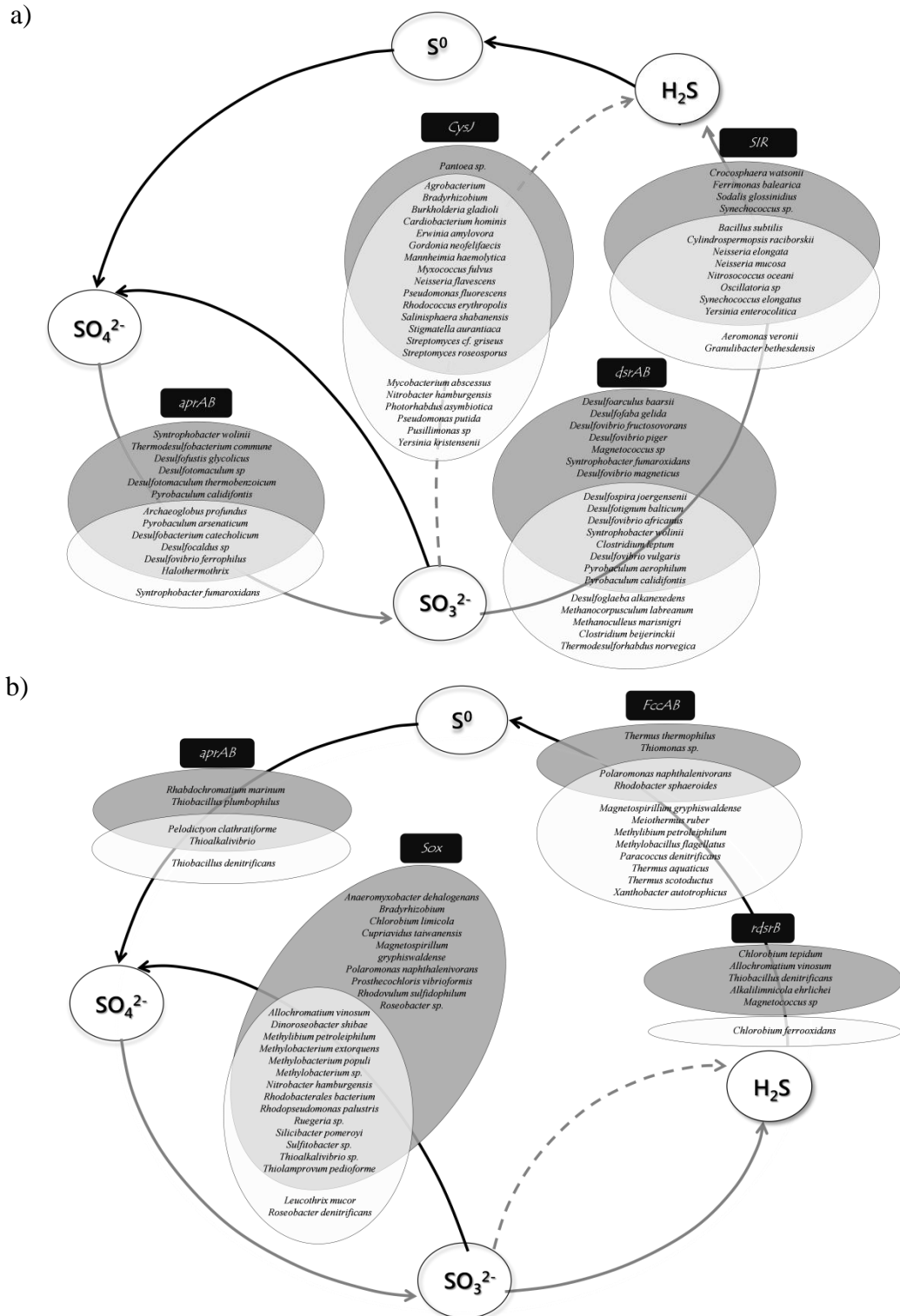


Figura 3.9 – Diagrama mostrando os genes funcionais e as espécies envolvidas nas etapas de redução (a) e oxidação (b) do ciclo do enxofre em ambientes de manguezais. Os ovais cinzas correspondem às espécies presentes no grupo de manguezal com maior contaminação (BrMg02) e os brancos, aos manguezais com baixa (BrMg01 e BrMg03) ou sem contaminação (BrMg04)

A ocorrência de grupos comuns em todos os manguezais indica que parte da microbiota envolvida na transformação do enxofre é mantida, mesmo em condições de alterações nas condições do ambiente por meio de contaminações. Este grupo parece ser composto por Deltaproteobacterias (ordens Desulfovibrionales e Desulfobacterales), no processo de redução de sulfato e pelos grupos Gammaproteobacteria e Betaproteobacteria, para o processo de oxidação. Contrariamente, existem grupos que são sensíveis à contaminação por petróleo, como Alphaproteobacteria, que não são mais detectados em tais áreas, no processo de redução de sulfato para sulfeto (gene *SIR*) e Bacteroidetes na oxidação de sulfeto para sulfato (gene *Sox*). Por fim, existem grupos que encontraram condições favoráveis em áreas altamente impactadas, como Thermodesulfobacteria, na redução de sulfato para sulfeto (gene *aprAB*) e Bacteroidetes, na oxidação de sulfeto para sulfato (gene *Sox*), e Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria e Alphaproteobacteria, na oxidação de sulfeto para enxofre elementar (gene *rdsrAB*).

A dominância de espécies da classe Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria nesta análise coincide com os resultados encontrados utilizando-se pirosequenciamento do gene ribossomal 16S DNAr e pirosequenciamento do gene *dsrB*, além de corroborar outros estudos feitos em manguezais (ANDREOTE et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2011), confirmando, assim, que estes grupos têm papel fundamental na ciclagem dos elementos, sendo o do ciclo do enxofre predominante e essencial na manutenção desses ecossistemas.

3.4 Considerações finais

Neste capítulo foi possível acessar a estrutura e a diversidade de arqueias e bactérias, e destacar a ocorrência dos grupos de procariotos redutores do sulfato em quatro manguezais com diferentes estados de intervenção. Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- a abundância das arqueias, bactérias e SRB é favorecida pela contaminação com petróleo;
- os filos Euryarcheota e Crenarcheota são os grupos de arqueias mais frequentes em manguezais;
- as classes Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria são os grupos de bactérias mais abundantes nos sedimentos de manguezais avaliados;

- a contaminação favorece o processo de adaptação na estruturação das comunidades microbianas e o número de interações negativas entre os organismos;
- a redução do sulfato em manguezais é predominantemente feito por bactérias afiliadas à Deltaproteobacteria, apesar de não ser um processo exclusivo;
- ocorrem nas áreas estudadas grupos diferenciais realizando as transformações de enxofre, o que indica que a contaminação pode alterar parte da composição da microbiota residente no ambiente explorado.

Referências

ACINAS, S.G.; SARMA-RUPAVTARM, R.; KLEPAC-CERAJ, V.; POLZ, M.F. PCR-induced sequence artifacts and bias: Insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 12, p. 8966-8969, 2005.

ANDRADE, L.L.; LEITE, D.; FERREIRA, E.; FERREIRA, L.; PAULA, G.R.; MAGUIRE, M.; HUBERT, C.; PEIXOTO, R.; DOMINGUES, R.; ROSADO, A. Microbial diversity and anaerobic hydrocarbon degradation potential in an oil-contaminated mangrove sediment. **BMC Microbiology**, London, v. 12, n. 1, p. 186, 2012.

ANDREOTE, F.D.; JIMENEZ, D.J.; CHAVES, D.; DIAS, A.C.F.; LUVIZOTTO, D.M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELLA, C.C.; LOPEZ, M.V.; BAENA, S.; TAKETANI, R.G.; DE MELO, I.S. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 6, p. 1-14, 2012.

BAI, S.; LI, J.; HE, Z.; VAN NOSTRAND, J.D.; TIAN, Y.; LIN, G.; ZHOU, J.; ZHENG, T. GeoChip-based analysis of the functional gene diversity and metabolic potential of soil microbial communities of mangroves. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 97, n. 15, p. 7035 - 7048, 2012.

BARBERAN, A.; BATES, S.T.; CASAMAYOR, E.O.; FIERER, N. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. **ISME Journal**, London, v. 6, n. 2, p. 343-351, 2012.

BAROTT, K.L.; RODRIGUEZ-BRITO, B.; JANOUSKOVEC, J.; MARHAVER, K.L.; SMITH, J.E.; KEELING, P.; ROHWER, F.L. Microbial diversity associated with four functional groups of benthic reef algae and the reef-building coral *Montastraea annularis*. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 13, n. 5, p. 1192-1204, 2011.

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

BASTIAN, M.; HEYMANN, S. Gephi: an open source software for exploring and manipulating networks. In: INTERNATIONAL ICWSM CONFERENCE, 3., 2009, Paris. **Proceedings...** p. 361-362.

BOETIUS, A.; RAVENSCHLAG, K.; SCHUBERT, C.J.; RICKERT, D.; WIDDEL, F.; GIESEKE, A.; AMANN, R.; JORGENSEN, B.B.; WITTE, U.; PFANNKUCHE, O. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. **Nature**, London, v. 407, n. 6804, p. 623-626, 2000.

BOHORQUEZ, L.C.; DELGADO-SERRANO, L.; LOPEZ, G.; OSORIO-FORERO, C.; KLEPAC-CERAJ, V.; KOLTER, R.; JUNCA, H.; BAENA, S.; ZAMBRANO, M.M. In-depth characterization via complementing culture-independent approaches of the microbial community in an acidic hot spring of the Colombian Andes. **Microbial Ecology**, New York, v. 63, n. 1, p. 103-115, 2012.

BROCHIER-ARMANET, C.; FORTERRE, P.; GRIBALDO, S. Phylogeny and evolution of the Archaea: one hundred genomes later. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 14, n. 3, p. 274-281, 2011.

CAPORASO, J.G.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; DESANTIS, T.Z.; ANDERSEN, G.L.; KNIGHT, R. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 266-267, 2010.

CARDENAS, E.; TIEDJE, J.M. New tools for discovering and characterizing microbial diversity. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 19, n. 6, p. 544-549, 2008.

CHAN, Y.; VAN NOSTRAND, J.D.; ZHOU, J.; POINTING, S.B.; FARRELL, R.L. Functional ecology of an Antarctic Dry Valley. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, p. 8990-8995, 2013.

CHAO, A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, Stockholm, v. 11, p. 265-270, 1984.

CHAO, A.; LEE, S.-M. Estimating the number of classes via sample coverage. **American Statistical Association**, New York, v. 87, p. 210-217, 1992.

CLARK, M.W.; MCCONCHIE, D.; LEWIS, D.W.; SAENGER, P. Redox stratification and heavy metal partitioning in Avicennia-dominated mangrove sediments: a geochemical model. **Chemical Geology**, Amsterdam, v. 149, n. 3/4, p. 147-171, 1998.

CLEARY, D.F.; SMALLA, K.; MENDONCA-HAGLER, L.C.; GOMES, N.C. Assessment of variation in bacterial composition among microhabitats in a mangrove environment using DGGE fingerprints and barcoded pyrosequencing. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. e29380, 2012.

CRANE, B.R.; GETZOFF, E.D. The relationship between structure and function for the sulfite reductases. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 6, p. 744-756, 1996.

CRUZ, C.C.; MENDOZA, U.N.; QUEIROZ, J.B.; BERRÊDO, J.F.; COSTA NETO, S.V.; LARA, R.J. Distribution of mangrove vegetation along inundation, phosphorus, and salinity gradients on the Bragança Peninsula in Northern Brazil. **Plant and Soil**, The Hague, p. 1-14, 2013. DOI: 10.1007/s11104-013-1619-y.

- DESANTIS, T.Z.; BRODIE, E.L.; MOBERG, J.P.; ZUBIETA, I.X.; PICENO, Y.M.; ANDERSEN, G.L. High-density universal 16S rRNA microarray analysis reveals broader diversity than typical clone library when sampling the environment. **Microbial Ecology**, New York, v. 53, n. 3, p. 371-383, 2007.
- DIAS, A.C.; ANDREOTE, F.D.; RIGONATO, J.; FIORE, M.F.; MELO, I.S.; ARAUJO, W.L. The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 98, n. 4, p. 541-551, 2010.
- DIAS, A.C.; PEREIRA E SILVA, M.C.; COTTA, S.R.; DINI-ANDREOTE, F.; SOARES JR., F.L.; SALLES, J.F.; AZEVEDO, J.L.; VAN ELSAS, J.D.; ANDREOTE, F.D. Abundance and genetic diversity of nifH gene sequences in anthropogenically affected Brazilian mangrove sediments. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 22, p. 7960-7967, 2012.
- DIAS, A.C.F.; DINI-ANDREOTE, F.; TAKETANI, R.G.; TSAI, S.M.; AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S.; ANDREOTE, F.D. Archaeal communities in the sediments of three contrasting mangroves. **Journal of Soils and Sediments**, Landsberg, v. 11, n. 8, p. 1466-1476, 2011.
- DOS SANTOS, H.F.; CURY, J.C.; DO CARMO, F.L.; DOS SANTOS, A.L.; TIEDJE, J.; VAN ELSAS, J.D.; ROSADO, A.S.; PEIXOTO, R.S. Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 3, p. 1-8, 2011.
- DUBILIER, N.; MULDER, C.; FERDELMAN, T.; DE BEER, D.; PERNTHALER, A.; KLEIN, M.; WAGNER, M.; ERSEUS, C.; THIERMANN, F.; KRIEGER, J.; GIÈRE, O.; AMANN, R. Endosymbiotic sulphate-reducing and sulphide-oxidizing bacteria in an oligochaete worm. **Nature**, London, v. 411, n. 6835, p. 298-302, 2001.
- FASANELLA, C.C.; DIAS, A.C.F.; RIGONATO, J.; FÁTIMA FIORE, M.; SOARES, F.L.; MELO, I.S.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ELSAS, J.D.; ANDREOTE, F.D. The selection exerted by oil contamination on mangrove fungal communities. **Water, Air, & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 223, n. 7, p. 4233-4243, 2012.
- FAUST, K.; RAES, J. Microbial interactions: from networks to models. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 10, n. 8, p. 538-550, 2012.
- FERREIRA, T.O.; VIDAL-TORRADO, P.; OTERO, X.L.; MACÍAS, F. Are mangrove forest substrates sediments or soils? A case study in southeastern Brazil. **Catena**, Cremlingen, v. 70, n. 1, p. 79-91, 2007.
- FORQUIN, M.P.; HEBERT, A.; ROUX, A.; AUBERT, J.; PROUX, C.; HEILIER, J.F.; LANDAUD, S.; JUNOT, C.; BONNARME, P.; MARTIN-VERSTRAETE, I. Global regulation of the response to sulfur availability in the cheese-related bacterium *Brevibacterium aurantiacum*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 4, p. 1449-1459, 2011.

FOTI, M.; SOROKIN, D.Y.; LOMANS, B.; MUSSMAN, M.; ZACHAROVA, E.E.; PIMENOV, N.V.; KUENEN, J.G.; MUYZER, G. Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 7, p. 2093-2100, 2007.

GANTNER, S.; ANDERSSON, A.F.; ALONSO-SAEZ, L.; BERTILSSON, S. Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. **Journal Microbiol Methods**, Amsterdam, v. 84, n. 1, p. 12-18, 2011.

GEETS, J.; BORREMANS, B.; DIELS, L.; SPRINGAEL, D.; VANGRONSVELD, J.; VAN DER LELIE, D.; VANBROEKHOVEN, K. DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 194-205, 2006.

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

GIRI, C.; OCHIENG, E.; TIESZEN, L.L.; ZHU, Z.; SINGH, A.; LOVELAND, T.; MASEK, J.; DUKE, N. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. **Global Ecology and Biogeography**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 154-159, 2011.

GOECKS, J.; NEKRUTENKO, A.; TAYLOR, J. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. **Genome Biology**, London, v. 11, n. 8, p. R86, 2010.

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

GUPTA, R.S.; SHAMI, A. Molecular signatures for the Crenarchaeota and the Thaumarchaeota. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 99, n. 2, p. 133-157, 2011.

HAMBRICK, G.A.I.; DELAUNE, R.D.; PATRICK Jr, W.H. Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbon degradation. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 40, n. 2, p. 365-369, 1980.

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

HE, Z.; DENG, Y.; VAN NOSTRAND, J.D.; TU, Q.; XU, M.; HEMME, C.L.; LI, X.; WU, L.; GENTRY, T.J.; YIN, Y.; LIEBICH, J.; HAZEN, T.C.; ZHOU, J. GeoChip 3.0 as a high-throughput tool for analyzing microbial community composition, structure and functional activity. **ISME Journal**, London, v. 4, n. 9, p. 1167-1179, 2010.

HIPP, W.M.; POTT, A.S.; THUMSCHMITZ, N.; FAATH, I.; DAHL, C.; TRUPER, H.G. Towards the phylogeny of APS reductases and sirohaem sulfite reductases in sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes. **Microbiology**, London, v. 143, p. 2891-2902, 1997.

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, n. 4, p. 265-278, 2001.

IKENAGA, M.; GUEVARA, R.; DEAN, A.L.; PISANI, C.; BOYER, J.N. Changes in community structure of sediment bacteria along the Florida coastal everglades marsh-mangrove-seagrass salinity gradient. **Microbial Ecology**, New York, v. 59, n. 2, p. 284-295, 2010.

JØRGENSEN, B.B. The sulfur cycle of a coastal marine sediment (Limfjorden, Denmark). **Limnology and Oceanography**, Texas, v. 22, p. 814-834, 1982.

KANAGAWA, T. Bias and artifacts in multitemplate Polymerase Chain Reactions (PCR). **Journal of bioscience and bioengineering**, Osaka, v. 96, n. 4, p. 317-323, 2003.

KIM, B.-S.; OH, M.-H.; KANG, H.; CHUN, J. Archaeal diversity in tidal flat sediment as revealed by 16S rDNA analysis. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 43, n. 2, p. 144-151, 2005.

KOSTKA, J.E.; PRAKASH, O.; OVERHOLT, W.A.; GREEN, S.J.; FREYER, G.; CANION, A.; DELGARDIO, J.; NORTON, N.; HAZEN, T.C.; HUETTEL, M. Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in gulf of Mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 22, p. 7962-7974, 2011.

LEGG, T.M.; ZHENG, Y.; SIMONE, B.; RADLOFF, K.A.; MLADENOV, N.; GONZALEZ, A.; KNIGHTS, D.; SIU, H.C.; RAHMAN, M.M.; AHMED, K.M.; MCKNIGHT, D.M.; NEMERGUT, D.R. Carbon, metals, and grain size correlate with bacterial community structure in sediments of a high arsenic aquifer. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, p. 82, 2012.

LIANG, J.-B.; CHEN, Y.-Q.; LAN, C.-Y.; TAM, N.F.Y.; ZAN, Q.-J.; HUANG, L.-N. Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment. **Marine Biology**, Leibniz, v. 150, n. 5, p. 739-747, 2006.

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

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

LOY, A.; DULLER, S.; BARANYI, C.; MUSSMANN, M.; OTT, J.; SHARON, I.; BEJA, O.; LE PASLIER, D.; DAHL, C.; WAGNER, M. Reverse dissimilatory sulfite reductase as phylogenetic marker for a subgroup of sulfur-oxidizing prokaryotes. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 11, n. 2, p. 289-299, 2009.

LYIMO, T.J.; ARJAN, P.; OP DEN CAMP, H.J.M. Methane emission, sulphide concentration and redox potential profiles in mtoni mangrove sediment, Tanzania. **Western Indian Ocean Journal of Marine Science**, Zanzibar, v. 1, n. 1, p. 71-80, 2002.

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

LYIMO, T.J.; POL, A.; HARHANGI, H.R.; JETTEN, M.S.; OP DEN CAMP, H.J. Anaerobic oxidation of dimethylsulfide and methanethiol in mangrove sediments is dominated by sulfate-reducing bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 70, n. 3, p. 483-492, 2009.

MAO, Y.; YANNARELL, A.C.; MACKIE, R.I. Changes in N-transforming archaea and bacteria in soil during the establishment of bioenergy crops. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 9, p. e24750, 2011.

MARTINS, C.C.; BCEGO, M.C.; TANIGUCHI, S.; MONTONE, R.C. Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments in Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Antarctic Science**, Oxford, v. 16, n. 2, p. 117-122, 2004.

MCKEE, K.L. Soil physicochemical patterns and mangrove species distribution - reciprocal effects? **Journal of Ecology**, Oxford, v. 81, p. 477-487, 1993.

MEDLIN, L.; ELWOOD, H.J.; STICKEL, S.; SOGIN, L.M. The characterization of enzymatic amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. **Gene**, Amsterdam, v. 71, p. 491-499, 1988.

MENDES, L.W.; TAKETANI, R.G.; NAVARRETE, A.A.; TSAI, S.M. Shifts in phylogenetic diversity of archaeal communities in mangrove sediments at different sites and depths in southeastern Brazil. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 163, n. 5, p. 366-377, 2012.

MEYER, B.; KUEVER, J. Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes--origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. **Microbiology**, London, v. 153, n. 7, p. 2026-2044, 2007.

MIRALLES, G.; ACQUAVIVA, M.; BERTRAND, J.C.; CUNY, P. Response of an archaeal community from anoxic coastal marine sediments to experimental petroleum contamination. **Aquatic Microbial Ecology**, Oldenforf, v. 59, p. 25-31, 2010.

MUSAT, F.; WIDDEL, F. Anaerobic degradation of benzene by a marine sulfate-reducing enrichment culture, and cell hybridization of the dominant phylotype. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 10, n. 1, p. 10-19, 2008.

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

MUYZER, G.; 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 Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

NOBREGA, G.N.; FERREIRA, T.O.; ROMERO, R.E.; MARQUES, A.G.; OTERO, X.L. Iron and sulfur geochemistry in semi-arid mangrove soils (Ceara, Brazil) in relation to seasonal changes and shrimp farming effluents. **Environmental monitoring and assessment**, Dordrecht, v. 185, n. 9, p. 7393-7407, Jan. 2013.

OAKLEY, B.B.; CARBONERO, F.; DOWD, S.E.; HAWKINS, R.J.; PURDY, K.J. Contrasting patterns of niche partitioning between two anaerobic terminal oxidizers of organic matter. **ISME Journal**, London, v. 6, n. 5, p. 905-914, 2012.

OKA, A.R.; PHELPS, C.D.; MCGUINNESS, L.M.; MUMFORD, A.; YOUNG, L.Y.; KERKHOF, L.J. Identification of critical members in a sulfidogenic benzene-degrading consortium by DNA stable isotope probing. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 20, p. 6476-6480, 2008.

OTERO, X.L.; FERREIRA, T.O.; HUERTA-DÍAZ, M.A.; PARTITI, C.S.M.; SOUZA, V.; VIDAL-TORRADO, P.; MACÍAS, F. Geochemistry of iron and manganese in soils and sediments of a mangrove system, Island of Pai Matos (Cananeia — SP, Brazil). **Geoderma**, Amsterdam, v. 148, n. 3/4, p. 318-335, 2009.

ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAEE, L.F.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelenvanne, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16SrRNA. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 9, p. 3367-3373, 1997.

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

PEREZ-JIMENEZ, J.R.; KERKHOF, L.J. Phylogeography of sulfate-reducing bacteria among disturbed sediments, disclosed by analysis of the dissimilatory sulfite reductase genes (*dsrAB*). **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 2, p. 1004-1011, 2005.

PIRES, A.C.; CLEARY, D.F.; ALMEIDA, A.; CUNHA, A.; DEALTRY, S.; MENDONCA-HAGLER, L.C.; SMALLA, K.; GOMES, N.C. Denaturing gradient gel electrophoresis and barcoded pyrosequencing reveal unprecedented archaeal diversity in mangrove sediment and rhizosphere samples. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 16, p. 5520-5528, 2012.

PRADA-GAMERO, R.M.; VIDAL-TORRADO, P.; FERREIRA, T.O. Mineralogia e físico-química dos solos de mangue do Rio Iriri no canal de Bertiooga (Santos, SP). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 28, p. 233-243, 2004.

PROSSER, J.I.; BOHANNAN, B.J.; 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. The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 5, n. 5, p. 384-392, 2007.

QIAN, P.Y.; WANG, Y.; LEE, O.O.; LAU, S.C.; YANG, J.; LAFI, F.F.; AL-SUWAILEM, A.; WONG, T.Y. Vertical stratification of microbial communities in the Red Sea revealed by 16S rDNA pyrosequencing. **ISME Journal**, London, v. 5, n. 3, p. 507-518, 2011.

QUILLET, L.; BESAURY, L.; POPOVA, M.; PAISSE, S.; DELOFFRE, J.; OUDDANE, B. Abundance, diversity and activity of sulfate-reducing prokaryotes in heavy metal-contaminated sediment from a salt marsh in the Medway Estuary (UK). **Marine Biotechnology**, New York, v. 14, n. 3, p. 363-381, 2012.

RABUS, R.; HANSEN, T.A.; WIDDEL, F.; DWORKIN, M.; FALKOW, S.; FALKOW, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. **The prokaryotes: dissimilatory sulfate- and sulfur reducing prokaryotes**. 3rd ed. New York: Springer Verlag, 2006. 768 p.

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

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

RIGONATO, J.; KENT, A.D.; ALVARENGA, D.O.; ANDREOTE, F.D.; BEIRIGO, R.M.; VIDAL-TORRADO, P.; FIORE, M.F. Drivers of cyanobacterial diversity and community composition in mangrove soils in south-east Brazil. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 1103-1114, 2013.

ROLING, W.F.M.; COUTO DE BRITO, I.R.; SWANNELL, R.P.J.; HEAD, I.M. Response of archaeal communities in beach sediments to spilled oil and bioremediation. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 5, p. 2614-2620, 2004.

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

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRON-MOLERO, G.; ADAIME, R.R.; CAMARGO, T.M. Variability of mangrove ecosystems along the Brazilian Coast. **Estuaries**, Columbia, v. 13, p. 204-218, 1990.

STEWART, F.J.; DMYTRENKO, O.; DELONG, E.F.; CAVANAUGH, C.M. Metatranscriptomic analysis of sulfur oxidation genes in the endosymbiont of *solemya velum*. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 2, p. 134, 2011.

SUN, Y.; CAI, Y.; LIU, L.; YU, F.; FARRELL, M.L.; MCKENDREE, W.; FARMERIE, W. ESPRIT: estimating species richness using large collections of 16S rRNA pyrosequences. **Nucleic Acids Research**. Evaluation Studies, London, v. 37, n. 10, p. e76, 2009.

TAKETANI, R.G.; DOS SANTOS, H.F.; VAN ELSAS, J.D.; ROSADO, A.S. Characterisation of the effect of a simulated hydrocarbon spill on diazotrophs in mangrove sediment mesocosm. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 96, n. 3, p. 343-354, 2009.

TAKETANI, R.G.; FRANCO, N.O.; ROSADO, A.S.; VAN ELSAS, J.D. Microbial community response to a simulated hydrocarbon spill in mangrove sediments. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 48, n. 1, p. 7-15, 2010a.

TAKETANI, R.G.; YOSHIURA, C.A.; DIAS, A.C.; 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, 2010b.

WAGNER, M.; ROGER, A. J.; FLAX, J. L.; BRUSSEAU, G. A.; STAHL, D. A. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, n. 11, p. 2975-2982, 1998.

WU, L.; LIU, X.; SCHADT, C.W.; ZHOU, J. Microarray-based analysis of subnanogram quantities of microbial community DNAs by using whole-community genome amplification. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 72, n. 7, p. 4931-4941, 2006.

WU, M.; EISEN, J.A. A simple, fast, and accurate method of phylogenomic inference. **Genome Biology**, London, v. 9, n. 10, p. R151, 2008.

YAMAMOTO, M.; TAKAI, K. Sulfur metabolisms in epsilon- and gamma-proteobacteria in deep-sea hydrothermal fields. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 2, p. 192, 2011.

YAN, B.; HONG, K.; YU, Z.-N. Archaeal communities in mangrove soil characterized by 16S rRNA gene clones. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 44, n. 5, p. 566-571, 2006.

YUCEL, M.; KONOVALOV, S.K.; MOORE, T.S.; JANZEN, C.P.; LUTHER, G.W. Sulfur speciation in the upper Black Sea sediments. **Chemical Geology**, Amsterdam, v. 269, n. 3/4, p. 364-375, 2010.

ZHANG, H. Using pyrosequencing and quantitative PCR to analyze microbial communities. **Frontiers of Environmental Science & Engineering in China**, Beijing, v. 5, n. 1, p. 21-27, 2011.

ZHANG, Z.; ZHAO, X.; LIANG, Y.; LI, G.; ZHOU, J. Microbial functional genes reveal selection of microbial community by PAHs in polluted soils. **Environmental Chemistry Letters**, Secaucus, v. 11, n. 1, p. 11-17, 2012.

ZHOU, J.; DENG, Y.; LUO, F.; HE, Z.; TU, Q.; ZHI, X. Functional molecular ecological networks. **MBio**, Washington, v. 1, n. 4, p. 1-10, 2010.

Anexos

Tabela S.3.1 - Primers forward, reverse e Mid de identificação usados na PCR de pirosequenciamento para o gene 16S em arqueias e bactérias e do gene *dsrB* em BRS

Grupo microbiano / Primer		Sequência adaptadora	Mid	Sequência do primer
Arquéias	Reverso	ArcR	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGT	TACCGCGGCKGCTG
	Forward	ArcF	CGTATGCGCCTCCCTCGCGCATCAGA	CCCTACGGGGYGCASCAG
Bactérias	Reverso	820R-1 820R-2 820R-3 820R-4	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGT	TACCRGGGTHTCTAATCC TACCAGAGTATCTAATTC CTACDSRGGTMTCTAATC TACNVGGGTATCTAATCC
	Forward	520F	CGTATGCGCCTCCCTCGCGCATCAGA	BrMg01a ATGAGAGC BrMg01b CAGAGAGC BrMg02a ATCAGATC BrMg02b CTGAGCTG BrMg03a AGCATGAG BrMg03b CATCTCTG BrMg04a AGATCATC BrMg04b AGAGAGAG
BRS	Reverso	Dsr4R	Sequência adaptadora Lib-L-B CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG	GTGTAGCAGTTACCGCA
	Forward	Dsr2060f	Sequência adaptadora Lib-L A CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	BrMg01a AGAGAGAG BrMg01b ATGAGAGC BrMg02a CATCTCTG BrMg02b AGCATGAG BrMg03a CAGAGAGC BrMg03b ATCAGATC BrMg04a AGATCATC BrMg04b CTCAGCAG

Tabela S 3.2 – Correlação de Pearson entre os parâmetros físico-químicos dos quatro manguezais com diferentes tipos de intervenção

	areia	Ca	CTC	Eh	Enxofre	H+Al	K	Mg	MO	SB	silte	sulfato	sulfato/enxofre	umidade	V
areia	-0.76*	-0.93**
Ca	0.88**	0.73	0.88**	0.74*
CTC	-0.86**	0.93***	0.88**	1.00***	0.77*
Eh	-0.79*	-0.87**	-0.97***	-0.88**	-0.85**	-0.89**
Enxofre	0.75*	..
H+Al	0.72*
K	0.81*	0.93**
Mg	0.86**	0.94***	0.73*
MO	0.89**	0.78*	0.86**
SB	0.82*
silte
sulfato	0.78*	..
sulfato/enxofre
umidade
V

Nível de significância para a correlação de Pearson *P<0,05, **P<0,005, ***P<0,0005

Tabela S 3.3 - Comparação entre as plataformas do RDP e QIIME, para análises das sequências de arqueias (a) e bactérias (b) obtidas por pirosequenciamento

a)

Amostras	RDP (80% threshold)					QIIME (80% threshold)				
	Trimados	Archaea		Não-classificados		Trimados	Archaea		Não-classificados	
		Seq	%	Seq	%		Seq	%	Seq	%
BrMg01a	772	158	20,5	614	79,5	641	459	71,6	182	28,4
BrMg01b	862	161	18,7	701	81,3	724	529	73,1	195	26,9
BrMg02a	565	111	19,6	454	80,4	483	360	74,5	123	25,5
BrMg02b	480	96	20,0	384	80,0	390	299	76,7	91	23,3
BrMg03a	677	110	16,2	567	83,8	565	340	60,2	225	39,8
BrMg03b	565	101	17,9	464	82,1	483	333	68,9	150	31,1
BrMg04a	669	111	16,6	558	83,4	617	507	82,2	110	17,8
BrMg04b	411	93	22,6	318	77,4	352	287	81,5	65	18,5
	5001	941	18,8	4060	81,2	4255	3114	73,2	1141	26,8

b)

Amostras	RDP (80% threshold)						QIIME (80% threshold)							
	Trimadas	Não classificadas				Classificadas como Archaea		Trimadas	Não classificadas				Classificadas como Archaea	
		Bactéria seq	%	seq	%	seq	%		Bactéria seq	%	seq	%	seq	%
BrMg01a	4266	4253	99,7	2	0,05	11	0,258	4043	4027	99,6	4	0,099	12	0,297
BrMg01b	3764	3762	99,9	1	0,03	1	0,027	3553	3549	99,9	3	0,084	1	0,028
BrMg02a	5206	5175	99,4	11	0,21	20	0,384	5020	4985	99,3	15	0,299	20	0,398
BrMg02b	2505	2493	99,5	7	0,28	5	0,200	2346	2331	99,4	9	0,384	6	0,256
BrMg03a	5209	5202	99,9	4	0,08	3	0,058	4848	4841	99,9	4	0,083	3	0,062
BrMg03b	4814	4807	99,9	4	0,08	3	0,062	4501	4492	99,8	3	0,067	6	0,133
BrMg04a	4452	4431	99,5	5	0,11	16	0,359	4344	4322	99,5	4	0,092	18	0,414
BrMg04b	2443	2416	98,9	10	0,41	17	0,696	2292	2265	98,8	8	0,349	19	0,829
	32659	32539	99,6	44	0,135	76	0,23	30947	30812	99,56	50	0,16	85	0,27

Tabela S 3.4 - Análises de diversidade usando o pipeline do RDP

Grupo	Amostra	NS	OTUs	Chao 1	Shannon
Arquéias	BrMg01	1634	283	581 (470-757)	4,57(5,5-4,6)
	BrMg02	1045	269	485(405-612)	4,87(4,8-4,9)
	BrMg03	1242	237	380(323-474)	4,58(4,5-4,6)
	BrMg04	1080	260	464(387-587)	4,75(4,6-4,8)
	Total	5,001	1049		
Bactérias	BrMg01	8030	2240	4513(4188-4891)	6,68(6,64-6,71)
	BrMg02	7711	2441	5186(4806-5626)	6,95(6,92-6,99)
	BrMg03	10023	3390	7711(7202-8287)	7,33(7,30-7,36)
	BrMg04	6895	2572	5476(5090-5291)	7,19(7,16-7,23)
	Total	32,659	10,643		

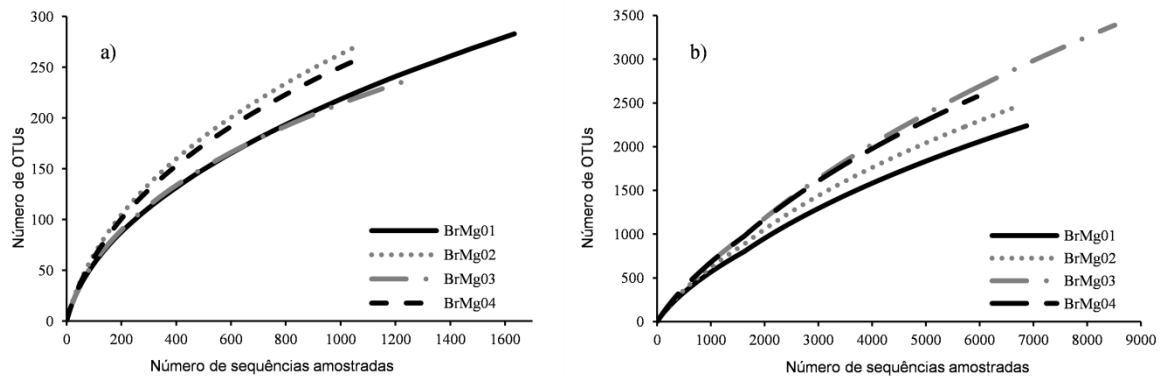


Figura S 3.1 - Curvas de rarefação usando os dados do RDP para arqueias (a) e bactérias (b) em manguezais com diferentes estados de intervenção

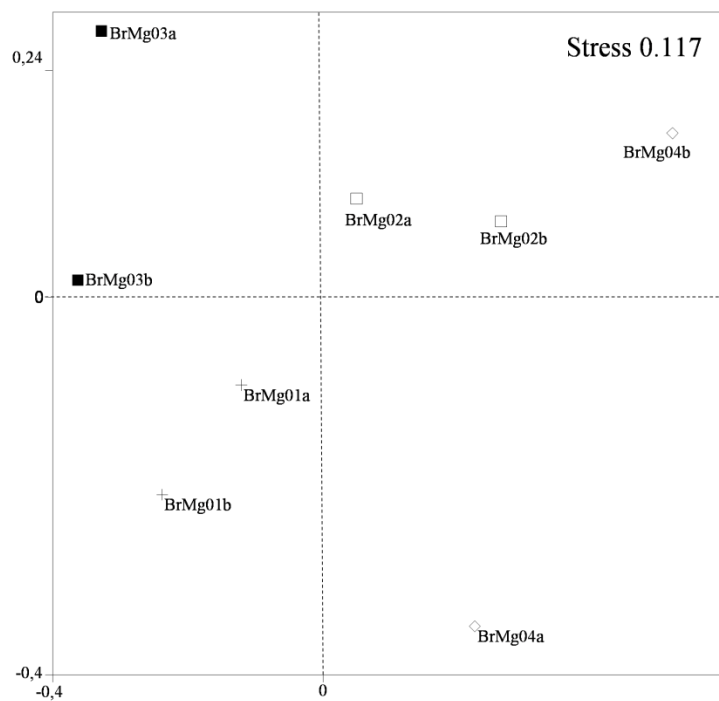


Figura S 3.2 – Análise de escala multidimensional (NMDS) dos OTUs de arqueias dos manguezais com diferentes estados de intervenção (BrMg01=com baixa e BrMg02= com alta contaminação de petróleo, BrMg03=contaminação antropogênica e BrMg04= sem contaminação)

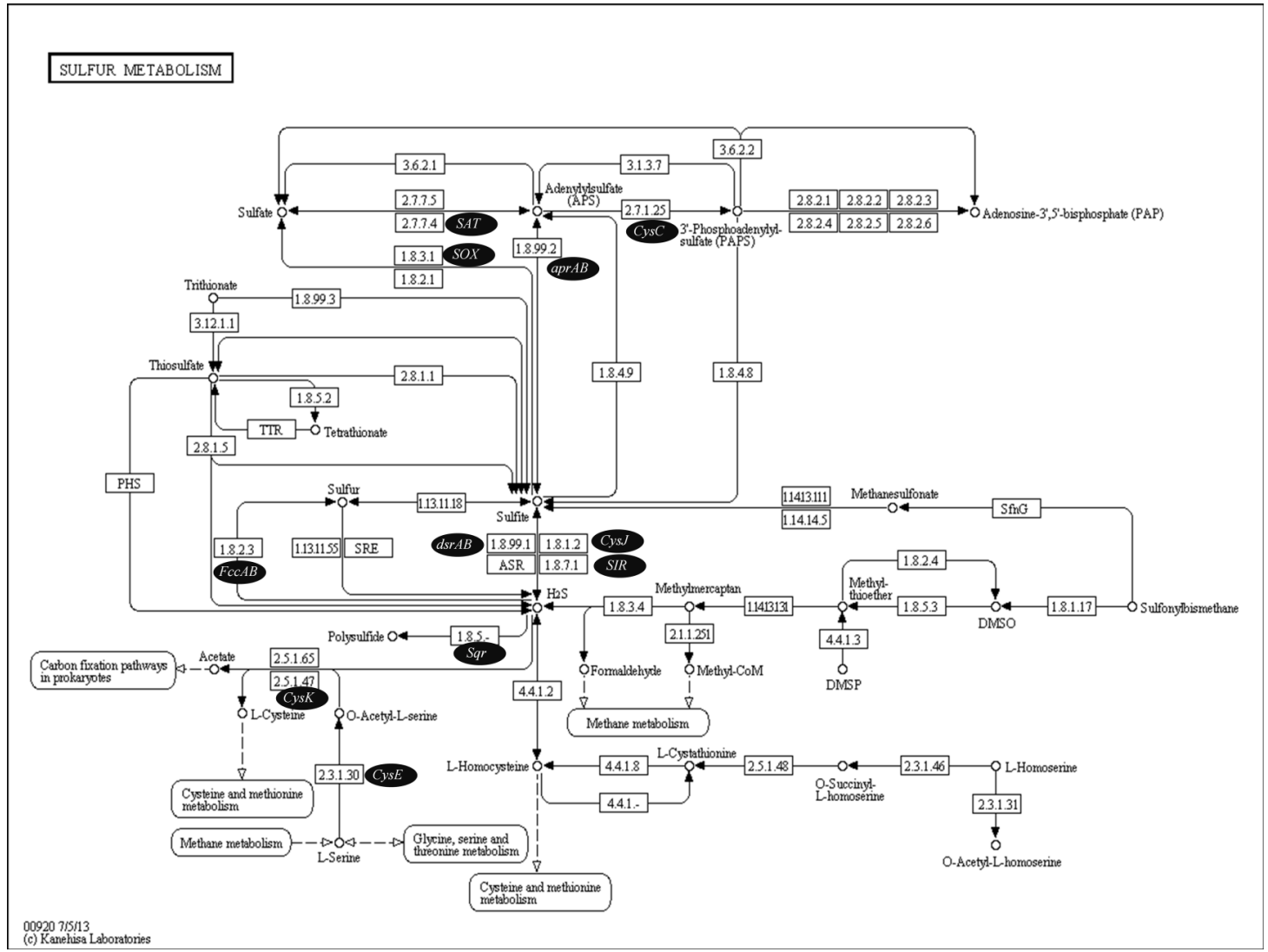


Figura S 3.3 – Mapa KEGG (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00920) do metabolismo do enxofre indicando os genes funcionais utilizando neste estudo (ovais pretos)