

RODRIGO GOUVÊA TAKETANI

RESPOSTA DA COMUNIDADE MICROBIANA AO
DISTÚRPIO POR HIDROCARBONETOS EM SEDIMENTOS
DE MANGUEZAIS

TESE DE DOUTORADO
APRESENTADA AO INSTITUTO DE
MICROBIOLOGIA PROF. PAULO DE
GÓES, VISANDO À OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
(MICROBIOLOGIA).

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF. PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Taketani, Rodrigo Gouvêa

**RESPOSTA DA COMUNIDADE MICROBIANA AO DISTÚRPIO POR
HIDROCARBONETOS EM MANGUEZAIS,**

Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/UFRJ, 2008.

ix. 112p.

Tese de Doutorado: Doutor em Ciências (Microbiologia)

1. diversidade bacteriana

2. Manguezais

3. ecologia microbiana

4. biblioteca de clones

5. DGGE

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro - Tese de doutorado

**II. RESPOSTA DA COMUNIDADE MICROBIANA AO DISTÚRPIO POR
HIDROCARBONETOS EM MANGUEZAIS**

TRABALHO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE
ECOLOGIA MICROBIANA MOLECULAR DO
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA GERAL DO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF. PAULO DE
GÓES E NO LABORATÓRIO DE ECOLOGIA
MICROBIANA DA UNIVERSIDADE DE GRONINGEN
SOB ORIENTAÇÃO DO PROF. DR. ALEXANDRE
SOARES ROSADO E PROF. DR. JAN DIRK VAN ELSAS

“FORWARD THE LIGHT BRIGADE!
WAS THERE A MAN DISMAYED?
NOT THOUGH THE SOLDIERS KNEW
SOME ONE HAD BLUNDERED:
THEIRS NOT TO MAKE REPLY,
THEIRS NOT TO REASON WHY,
THEIRS BUT TO DO AND DIE:
INTO THE VALLEY OF DEATH
RODE THE SIX HUNGRED.”
LORDE ALFRED TENNYSON

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer aos meus dois orientadores, Alexandre e Dick pelo apoio, estímulo, confiança e orientação imprescindíveis na execução deste trabalho.

Em segundo lugar, obviamente, ao CNPq pela bolsa de doutorado e pela taxa de bancada. A CAPES através do programa de PDEE que possibilitou minha ida aos Países Baixos onde (entre outras coisas) boa parte deste trabalho foi realizada.

E principalmente a minha família, que de alguma maneira incutiu em minha cabeça o espírito questionador e não conformista necessário para estar a todo tempo querendo buscar novas respostas ao que me é perguntado e perguntar algo ao que me é respondido. Como diriam meus pais “porque sim não é resposta”. Obrigado!

A Natália pelo carinho, apoio e críticas sempre na hora certa. Por suportar minhas discussões inúteis e algumas vezes úteis por horas a fio mesmo que a contra gosto. Por me estimular a buscar sempre algo mais e arriscar, pois, como me disse certa vez o Dick, “grandes riscos podem trazer grandes conquistas”.

Meus grandes amigos Caio, Claudia, Erick, Fabio, Leo, Marcel, Rob, Rod e Sylvia, que embora hoje nos encontremos menos que eu gostaria estão sempre lá (nem que seja on-line).

Aos meus amigos e vizinhos do Kornoeljestraat 2N, que, embora nunca irão ler esta tese foram parte dela, Wouter, Sandra, Claudia, Antonja e em especial Milan pela companhia e amizade de cozinha.

Aos meus amigos de Wageningen-Pira (e companheiros de viagens), Veia, Chico, Paula e Fernando pela companhia e apoio nos momentos que precisei mais nessa temporada transoceânica. E em especial ao Fernando pelo intercâmbio de idéias e experiências. Ah! não posso esquecer o Ulisses, certo?

Ao pessoal do LEMM que de alguma maneira tiveram alguma participação nesse trabalho. Dos quais agradeço em especial à (caríssima amiga) Claudia que muito me ajudou no desenho do meu trabalho e no projeto do mesocosmo (que também lhe deu MUITA dor de cabeça), à Natália e Henrique que foram as babás dos mesocosmos na minha ausência, e ao Tom que me ajudou na coleta, debaixo de chuva, mosquitos e mar revolto. E principalmente ao Alexandre que tornou tudo isso possível.

A Profa. Selma pelos empréstimos de material para montagem do mesocosmo.

Ao pessoal de Groningen Hidde, Jan, Patrícia, Cris, Pablo, Patrick, Evelyn, Jolanda, Anouk, Mario, Nuria, Natália e Costa que foram importantíssimos no meu amadurecimento científico e pessoal nesse tempo. Em especial ao Dick que me deu todo o suporte intelectual e de infra-estrutura necessário para realizar parte desse trabalho.

Essa tese não é só minha, mas de todos vocês. OBRIGADO!

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	IV
ÍNDICE.....	VI
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
INTRODUÇÃO.....	1
OS MANGUEZAIS.....	2
POLUIÇÃO POR ÓLEOS NOS MANGUEZAIS.....	3
BIORREMEDIAÇÃO.....	4
DIVERSIDADE MICROBIANA VERSUS O EFEITO DA CONTAMINAÇÃO POR PETRÓLEO.....	6
GRUPOS ENVOLVIDOS NO CICLO DO NITROGÊNIO EM MANGUEZAIS.....	7
ECOLOGIA MICROBIANA.....	9
JUSTIFICATIVA.....	15
OBJETIVOS.....	17
HIPÓTESE.....	18
OBJETIVO GERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
TAMPÕES E SOLUÇÕES.....	20
MATERIAL DE ESTUDO.....	21
CONSTRUÇÃO DOS MESOCOSMOS.....	22
EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DOS SEDIMENTO.....	24
ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS TOTAIS DE PETRÓLEO.....	25
PCR-DGGE COM INICIADORES PARA O rDNA 16S DE BACTÉRIAS.....	25
PCR-DGGE COM INICIADORES PARA rDNA 16S DE ARCHAEAS.....	26
BIBLIOTECA DE CLONES DE 16S rDNA.....	27
ANÁLISE DE SEQUENCIA- ÁLISrDNA.....	28
PCR EM TEMPO-REAL DO rDNA 16S.....	29
BIBLIOTECA DE CLONES DO GENE <i>nifH</i>	29
ANÁLISE DE SEQUÊNCIA- <i>nifH</i>	30
PCR EM TEMPO-REAL- <i>nifH</i>	30
RESULTADOS.....	32
HIDROCARBONETOS TOTAIS DE PETRÓLEO.....	33
PCR-DGGE- BACTÉRIA.....	35
PCR-DGGE- CRCHAEA.....	39
BIBLIOTECAS DE CLONE DE rDNA 16S BACTERIANO.....	42
PCR EM TEMPO-REAL- rDNA 16S.....	50
DIVERSIDADE FUNCIONAL: BIBLIOTECA DE CLONES DE <i>nifH</i>	52
PCR EM TEMPO-REAL- <i>nifH</i>	59
DISCUSSÃO.....	62
DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS.....	63
PCR-DGGE- BACTÉRIA.....	64
PCR-DGGE- CRCHAEA.....	65
BIBLIOTECAS DE CLONE DE rDNA 16S BACTERIANO.....	67
PCR EM TEMPO-REAL: rDNA 16S.....	70
BIBLIOTECAS DE CLONE DE <i>nifH</i>	70
PCR EM TEMPO-REAL: <i>nifH</i>	73
CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

ANEXO 1: TABELA DE CLASSIFICAÇÃO DOS CLONES DE RRS 88

ABREVIATURAS

ANOSIM	Análise de similaridade
AOB	“Ammonia-oxidizing bactéria” Bactérias oxidadoras de amônia
APS	Persulfato de amônia
BRS	Bactérias redutoras de sulfato
BTEX	Benzeno, tolueno, etileno e xileno
C _{org}	Carbono orgânico
Ct	“Threshold cycle” ciclo limiar de detecção
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol
DGGE	“Denaturing gradient gel electrophoresis” (eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes)
DNA	“Deoxyribonucleic acid” (ácido desoxirribonucléico)
DNRA	“Disimilarity nitrate reduction to ammonia” redução dissimilatória de nitrato a amônia
FBN	Fixação biológica de nitrogênio
HTP	Hidrocarbonetos Totais do Petróleo
HRP	Hidrocarbonetos Resolvidos do Petróleo
HPA	Hidrocarbonetos Aromáticos de Petróleo
MDS	“Multi-dimentional scaling” escalonamento multidimensional
NCBI	“National center for biotechnology information” Centro nacional de informação em biotecnologia
PCA	“Principal Component Analysis” (Análise de componente principal)
PCR	“Polymerase chain reaction” (reação da polimerase em cadeia)
PLFA	“Phospholipid Fatty Acid Analysis” análise dos ácidos graxos de fosfolipídios
qPCR	PCR quantitativo
rDNA	Gene que codifica o RNA ribossômico 16S (rRNA 16S)
RNA	“Ribonucleic acid” (ácido ribonucléico)
T-RFLP	“Terminal restriction fragment length polymorphism” (análise do polimorfismo do fragmento terminal gerado por enzima de restrição)
Tris	Tris (hidroxi-metil-amino-metano)
US EPA'Office	Agência de Proteção Ambiental Americana
UCM	“Unresolved complex mixture” Mistura complexa não resolvida

UTO Unidade taxonômica operacional

Resumo

Nesse estudo foi avaliada a hipótese de que a história da comunidade microbiana de um habitat afeta a resposta desta comunidade ao estresse por hidrocarbonetos. Com esse objetivo foram amostrados dois manguezais diferentes, um que se localiza próximo a uma refinaria de petróleo e sofreu, em 2002, um grande vazamento de hidrocarbonetos de petróleo, e outro que não teve contato direto com esse tipo de poluente. Dois mesocosmos foram construídos a partir de cada uma das amostras, um controle (sem óleo) e um ao qual foi adicionado óleo. Esses mesocosmos foram acompanhados por 75 dias para avaliar a dinâmica da comunidade microbiana ali presente. Inicialmente, pode-se observar porque a comunidade microbiana presente no ambiente com histórico de poluição foi capaz de consumir quase a totalidade dos HTPs adicionados enquanto o outro consumiu em torno de 50%. As comunidades tanto bacteriana como archaea foram analisadas por PCR-DGGE. Embora algumas alterações tenham sido vistas na comunidade bacteriana, as archaeas apresentaram uma comunidade bastante estável. As alterações observadas nas amostras sem histórico de contaminação foram mais intensas que nas amostras do outro manguezal. A análise das comunidades bacterianas por seqüenciamento de biblioteca de clones de *rrs* mostrou que embora as comunidades ali presentes fossem bastante semelhantes no início do experimento, ao fim deste, as comunidades eram significativamente diferentes da inicial e diferentes entre si. A quantificação da comunidade bacteriana por PCR em Tempo-Real indicou um pequeno aumento no número de cópias de rDNA 16S na comunidade bacteriana pela adição de óleo. A análise da comunidade diazotrófica ali presente mostrou que há uma seleção de populações específicas em cada um dos mesocosmo e que no manguezal sem histórico de poluição há um decréscimo na quantidade relativa de *nifH/rrs* indicando maior sensibilidade desta comunidade à poluição por hidrocarbonetos.

Abstract

In this manuscript it was evaluated the hypothesis that the history of a habitat affects the way the microbial community that inhabits it to respond to hydrocarbon stress. With this goal two different mangroves were sampled, one located near an oil refinery that suffered a spill in 2002, the other with no direct contact with petroleum pollution. With each of the mangrove samples two mesocosms were constructed, to one of them 2% (v/v) of crude oil was added, and the second one served as control without contamination. This mesocosms were followed for 75 days to evaluate the community dynamics there present. Initially, the quantification of the total petroleum hydrocarbons (TPHs) showed that, at the end of the experiment, almost all of the TPHs were eliminated from the mesocosms based on the mangrove with history of contamination, while the other mesocosm could only degrade about 50% of the TPHs. The microbial communities (both bacterial and archaeal), analyzed by PCR-DGGE, showed a highly stable community. The changes observed in the mesocosm with history of contamination were greater than in the pristine one. 16S rRNA gene clone libraries had indicated that although the communities observed in both mangroves were similar in the beginning of the experiment when they were challenged with the oil contamination they presented a significant divergence from the initial communities and from each other. Quantification of *rrs* copies through Real-Time PCR have shown that there was a slight increase in gene copy number after the addition of crude oil. The analysis of the diazotrophic community have shown that the addition of oil leads to a selection of specific genotypes in each of the mesocosms and that there in a decrease of around tenfold in the relative quantity of *nifH* compared to *rrs* copies in the pristine mangrove. This indicates that the diazotrophic community of the pristine mangrove is more sensitive to oil contamination.

INTRODUÇÃO

OS MANGUEZAIS

Também conhecidos como florestas de mangue ou simplesmente mangues, estes ecossistemas costeiros situam-se na faixa tropical e subtropical do mundo. No Brasil, estes ambientes distribuem-se ao longo da costa desde o Estado do Amapá até Santa Catarina, perfazendo uma área total de 25.000 Km² (Vergara-Filho, 1993).

A característica principal deste tipo de formação é sua localização geográfica. Quase todos os manguezais se formam em regiões onde ocorre o encontro de rios com o mar, na faixa que sofre a influência das marés. São ecossistemas altamente produtivos, devido ao acúmulo de substâncias alóctones e a queda e decomposição de folhas e outros substratos autóctones (Araujo & Maciel, 1979; Citron & Schaeffer-Novelli, 1983). Esta alta produção de matéria orgânica é fundamental nos processos de reciclagem de nutrientes, que influencia a rica cadeia alimentar presente nos manguezais. Mesmo assim, a maior parte dos nutrientes não é aproveitada, sendo enviada para o mar e outros sistemas (Holguin, Vazquez & Bashan, 2001).

A disponibilidade de alimentos faz com que os manguezais funcionem como áreas de alimentação e reprodução, e também, como locais de abrigo de algumas espécies, proporcionados pela sua típica vegetação. Essa não é muito diversa, possuindo muitos indivíduos de poucas espécies. As principais árvores são a *Rhizophora mangle*, que possui grandes raízes-escoras para permitir uma melhor fixação, a *Avicennia schaueriana*, com raízes aéreas, que propiciam à planta uma melhor oxigenação, e a *Laguncularia racemosa*. Ocorrem também bromélias, orquídeas, líquens e grande quantidade de algas. Algumas destas plantas têm mecanismos fisiológicos especiais para eliminar o excesso de sais que absorvem da água salobra (Zysman, 1989).

Poucos são os organismos característicos destes ambientes, pois a maior parte de sua fauna é composta por animais marinhos que passam apenas uma fase de sua vida neste ambiente. Dentre os organismos característicos destes ambientes podemos citar alguns moluscos bivalves e alguns crustáceos tais como ostras e caranguejos. Os caranguejos representam 80% dos organismos macrobentônicos presentes nos manguezais e, além do seu interesse comercial, desempenham um papel fundamental na ciclagem de nutrientes e aeração do sedimento dos manguezais, através do seu hábito alimentar e da estratégia de cavar tocas para se abrigarem (Vergara-Filho, 1993). Tais hábitos escavadores contribuem para o estímulo da fauna microbiana e, com isso, para a formação de detritos, transportando continuamente matéria decomposta das plantas à superfície do sedimento.

Por possuir uma grande riqueza de recursos naturais, os manguezais constituem-se há tempos em áreas de grande importância para a população humana. Este ambiente, porém, vem ao longo dos anos sofrendo agressões que contribuem para a sua degradação constante e crescente, quer seja na exploração desenfreada e não planejada de seus recursos, quer seja nos aterros que vem sofrendo ou nos aportes de poluição de esgotos domésticos e industriais que recebe (Vergara-Filho, 1993).

POLUIÇÃO POR ÓLEOS NOS MANGUEZAIS

Por serem ecossistemas costeiros, os manguezais estão entre os principais locais para onde os derramamentos de óleo convergem. Diferentemente das costas rochosas, onde a própria ação das marés ajuda na lavagem, os mangues funcionam como um verdadeiro depósito de óleo, uma vez que a circulação das marés dentro deste ecossistema acaba favorecendo a deposição deste material no sistema de raízes aéreas e no sedimento (Lewis, 1983).

Os impactos causados pelo óleo dependem do tipo de óleo e da duração do derramamento, sendo de modo geral causados por efeitos físicos ou toxicológicos do óleo. O efeito pode ser agudo, imediato, ao atingir a casca, pneumatóforos, raízes escoras e sedimento. Ocorre o amarelamento das folhas, o desfolhamento, culminando com a morte das árvores. Se a quantidade de óleo for muito grande, as plantas morrem entre 48 e 72 horas. A flora e a fauna bentônica microscópica morrem de imediato. Alguns caranguejos fogem do local, mas vão morrer adiante (Lai, 1986).

Os efeitos crônicos, geralmente ocorrem após o primeiro mês, e estão relacionados aos efeitos toxicológicos do óleo. Pode-se listar a redução na reprodução das plantas e na sobrevivência das sementes, bem como a redução na produção de serapilheira. Efeitos genéticos são também percebidos, com várias plantas apresentando má formação devido a mutações causadas pelos efeitos toxicológicos (Klekowski *et al.*, 1994).

Efeitos secundários também podem ser presenciados. O óleo residual remanescente na superfície dos sedimentos dos manguezais atingidos pelo derramamento durante a Guerra do Golfo aumentou a temperatura do solo a ponto de afetar a germinação e crescimento das plantas da zona intermarés (Boer, 1993). A decomposição que segue a mortalidade em larga escala provoca significativa erosão e mesmo subsidência da área onde a floresta estava localizada (Dodge *et al.*, 1995).

A geomorfologia e hidrodinâmica nos manguezais também vão determinar o quanto o óleo vai persistir dentro destes. Áreas mais protegidas da ação das correntes e das ondas são mais seriamente afetadas do que as áreas externas, de franja. A densidade

de caranguejos e conseqüentemente de buracos pode influenciar na penetração e persistência do óleo dentro do sedimento.

A degradação do óleo residual que contamina os manguezais ocorre lentamente uma vez que estes sedimentos são anaeróbicos logo abaixo dos primeiros centímetros de profundidade (Burns, Codi & Duke, 2000). As características peculiares destes ecossistemas fazem com que estes possam levar mais de 30 anos para se recuperar dos derramamentos de óleo mais severos (Burns, Codi & Duke, 2000).

BIORREMEDIAÇÃO

O óleo cru é composto de uma mistura complexa de hidrocarbonetos alifáticos (n-alcenos), alicíclicos e aromáticos (HPAs). Alguns dos processos mais importantes que têm influência sobre os hidrocarbonetos no solo são sorções, volatilização, transformação abiótica (química ou fotoquímica) e biotransformação. A sorção e a volatilização não destroem os contaminantes, mas apenas os concentram ou transferem para outro meio. As transformações abióticas químicas envolvendo contaminantes orgânicos são geralmente lentas e as reações fotoquímicas são insignificantes na maioria dos ambientes. Porém, é conhecido que as bactérias são capazes de realizar a biotransformação de vários contaminantes, possibilitando a biorremediação de solos impactados com óleo (Korda *et al.*, 1997). Geralmente, derrames acidentais de óleo são mais fáceis de conter em solo do que no mar. No primeiro caso, a matéria particulada é capaz de absorver os hidrocarbonetos, diminuindo a sua toxicidade, porém contribuindo para a sua persistência. Populações de microrganismos podem metabolizar como substratos apenas uma fração limitada de hidrocarbonetos.

A degradação de misturas complexas de hidrocarbonetos em solos é efetiva em comunidades microbianas com grande capacidade enzimática associada (Alexander, 1994). Existem muitas maneiras de definir as reações que ocorrem durante a remediação. O termo “atenuação natural” parece ser o mais adequado para descrever todos os processos que estão acontecendo (Nyer, 1998).

A Agência de Proteção Ambiental Americana (US EPA'Office) define o termo atenuação natural como “A biodegradação, dispersão, diluição, sorção, volatilização e/ou estabilização química e bioquímica do contaminante para reduzir efetivamente sua toxidez, mobilidade ou volume a níveis que não ofereçam risco à saúde humana e ao ecossistema” (Nyer, 1998). Esta definição engloba tanto os processos bióticos quanto os abióticos para reduzir os níveis do contaminante. No entanto, a biodegradação é o mecanismo primário para atenuar os contaminantes que são biodegradáveis. De acordo

com Nyer (1998), o termo biorremediação se refere, portanto, a todas as reações bioquímicas da atenuação natural.

Desta maneira, a tecnologia de biorremediação está sendo considerada adequada porque oferece baixos riscos aos sítios contaminados e é uma alternativa que favorece a relação custo-benefício do tratamento (Korda *et al.*, 1997).

O princípio da biorremediação se baseia na utilização de populações microbianas que possuam a habilidade de modificar ou decompor determinados poluentes. Pode-se utilizar a ação e/ou adição de microrganismos indígenas, assim como provenientes de outros sítios ou estirpes modificadas geneticamente (Atlas, 1991). O principal objetivo é obter níveis de degradação até o limite de detecção do poluente ou abaixo dos valores aceitáveis e estabelecidos pelas agências reguladoras. O benefício máximo deste processo é a completa mineralização dos compostos assim como formação de biomassa (Atlas, 1991; da Cunha & Leite, 2000; Watanabe & Hamamura, 2003). A utilização de microrganismos da biota natural é preferível aos provenientes de outros sítios ou aos microrganismos modificados geneticamente, pois não necessita de um monitoramento mais incisivo e é mais “natural” do ponto de vista ecológico: as chamadas “tecnologias verdes” (Korda *et al.*, 1997).

Diversas variáveis têm sido relacionadas com a eficiência dos processos de biodegradação do petróleo. A concentração do oxigênio foi determinada como uma variável limitante no processo no solo e em ambientes aquáticos (Heider *et al.*, 1998). Geralmente, quanto maior o suprimento de oxigênio mais rápido a biodegradação. Entretanto, a degradação microbiana de hidrocarbonetos também tem sido demonstrada em condições de anaerobiose, porém, o processo é bem mais lento (Heider *et al.*, 1999). O nitrato pode atuar comoceptor final de elétrons em condições de denitrificação (Heider *et al.*, 1998).

Também está bem estabelecido que a disponibilidade de nitrogênio e fósforo é limitante na degradação microbiana de hidrocarbonetos em diferentes ecossistemas (Atlas, 1991). Sabe-se que em ambientes com baixas condições nutricionais, a adição de uma quantidade controlada de amônia ao solo é benéfica a biodegradação. Entretanto, a excessiva adição de nitrogênio ao solo, praticamente, cessa o processo da biodegradação, devido à toxicidade da amônia aos microrganismos hidrocarbonoclasticos. Assim sendo, o importante é manter a relação ótima C:N no ambiente, de modo que a adição de mais hidrocarbonetos (para ajustar essa relação) previna a perda da atividade microbiana (Alexander, 1994).

Por fim, ao contrário do ambiente aquático, o pH do solo pode ser bastante variável. Valores de pH extremos teriam uma influência negativa na habilidade dos microrganismos em degradar os hidrocarbonetos (Korda *et al.*, 1997).

DIVERSIDADE MICROBIANA VERSUS O EFEITO DA CONTAMINAÇÃO POR PETRÓLEO

A participação dos microrganismos nos processos de biodegradação dos hidrocarbonetos foi estabelecida como sendo uma função do ecossistema (nicho ecológico) e das condições locais do ambiente (Alexander, 1994). A microbiota heterotrófica da maioria dos solos/sedimentos inclui a população degradadora de hidrocarbonetos que ocorre naturalmente. Essa característica inerente proporciona um grande potencial assimilatório dos hidrocarbonetos. Assim sendo, a adição de petróleo e seus derivados ao solo, acidental ou propositalmente, enriquece, seletivamente, a comunidade capaz de utilizar esse substrato (Hill, 1984). Por outro lado, a percolação do petróleo através do solo reduz a aeração e modifica o balanço C:N para as comunidades microbianas do solo, alterando a diversidade e o número de microrganismos no ecossistema (Alexander, 1994). Mudanças no número e na atividade dos microrganismos do solo, em resposta à contaminação por combustíveis, foram observadas por diversos autores (Eriksson, Dalhammar & Borg-Karlson, 1999; Juck *et al.*, 2000).

A primeira exposição da comunidade microbiana aos hidrocarbonetos seja por derrame acidental de óleo, disposição de resíduos oleosos ou por fenômenos naturais, é importante para a determinação do tempo do processo de eliminação do hidrocarboneto no ambiente. Este fenômeno que resulta em um aumento do potencial da comunidade oxidante dos hidrocarbonetos é chamado de adaptação (Atlas, 1991). Os três mecanismos inter-relacionados os quais levam à adaptação são: (a) indução de enzimas específicas; (b) mudanças genéticas que resultam em novas capacidades metabólicas; (c) enriquecimento seletivo de microrganismos capazes de transformar o composto em questão. Com relação ao enriquecimento seletivo, muitos trabalhos de revisão mostram que o número de microrganismos que utilizam hidrocarbonetos, assim como a sua proporção na comunidade heterotrófica, aumenta com a exposição ao petróleo e seus derivados, geralmente, refletindo o grau de contaminação do ecossistema (Korda *et al.*, 1997).

A microbiologia clássica e a bioquímica do processo de biodegradação do óleo no solo têm sido exaustivamente estudadas (ver revisão de Alexander, (1994)). O desenvolvimento da biorremediação como uma ferramenta útil na recuperação de solos contaminados tem sido, em grande parte, baseado no aumento do conhecimento da

fisiologia, ecologia e bioquímica das populações hidrocarbonoclásticas presentes no solo e de como os contaminantes são metabolizados pelos microrganismos.

A biorremediação explora a diversidade genética e a versatilidade metabólica dos microrganismos para a transformação de contaminantes em produtos finais menos tóxicos, os quais são integrados nos ciclos biogeoquímicos naturais (Alexander, 1994). O conhecimento da diversidade bacteriana e os estudos de ecologia microbiana são essenciais para o entendimento do papel das comunidades microbianas nos diferentes processos que ocorrem nos ecossistemas (Hugenholtz & Pace, 1996; Rosado *et al.*, 1997).

Apesar da importância do tema, não existem muitos trabalhos realizados sobre o efeito de um derrame de óleo sobre a biodiversidade de ecossistemas brasileiros. A utilização de ferramentas moleculares possui grande valor para gerar informações a respeito da presença de microrganismos indicadores da qualidade de solos submetidos ao estresse químico da poluição por petróleo.

Várias condições devem ser satisfeitas para que a biodegradação aconteça em determinado ambiente, entre elas: a) existência de organismos que possuam as enzimas necessárias para que os processos ocorram; b) Que este organismo esteja presente no ambiente que contenha as substâncias a serem degradadas. Apesar de muitos microrganismos estarem presentes em muitos ambientes, sítios específicos podem não conter o organismo que possui as enzimas necessárias; c) A substância deve estar acessível ao organismo que contém estas enzimas. Muitas vezes a persistência se deve ao fato do microrganismo não ter acesso ao composto que ele tem capacidade de metabolizar.

GRUPOS ENVOLVIDOS NO CICLO DO NITROGÊNIO EM MANGUEZAIS

A entrada do nitrogênio em manguezais é comumente associada à decomposição de matéria orgânica (sementes, órgãos reprodutivos, galhos, folhas e casca de árvores). No entanto, em ambientes marinhos que acumulam matéria orgânica biodegradável como os manguezais podem se observar altas taxas de fixação de nitrogênio, que ocorre devido a disponibilidade de energia por meio da decomposição da matéria orgânica realizada pela microbiota não diazotrófica (Holguin *et al.*, 1999). Isso faz com que a fixação do nitrogênio seja efetiva, porém limitada, devido a insuficiente disponibilidade de fontes de energia e a grande variabilidade de potencial redox (Holguin, Guzman & Bashan, 1992).

A fixação biológica do nitrogênio consiste no processo intermediado por microrganismos que transformam o nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3). Este

processo é realizado por diferentes espécies e linhagens de microrganismos, de duas maneiras distintas, em associação com outros organismos (ex. plantas), ou por bactérias de vida livre. Diazotróficos são microrganismos capazes de crescer em ambientes sem a disponibilidade de nitrogênio, exceto a atmosfera (Dixon & Kahn, 2004). Desta maneira, estas bactérias têm como fonte de nitrogênio a forma gasosa N_2 , que é mineralizada por processos metabólicos nos demais compostos nitrogenados. A capacidade de um microrganismo fixar nitrogênio, seja em associação ou não com as plantas, está ligada à presença e atividade do complexo enzimático conhecido como nitrogenase, que tem como centro funcional a combinação das proteínas codificadas pelos genes chamados *nif* (Raymond *et al.*, 2004).

Na outra extremidade do ciclo do nitrogênio temos os organismos que atuam na nitrificação, que consiste na transformação microbiológica da amônia (NH_3) em nitrato (NO_3^-) via nitrito (NO_2) e é de fundamental importância no ciclo do nitrogênio dentro de um ecossistema. Este processo é de significância particular em ambientes estuarinos, sendo diretamente ligado à perda anaeróbica de nitrogênio (Beman & Francis, 2006). Nestes ambientes, a atividade microbiana pode remover, desta maneira, entre 10 e 80% do nitrogênio resultante da poluição antrópica (Seitzinger & Kroeze, 1998; Seitzinger & Sanders, 1997).

A oxidação da amônia é o primeiro e limitante passo da transformação da amônia em nitrato, via nitrito, sendo essencial para a ciclagem do nitrogênio. As espécies microbianas capazes de realizar esta etapa da ciclagem do nitrogênio são denominadas de bactérias oxidadoras de amônio (AOB – *ammonia-oxidizing bacteria*).

Utilizando técnicas de estudo independentes de cultivo é possível estudar a populações de AOB utilizando como alvo o gene que codifica a subunidade α da enzima amônio monoxigenase (*amoA*) (Rotthauwe, Witzel & Liesack, 1997). Recentemente, muitos estudos forneceram evidências de que a oxidação da amônia é também realizada no ambiente, por archaeas do reino *Crenarchaeota*, que compõem uma das maiores populações microbianas aquáticas, sendo estimada a presença de 10^{28} células deste ramo filogenético no oceano (Karner, DeLong & Karl, 2001). As evidências desta funcionalidade de *Crenarchaeota* vêm de estudos metagenômicos, onde um fragmento de 43kb clonado a partir de DNA extraído de amostras do mar do Sargasso apresentou seqüências homólogas a genes *amo* e ao gene *rrs*, que permitiu a afiliação do fragmento, identificado como pertencente à *Crenarchaeota* (Treusch *et al.*, 2005; Venter *et al.*, 2004). O cultivo da espécie *Nitrosopumilus maritimus*, que pertence ao reino *Crenarchaeota*, mostrou que esta espécie é capaz de oxidar amônia, e apresenta seqüências homólogas aos genes *amoA*, *amoB* e *amoC* (Konneke *et al.*, 2005).

Após a oxidação da amônia ocorre o processo de denitrificação, que consiste na redução do nitrato (NO_3^-) para nitrogênio atmosférico (N_2). Esta reação está associada com a liberação de óxido nítrico (NO) e de óxido nitroso (N_2O). Este processo é de grande importância econômica e ambiental, por ser responsável por perdas de adubação nitrogenada e por liberar óxido nitroso, que degrada a camada de ozônio, na estratosfera (Conrad, 1997). A reação central da desnitrificação é catalisada por duas nitrato redutases (Nir) distintas, uma codificada pelo gene *nirS* que se liga ao citocromo *cd₁*, e outra codificada pelo gene *nirK* que atua de maneira dependente de cobre. A atividade destas enzimas resultam na formação do óxido nitroso, que é o substrato onde atua a enzima codificada pelo gene *nosZ*, que transforma o óxido nitroso em nitrogênio atmosférico (N_2) (Philippot & Hallin, 2005).

Desde os primeiros esboços do ciclo biológico no nitrogênio a possibilidade da oxidação anaeróbia de amônia (ANAMMOX) havia sido pouco considerada (Strous *et al.*, 2006). No entanto, a descoberta que levou a identificação da bactéria quimiolitotrófica responsável pelo processo, levou a maior apreciação da importância ecológica e tecnológica (Brasseur *et al.*, 2004; Frishman *et al.*, 2001; Strous *et al.*, 2006). Hoje, estima-se que 50% da remoção do nitrogênio fixado nos oceanos é realizado pela ANAMMOX (Arrigo, 2005). A ANAMMOX se dá pela junta a oxidação da amônia a oxidação do nitrito produzindo assim dinitrogênio em condições anóxicas (Klotz & Stein, 2008). Em adição ao processo de ANAMMOX esses organismos são responsáveis também pela redução dissimilatória de nitrato a amônia (DNRA) (Francis, Beman & Kuypers, 2007; Kartal *et al.*, 2007). Esse processo pode levar esses organismos a serem responsáveis por uma fração ainda maior da conversão do nitrogênio fixado em N_2 (Francis, Beman & Kuypers, 2007; Kartal *et al.*, 2007)

O sedimento dos manguezais é um depósito para o nitrogênio inorgânico dissolvido e para o nitrogênio orgânico. O nitrogênio orgânico é tipicamente processado pela biota residente no sedimento ou é exportado para a água costeira, na forma de folha fenada e matéria particulada fina (Ayukai & Miller, 1998). Esse material é redistribuído durante as vazantes e pode ser exportado do manguezal. Na zona radicular, a fixação de nitrogênio é ativa e contribui para o consórcio de nitrogênio inorgânico dissolvido (Kristensen *et al.*, 1998). Algum nitrogênio é liberado para a atmosfera como gás N_2 pela denitrificação (Trott & Alongi, 2000).

ECOLOGIA MICROBIANA

Em anos recentes, diversos artigos foram publicados reconhecendo a importância dos estudos voltados à melhor entender a dispersão a distribuição e seleção de populações microbianas nos diversos habitats (revisado em Martiny *et al.*, 2006). Entretanto, apenas alguns estudos foram conduzidos com o objetivo de testar a hipótese dos microrganismos apresentarem biogeografia (Buckley *et al.*, 2006; Cho & Tiedje, 2000; Crump *et al.*, 2007; Crump *et al.*, 2004; Oline, 2006; Pommier *et al.*, 2007). De fato, a grande maioria destes usou como guia a hipótese de que “Tudo está em todo lugar, o ambiente seleciona” (Beijerinck, (1913) citado em Martiny *et al.*, (2006)), e assim tem se focado na questão de endemismo e muitas vezes negligenciando os fatores que levam a seleção, como a história e tipo de habitat.

Sabe-se hoje em dia que apenas uma pequena fração dos microrganismos presente no meio ambiente (1 a 10%) podem ser cultivados por técnicas convencionais conhecidas. Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, associadas ao conhecimento em bioinformática, tornou-se possível à caracterização de comunidades microbianas mistas em determinados ecossistemas, revelando os grupos atuantes, muitos destes até então desconhecidos (Rosado *et al.*, 1997).

A utilização de técnicas moleculares permite, portanto, um conhecimento mais aprofundado dos grupos microbianos presentes, após a seleção natural imposta por condições extremas, como a presença de substâncias poluentes e de suas formas distintas de tratamento. Do ponto de vista técnico, estes métodos são viáveis porque são rápidos e sensíveis para identificar e monitorar a população microbiana presente e atuante no processo de biorremediação (Watanabe & Hamamura, 2003).

Apesar da utilização destas novas técnicas para o estudo da diversidade microbiana, as técnicas tradicionais, que envolvem enriquecimento e cultivo, ainda são fundamentais para a obtenção de um conhecimento mais detalhado a respeito de capacidades metabólicas e caracterização fenotípica, podendo desta forma, usando uma abordagem polifásica chegar o mais próximo possível da caracterização do ambiente.

Os resultados obtidos com estas abordagens permitem definir com mais precisão o melhor processo de biorremediação a ser implementado, desenvolvendo mecanismos que promovam a utilização máxima de um determinado grupo presente na comunidade microbiana. A presença de uma grande quantidade de cópias de um gene catabólico em uma área contaminada pode ser um indicativo de que esteja ocorrendo um processo de biodegradação natural ou que a estratégia de tratamento empregada seja eficiente. As bactérias que na presença de oxigênio degradam hidrocarbonetos aromáticos utilizam enzimas dioxigenases para ativar e clivar o anel, estando envolvidas na degradação de BTEX (benzeno, tolueno, etileno e xileno) (Meyer *et al.*, 1999). Portanto, a detecção dos

genes correspondentes serve como base para monitorar o processo, se apresentando como excelentes indicadores (Watanabe & Hamamura, 2003).

Na tentativa de se conhecer melhor a diversidade microbiana em uma amostra ambiental, podem ser utilizadas técnicas de clonagem gênica. Como alternativa às exaustivas estratégias de clonagem, pode-se lançar mão de experimentos de “fingerprinting” de comunidades microbianas. Uma técnica molecular em particular tem provocado uma verdadeira revolução no campo da ecologia microbiana, a eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) (Rosado & Duarte, 2002).

Esta metodologia é aplicada na determinação direta da diversidade genética de comunidades microbianas complexas. Ela se baseia na eletroforese dos produtos de PCR em géis de poliacrilamida contendo um gradiente crescente de agentes desnaturantes (uréia e formamida). Os fragmentos que possuem o mesmo tamanho e seqüências nucleotídicas diferentes podem ser separados pela diferença na mobilidade das moléculas após a desnaturação química de seus domínios chamados “Melting Domains” (Rosado & Duarte, 2002).

A mobilidade eletroforética do DNA é sensível à estrutura secundária da molécula que pode ser helicoidal, parcialmente desnaturada e fita simples. Portanto, a desnaturação parcial promove uma movimentação mais lenta no gel comparada à molécula em fita dupla ou simples. As moléculas que possuem seqüências nucleotídicas diferentes param de migrar em posições diferentes no gel, gerando perfis diferenciados, o que não era possível de verificar através da visualização em gel de agarose. Através desta técnica é possível detectar aproximadamente 50% das variações de seqüências em fragmentos de DNA com até 500 pares de bases (Heuer & Smalla, 1997). Quando se acrescenta à extremidade 5' de um dos iniciadores um “grampo” de Guanina e Citosina (GC) contendo de 30 a 50 nucleotídeos, há um impedimento da dissociação das fitas de DNA aumentando para 100% a detecção das variações existentes (Rosado & Duarte, 2002).

Esta técnica pode ser usada para complementar o monitoramento nos estudos de impactos ambientais. Além de avaliar a diversidade genética de amostras ambientais, estudando o efeito da presença de um determinado poluente na estrutura da comunidade microbiana, é possível verificar aqueles que se adaptam e atuam no processo de biorremediação. Pode também ser aplicada no monitoramento de microrganismos inoculados *in situ*, avaliando sua permanência ou eliminação nos ambientes impactados.

Em conjunto com o PCR-DGGE outra técnica de biologia molecular que tem ganho espaço nos estudos de ecologia microbiana é a PCR em Tempo-Real. Essa é uma

ferramenta altamente sensível capaz de detectar e quantificar os produtos de amplificação de uma reação de PCR. Esta detecção é realizada por meio de marcadores fluorescentes presentes na reação de amplificação. O marcador fluorescente mais comumente utilizado é o corante SYBR Green I, que possui a capacidade de intercalar a dupla fita de DNA e emitir o sinal fluorescente, quando excitado, no comprimento de onda de 494 a 521nm. O sinal emitido é então quantificado e utilizado para determinar a quantidade de amplificação presente neste momento na reação. Com o decorrer da amplificação, quando um valor arbitrário de amplificação é atingido, é alcançado o valor chamado de Ct (limiar do ciclo de detecção - *cycle threshold*). Este valor de Ct é o utilizado na estimativa de quantidade de DNA presente inicialmente na reação de PCR.

Utilizando a técnica de qPCR vários grupos e espécies de bactérias têm sido alvos de quantificação (Zhang & Fang, 2006). Sistemas de detecção e quantificação de diversos grupos de microrganismo, funções ecológicas e metabolismos específicos estão publicados na literatura (An, Mainelis & White, 2006; Furukawa *et al.*, 2006; Powell *et al.*, 2006; Zhang & Fang, 2006).

Em relação a populações microbianas associadas ao ciclo do nitrogênio, a utilização da PCR em Tempo-real permite quantificar grupos ativos no solo, utilizando genes determinantes em importantes funções como o *amoA* (Innerebner *et al.*, 2006) ou *nirK* (Henry *et al.*, 2004), que foram quantificados em amostras de compostagem e solos, respectivamente, utilizando esta metodologia. O gene *nosZ* também foi alvo de estudo moleculares por meio de PCR em Tempo-real para verificar sua abundância em amostras de solos (Henry *et al.*, 2006). Além da quantificação da população de grupos bacterianos, a técnica de qPCR também é amplamente aplicada a estudos de expressão gênica microbiana, sendo utilizada em importantes determinações, como por exemplo a descrição da oxidação do amônio realizada pelo produto de expressão *amoA*, predominantemente realizada por archaeas em solos (Leininger *et al.*, 2006).

A técnica de construção e seqüenciamento de bibliotecas de clones de genes é uma ferramenta de alta sensibilidade no estudo de comunidades microbianas. (Schloss & Handelsman, 2005). Comparando-se com outras metodologias de análise de comunidades (ex., PFLA, T-RFLP, DGGE) o seqüenciamento de clones ambientais se destaca por permitir uma análise mais profunda das comunidades, indo além da comparação da comunidade presente nas amostras e permitindo que se tenha uma caracterização dos constituintes majoritários das comunidades. A maioria dos trabalhos publicados empregando a qPCR utiliza como alvo os genes ribossomais, com posterior comparação entre genótipos de microrganismos presentes em diferentes amostras. Utilizando esta técnica para estudos de comunidades bacterianas foi possível determinar

a diversidade de bactérias que colonizam a superfície de folhas de árvores na floresta Atlântica (Lambais *et al.*, 2006). De maneira similar, porém utilizando a técnica de pirosequenciamento, a comunidade bacteriana presente no perfil de profundidade do oceano foi descrita (Sogin *et al.*, 2006), onde os autores também descrevem uma rara e inexplorada diversidade de espécies compondo estas comunidades.

Com a expansão da utilização desta técnica diversas metodologias foram desenvolvidas com o objetivo de se expandir a exploração destes dados. Com isso foi lançado em 2005 o software DOTUR (Distance-based OTU and Richness Determinatin, Schloss & Handelsman, 2005). Baseando-se em uma matriz, de similaridade este software separa os clones de uma biblioteca de acordo com a similaridade entre elas, permitindo-se assim a separação das seqüências em UTOs. Essas UTOs são então usadas pelo software para calcular índices de diversidade (Simpson – D- e Shannon – H'), estimativas de riqueza (CHAO1 e ACE), além de curvas de rarefação e abundancia de ranks. Entretanto, o DOTUR é usado apenas para caracterização da diversidade de bibliotecas individualmente. Assim, para a análise comparativa bibliotecas foram desenvolvidos softwares específicos dos quais os mais empregados são o *Libshuff* (Singleton *et al.*, 2001) e o *[-Libshuff* (Schloss, Larget & Handelsman, 2004). Esses programas permitem avaliar através da análise de cobertura se duas ou mais bibliotecas são significativamente diferentes entre si. Essas, embora sejam as mais empregadas, não são as únicas metodologias empregadas na análise e comparação de bibliotecas, em tempos mais recentes um maior número de programas voltados a comparação de bibliotecas tem surgido, dos quais podem ser citados o Unifrac, Treeclimber e SONS (Lozupone, Hamady & Knight, 2006; Schloss & Handelsman, 2006a; Schloss & Handelsman, 2006b).

Diversos grupos microbianos funcionais têm sido estudados por meio da clonagem e seqüenciamento de *amplicons* provenientes de DNA de amostras ambientais. Dentre estes genes é possível observar estudos que mostram a diversidade de bactérias que possuem o gene *nirK* (Avrahami, Conrad & Braker, 2002) e *nirS*, ambos envolvidos no processo de nitrificação, codificando para a proteína nitrato redutase (Santoro, Boehm & Francis, 2006). Anteriormente a aplicação das técnicas independentes de cultivo o número estimado de grupos bacterianos com esta atividade era pequeno, no entanto, após estudos independentemente de cultivo, ficou determinado que esta atividade é encontrada em mais de 50 gêneros bacterianos distintos. Resultados semelhantes foram obtidos ao se analisar a diversidade do gene *nifH*, que em amostras marinhas era aparentemente dominado por *Cyanobacteria* e após estudos de seqüenciamento de biblioteca de clones do gene *nifH* observou-se que a maioria das seqüências capturadas

nesses ambientes eram na verdade relacionadas com as *Proteobacterias* (Church *et al.*, 2005b; Hamelin *et al.*, 2002; Montoya *et al.*, 2004; Omoregie *et al.*, 2004; Short, Jenkins & Zehr, 2004; Zehr *et al.*, 2003). Outra atividade amplamente distribuída em diferentes grupos taxonômicos microbianos é a oxidação de amônia, inicialmente atribuída à atividade bacteriana, porém posteriormente verificada também em archaeas do grupo *Crenarchaeota* (Konneke *et al.*, 2005; Treusch *et al.*, 2005). A diversidade dos genes *amoA* de bactérias e archaeas foram recentemente avaliadas por seqüenciamento de clones ambientais (Beman & Francis, 2006), que mostraram um maior número e maior diversidade de genes *amoA* em archaeas em comparação com as bactérias.

JUSTIFICATIVA

Hoje, a biotecnologia ambiental e a ecologia microbiana são duas disciplinas que apresentam uma intercessão de objetivos muito grande (McMahon, Martin & Hugenholtz, 2007; Rittmann, 2006; Rittmann *et al.*, 2006). Assim, parte da otimização de processos biotecnológicos deve ser estudada como interações entre as populações presentes no processo e o seu ambiente (McMahon, Martin & Hugenholtz, 2007). Como essas interações muitas vezes não são possíveis de serem controladas, esses processos podem ser arruinados devido a esses fatores. Porém, ao se estudar esses processos do ponto de vista ecológico, pode-se entender a dinâmica das interações ali presentes possibilitando um controle mais preciso sobre o processo (McMahon, Martin & Hugenholtz, 2007). Assim, a biorremediação, como uma tecnologia ambiental baseada em funções ecológicas das populações presentes no ambiente (seja ele natural ou artificial como um biorreator) deve ser estudada a fim de melhor compreender as interações ecológicas que ocorrem dentro desse processo.

Uma das tecnologias mais eficazes de biorremediação é o bioestímulo, e esse processo é normalmente realizado pela adição de nitrogênio ou fósforo (no caso da remediação de hidrocarbonetos) ao substrato a ser tratado com objetivo de equilibrar a relação C:N:P na amostra. Porém, no caso de manguezais onde se observa altas taxas de C devido à degradação de material de origem vegetal, a degradação de hidrocarbonetos mais resilientes será difícil devido à presença desse carbono abundante e de mais fácil assimilação. Dessa maneira, compreendendo melhor o processo natural de remediação (atenuação natural) pode-se chegar a tecnologias de remediação *in situ* mais eficientes.

Sabe-se que a ciclagem de nutrientes nos manguezais, principalmente nitrogênio e fósforo é bastante eficiente (Holguin, Vazquez & Bashan, 2001). No caso do ciclo do nitrogênio, a grande exportação de material e consumo rápido de qualquer aporte desse nutriente ao sedimento torna esse nutriente um limitante nesses ambientes (Holguin *et al.*, 1999; Holguin, Guzman & Bashan, 1992; Holguin, Vazquez & Bashan, 2001). Porém, já foi observada que a fixação de nitrogênio pela comunidade diazotrófica serve então de suporte para essas comunidades (Holguin, Vazquez & Bashan, 2001). Porém, com a entrada de carbono no ambiente há a quebra do balanço C:N:P desses ambientes (Musat, Harder & Widdel, 2006). Assim, os organismos hidrocarbonoclasticos presentes no ambiente muitas vezes se associam a bactérias diazotróficas e através dessa interação há a degradação dos hidrocarbonetos (Head, Jones & Roling, 2006). Assim, a degradação de hidrocarbonetos estimularia o crescimento da população diazotrófica que por sua vez

estimularia a população hidrocarbonoclástica, trazendo assim benefício no processo de remoção dos hidrocarbonetos.

OBJETIVOS

HIPÓTESE

Duas amostras provenientes do mesmo tipo de ambiente, porém possuindo diferentes histórias (um com histórico de contaminação por subprodutos de petróleo e outro sem), ao serem submetidos a um distúrbio pela adição de hidrocarbonetos responderiam de maneira diferente baseado na existência ou não de histórico de contato com os hidrocarbonetos.

OBJETIVO GERAL

Com uso de métodos independentes de cultivo, em experimento de mesocosmo, identificar alterações nas comunidades bacterianas, archaeas e diazotróficas de dois manguezais (com e sem histórico de contaminação por petróleo) após a adição de óleo e avaliar como essas alterações se refletem na degradação dos hidrocarbonetos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir mesocosmos simulando a situação natural de manguezais e com eles simular o vazamento de petróleo cru.
- Verificar através da quantificação dos HTPs a degradação dos hidrocarbonetos nos diferentes mesocosmos.
- Monitorar as alterações na estrutura da comunidade bacteriana por PCR-DGGE.
- Monitorar as alterações na estrutura da comunidade archaea por PCR-DGGE.
- Comparar as comunidades bacterianas encontradas inicialmente nos dois manguezais com as encontradas ao fim do experimento através de análise de bibliotecas de clones de rDNA 16S.
- Comparar as seqüências de bactérias diazotróficas encontradas nas amostras dos manguezais antes da adição de óleo e após 75 dias de experimento por seqüenciamento do gene *nifH* encontrado nessas amostras.
- Verificar através de Real-time PCR a relação entre a quantidade de cópias de rDNA 16S e de *nifH* nas amostras de modo a verificar a seleção específica deste tipo de comunidades nas amostras.

MATERIAIS E MÉTODOS

TAMPÕES E SOLUÇÕES**Tampão TE:**

Tris 10 mM

EDTA 1 mM

Tampão TBE 1X

Tris 89 mM

EDTA 2,5 mM

H₃BO₃ 89 mM**Corante para Eletroforese de DNA**

Glicerol 50%

EDTA, pH 7,5 20 mM

Azul de bromofenol 0,05%

Xilenocianol 0,05%

Soluções do DGGE:**Acrilamida/Bisacrilamida 40%**

Acrilamida 38,93 g

Bisacrilamida 1,07 g

Tampão TAE 50x

Trisma Base (Sigma) 2 M

Ácido acético glacial 1 M

EDTA 50 mM

Tampão TAE 0,5X

Tris-acetato, pH 7,4 20 mM

Acetato de sódio 10 mM

EDTA 0,5 mM

Solução desnaturante a 0% para gel a 6% de acrilamida

Acrilamida/Bisacrilamida 40% 15 ml

Tampão TAE 50x 2 ml

Água bidestilada 83 ml

Solução desnaturante a 100% para gel a 6% de acrilamida

Acrilamida/Bisacrilamida 40% 15 ml

Tampão TAE 50x 2 ml

Formamida deionizada 40 ml

Uréia 42 g

Água bidestilada q. s. p 100 ml

Persulfato de amônio (APS) 10%

Persulfato de amônio 0.1 g

Água destilada 1 ml

Solução 40% (para volume final de 12 ml)

4,8 ml de solução do DGGE 100%

7,2 ml da solução do DGGE 0%

Solução 60% (para volume final de 12ml)

7,2 ml da solução do DGGE 100%

4,8 ml da solução do DGGE 0%

Acrescentar 50µl de APS 10% e 10µl de TEMED a ambas as soluções (40 e 60%), no momento de passá-las para as seringas do formador de gradiente do gel.

MATERIAL DE ESTUDO

Sedimentos para construção dos mesocosmos foram coletados em dois manguezais localizados na Baía de Todos os Santos na costa nordeste do Brasil. O manguezal sem histórico de contaminação foi coletado na seguinte coordenada S12°43'46.7", W38°30'09.1". As amostras provenientes deste manguezal serão chamadas pela sigla Vir. A amostra do manguezal com histórico de poluição foi obtida na coordenada S12°24'38.1", W38°33'49.9", e suas amostras serão denominadas ao longo do texto sob a sigla Pol (tabela 1).

Em ambos os tipos de manguezais, os sedimentos foram coletados em pontos longe da vegetação para evitar a influência de populações de origem rizosférica, a uma

profundidade de 0-10 cm no pico da maré baixa. As amostras foram mantidas a 4°C até a chegada no laboratório.

CONSTRUÇÃO DOS MESOCOSMOS

Para os sedimentos de cada um dos manguezais coletados foram aplicados dois tratamentos (um recebendo adição de óleo e um sem adição) somando um total de 4 mesocosmos. Cada um destes consistia em um aquário de 20L contendo 10L de sedimento (1,2Kg/L peso seco). De modo a simular a ação das marés duas bombas foram usadas no sistema, uma destas tinha a função de adicionar água do mar sintética (Natural Sea Salt Mix, Oceanic Systems, Texas, USA) ao mesocosmo (por volta de 5L) e outra para retirar essa água após 6 horas de inundação (figura 1). Esse ciclo de entrada e saída de água era repetido a cada 6hs, que é aproximadamente o tempo de ação das marés. Um regime de luz (claro/escuro) de 12hs cada foi usado para simular o ciclo do dia utilizando-se de lâmpadas de tungstênio de 100W. Após a montagem do mesocosmo este foi deixado funcionando por 3 dias para esperar a estabilização e a estratificação do sedimento antes de iniciar o experimento (adição de óleo).

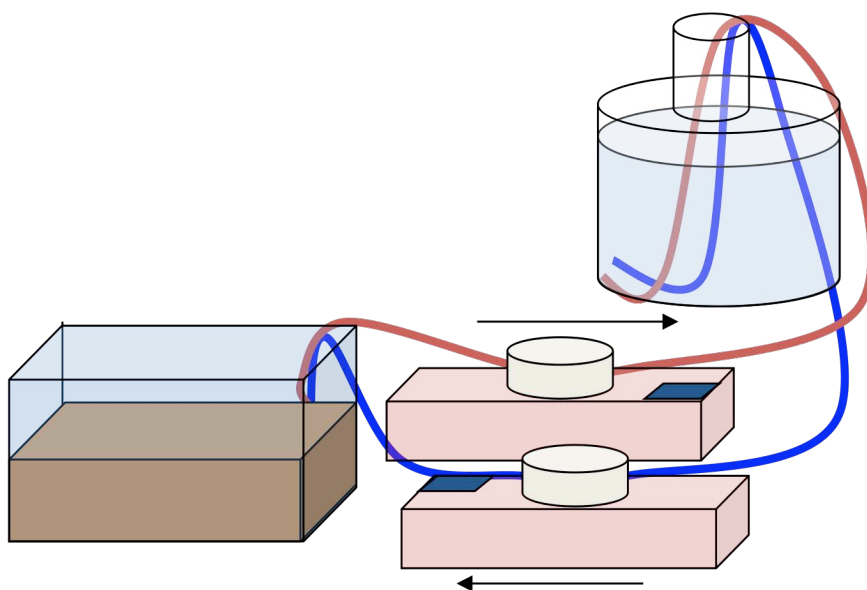


Figura 1: Esquema de construção do mesocosmo; as setas indicam a direção de bombeamento da água.

Tabela 1: Características físicas e químicas dos sedimentos.

	Na*	Ca*	Mq*	Al*	S*	pH	C _{org} (%)	P [§]	K [§]	Fe [†]	Cu [†]	Zn [†]	Mn [†]
Pol	32,32	41,5	14,9	2,96	91,1	6,6	8,3	120	913	840	37,8	100,8	39,9
Vir	54,27	38,3	25,1	2,6	120,7	3,6	5,9	42	1177	1025	23,1	21,0	96,6

* - meq/100mL; § - mg/L; † - mg/Kg; adaptado de Peixoto *et al.* (comunicação pessoal)

Conforme descrito acima, um mesocosmo de cada um dos manguezais recebeu a adição de 2% (v/v) óleo e o outro foi deixado sem adição de óleo como controle (figura 1). Amostras foram coletadas antes da adição do óleo (T-0), após um dia (T-1), sete dias (T-7), quinze dias (T-15), vinte e sete dias (T-27), quarenta e cinco dias (T-45), sessenta e cinco dias (T-65) e finalmente aos setenta e cinco dias (T-75) (figura 2). Amostras de sedimento foram coletadas de três pontos do mesocosmo (evitando-se as bordas) a profundidade de 0-5 cm e estas foram misturadas (amostra composta) para extração de DNA

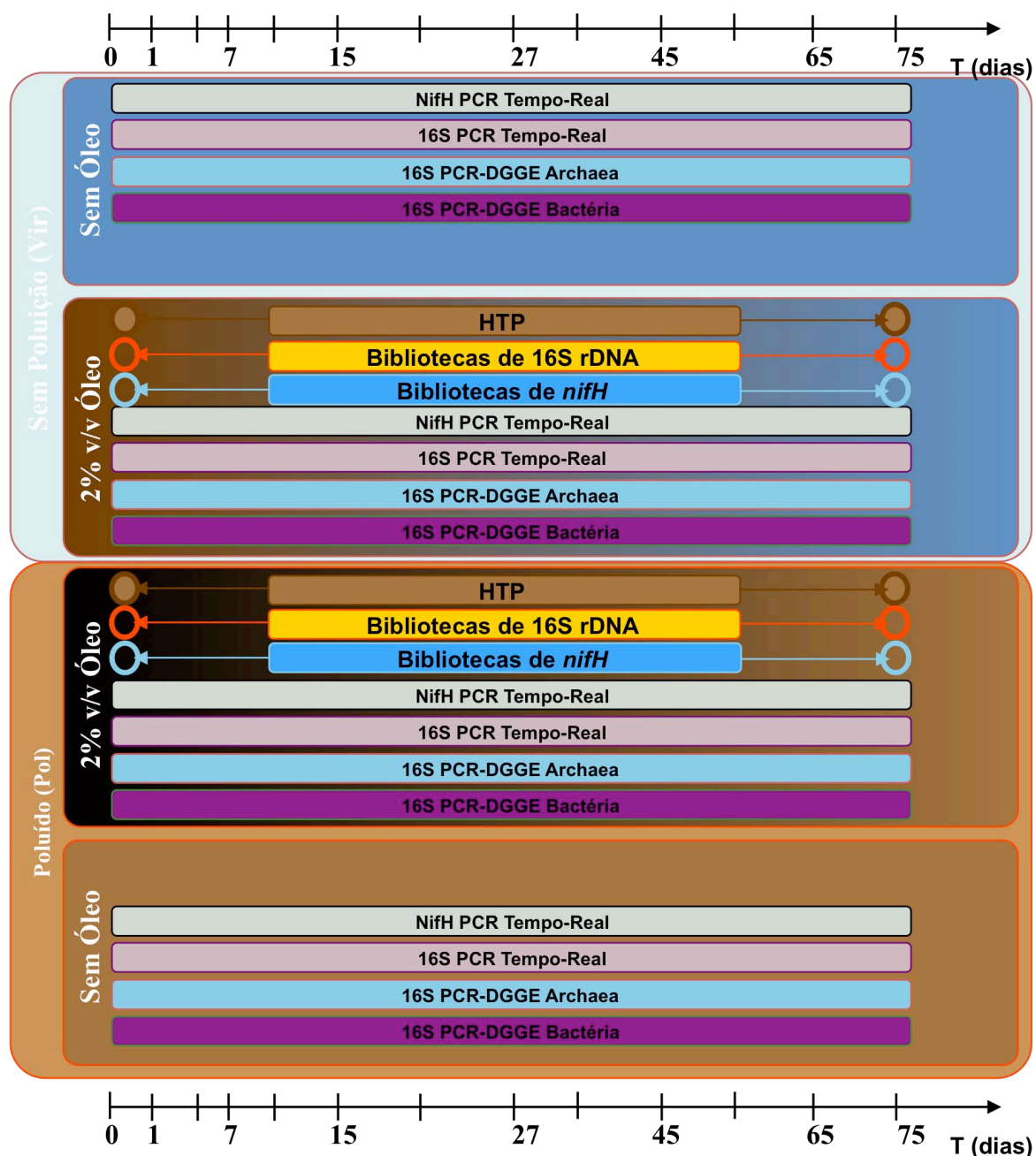


Figura 2: Organograma contendo as diferentes etapas e técnicas empregadas nesse trabalho. Os círculos indicam os tempos onde foram retiradas amostras para construção de bibliotecas e análise de HTP. As amostras para realização de PCR-DGGE e PCR em Tempo-Real foram obtidas nos tempos 0, 1, 7, 15, 27, 45, 65 e 75.

EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DOS SEDIMENTO

A extração de DNA do sedimento foi realizada através do método de extração direta com o "kit" de extração de DNA para solo (FastDNA® SPIN Kit for Soil) da BIO101 (Califórnia, EUA), seguindo as especificações do fabricante. Após a extração o DNA obtido foi então purificado Wizard® Genomic DNA Purification System (Promega, The Netherlands) com o objetivo de retirar da amostra qualquer contaminante que lá ainda permanecesse. O material foi então mantido a -20°C para evitar degradação.

Análise da Concentração de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo

As análises dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) nas amostras de solo foram realizadas no extrato obtido com equipamento ASE (*Accelerated Solvent Extractor*), modelo 200 da Dionex (dos Santos, 2007). Após eliminar a umidade da amostra de solo através da adição de sulfato de sódio anidro, 2 g da amostra desidratada foram colocados na célula de aço inox com capacidade para 33 mL. Em seguida, foram adicionados 4 mL de diclorometano na célula iniciando-se o processo automático de extração. O extrato é transferido para o copo concentrador do equipamento Turbovap Modelo II, no qual é concentrado até o volume de 1 mL (Seabra, 2005). Esse concentrado foi então levado ao cromatógrafo a gás HP5890 (com coluna cromatográfica HP-5), para a determinação dos HTP, seguindo metodologia USEPA 8015B (USEPA-8015B, 1996).

PCR-DGGE COM INICIADORES PARA O RDNA 16S DE BACTÉRIAS

De modo a obter perfil da comunidade bacteriana contida nas amostras obtidas conforme descrito acima, estas foram amplificadas por PCR usando-se os iniciadores F968-GC (5'CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC 3') e 1378R (5'GCG TGT GTA CAA GAC CC 3') (Heuer & Smalla, 1997). As reações foram realizadas em aparelho GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA). As misturas de reação utilizadas (de volume total de 50 µl) continham 5 µl de tampão 10x Stoffel buffer (Roche, Basel, Switzerland), 200 µM de cada deoxinucleosídeo trifosfato, 400 nM de cada iniciador, 1% formamida, 0.05U Stoffel Taq DNA polimerase (Roche, Basel, Switzerland), 31 µl H₂O e 1 µl (20 ng) de DNA. O seguinte programa de PCR em "touchdown" foi usado: 94°C por 3 min; 94°C por 1 min, 65°C (decrecendo 1°C por ciclo) por 1 min, 72°C por 3 min (10 ciclos); 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 3 min (35 ciclos); 72°C por 30 min. Uma alíquota de 5 µL dos amplicons foi corrida em eletroforese em gel de agarose para avaliar a especificidade e rendimento da

reação. Como todas as reações resultaram em produtos de mesma intensidade no gel de agarose 5 μ L de cada amplicon foi então usado em corrida de DGGE.

As análises de DGGE foram realizadas em aparato PhorU2 system (Ingeny International, Goes, The Netherlands) de acordo com instruções do fabricante. Foram utilizados gradientes de 40–60 % de desnaturantes (uréia/formamida) (100% desnaturantes são 8M de uréia mais 40% formamida), temperatura do tampão de 60°C e 110V por 18 h. Após a corrida o gel foi corado por coloração de prata (Sambrook & Russell, 2001).

As imagens digitalizadas dos géis de DGGE foram analisadas através do ImageQuant (5.2) para gerar perfil densitométrico. Bandas cuja altura do pico fosse inferior a 1% do total (somatória da altura de todos os picos) foram desconsideradas (Iwamoto *et al.*, 2000). Para realizar testes multivariados nos dados de DGGE utilizou-se o software PRIMER (5.0). Non-metric multidimensional scaling (MDS) foram realizados baseando-se em matrizes de similaridade de Bray-Curtis (10 repetições, 999 interações cada). Análises de similaridade (ANOSIM) foram realizadas usando 999 permutações para avaliar a significância das diferenças nas comunidades (Clarke, 1993).

PCR-DGGE COM INICIADORES PARA RDNA 16S DE ARCHAEAS

Para construir o perfil da comunidade de archaeas, foram usados os iniciadores 344f-GC (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC CAC GGG GCG CAG CAG GCG CGA-3') e 517r (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') conforme descrito anteriormente (Bano *et al.*, 2004). Cada mistura de PCR (50 μ L) continha 5 μ L tampão de PCR 10X (Roche), 2.5 mM MgCl₂, 200 μ M de cada deoxiribonucleosídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP), 1.0 μ M de cada iniciador, e 20 ng de DNA molde. A amplificação por PCR foi realizada conforme (Ferrari & Hollibaugh, 1999), iniciando-se com uma desnaturação a 94°C por 3,5 min., com desnaturação subsequente a 94°C por 45 seg.; anelamento por 45 seg. a 65–55°C (baixando 0,5 grau a cada ciclo no intervalo de 65 a 62°C e 1 grau a cada ciclo entre 62 e 55°C) seguido de extensão a 72°C por 30 seg. seguido então de 30 ciclos de: desnaturação a 94°C por 45 seg., anelamento a 55°C por 45 seg., e extensão a 72°C por 30 seg. com uma extensão final de 5 min. Uma alíquota de 5 μ L dos amplicons foi corrida em eletroforese em gel de agarose para avaliar a especificidade e rendimento da reação. Como todas as reações resultaram em produtos de mesma intensidade no gel de agarose 5 μ L de cada amplicon foi então usado em corrida de DGGE.

Análises de DGGE foram realizadas em aparato PhorU2 system (Ingeny International, Goes, The Netherlands) de acordo com instruções do fabricante. Gradiente de 40–55 % de desnaturantes (uréia/formamida) foram utilizados (100% desnaturantes são 8M

de uréia mais 40% formamida), temperatura do tampão de 60°C e 110V por 18 h. Após a corrida o gel foi corado por coloração de prata (Sambrook & Russell, 2001).

As imagens digitalizadas dos géis de DGGE foram analisadas através do ImageQuant (5.2) para gerar perfil densitométrico. Bandas cuja altura do pico fosse inferior a 1% do total (somatória da altura de todos os picos) foram desconsideradas (Iwamoto *et al.*, 2000). Para realizar testes multivariados nos dados de DGGE utilizou-se o software PRIMER (ver. 5). Non-metric multidimensional scaling (MDS) foram realizados baseando-se em matrizes de similaridade de Bray-Curtis (10 repetições, 999 interações cada). Análises de similaridade (ANOSIM) foram realizadas usando 999 permutações para avaliar a significância das diferenças nas comunidades (Clarke, 1993).

BIBLIOTECA DE CLONES DE 16S rDNA

Quatro amostras foram selecionadas para construção de biblioteca de clone do gene que codifica para a rRNA 16S (figura 1). As amostras provenientes dos mesocosmos que receberam adição de óleo (tanto o com histórico de contaminação como o sem) no T-0 e no T-75. As bibliotecas foram então denominadas Vir-T0, Vir-T75, Pol-T0 e Pol-T75 onde a sigla Pol remete ao histórico de poluição, e Vir sem histórico de contaminação.

Os genes *rrs* da comunidade foram amplificados usando os iniciadores específicos B8F (5-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', Edwards *et al.*, 1989) e U1406R (5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3', Lane, 1991). As misturas de reação (25 µL) contendo 10,2 mM Tris, 2,3 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 2% DMSO, 5 µg BSA, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada iniciador, e 0,5 U de Taq DNA polimerase. PCR foi realizado em um aparelho Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Nieuwerkerk a/d IJssel, The Netherlands) sob reação de 95°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 1 min, 57,5°C por 30 seg., 72°C por 4 min com um último passo de alongamento de 72°C por 7 min.

Os amplicons foram então ligado em vetor pGEM-T easy vector (Promega, Madison, USA) de acordo com instruções do fabricante. Os produtos da ligação foram então inseridos para células competentes *Escherichia coli* MM294 (Sylphium Life Sciences, Groningen, The Netherlands) por transformação de acordo com protocolo do fornecedor do plasmídeo, depois as células foram plaqueadas em meio seletivo e crescidas a 37°C (Sambrook & Russell, 2001). Colônias brancas foram selecionadas e analisadas em gel de agarose para verificação do tamanho do inserto. Aquelas contendo insertos de tamanho correto foram então seqüenciadas. Reações de seqüenciamento foram realizadas em material plasmidial de acordo com o PE ABI Prism protocol (Applied Biosystems, Foster City, USA) usando se o

iniciador 1406r de modo a evitar contaminação das seqüências por vetor. O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador de DNA ABI377 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

As seqüências foram depositadas no Genbank sob os números de acesso EU420182-EU420589, EU420591-EU420597 e EU420599-EU420603.

ANÁLISE DE SEQUENCIA- ÁLISR DNA.

Todos os cromatogramas foram analisados utilizando o software Bioedit (Hall, 1999). Seqüências contendo bases ambíguas foram então retiradas das análises. Seqüências de vetor foram detectadas usando se o VecScreen encontrado no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) e quando existentes essas seqüências foram então apagadas. As seqüências foram então analisadas para a presença de quimeras usando a ferramenta Chimera-check do Greengenes (http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-bel3_interface.cgi, DeSantis *et al.*, 2006). As seqüências foram então classificadas usando-se a ferramenta de classificação encontrada no Greengenes. Como essa ferramenta permite a classificação por diversos sistemas de classificação foi selecionada para esse estudo a sistemática de Hugenhotlz, pois essa permite a melhor classificação de seqüências de grupos sem representantes cultiváveis (Hugenholtz & Pace, 1996).

As seqüências foram então alinhadas usando-se o software ClustalX (Thompson *et al.*, 1997), e o alinhamento obtido, após pequenas edições (extremidades) foi usado para construção de matriz de distância usando Phylip 3.66 usando o modelo de distancia de Jukes e Cantor (Jukes & Cantor, 1969). Essa matriz foi então usada para determinação de UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais), cálculo de riqueza (estimações) e de índices de diversidade utilizando-se o software DOTUR (Schloss & Handelsman, 2005). O índice de similaridade selecionado foi o de 97% que representa *grosso modo* o nível de similaridade de espécies para seqüências de rDNA 16S. Alinhamentos, construção de matrizes de similaridade foram feitas para cada dupla de bibliotecas para comparação usando o LIBSHUFF (Singleton *et al.*, 2001). Para melhor se ajustar ao propósito deste estudo, ao invés de comparar todas as bibliotecas entre si (o que levaria a necessidade de correção da probabilidade), consideramos mais adequada a comparação pareada das bibliotecas.

Para comparação das bibliotecas por análise de componente principal, um alinhamento contendo as seqüências de todas as bibliotecas foi usado para determinação de UTOs (97% de similaridade) usando-se o DOTUR. Com esse agrupamento das seqüências, foi montada uma matriz onde para cada UTO foi identificada sua presença em cada uma das bibliotecas e sua abundância relativa ao total marcada. Essa matriz foi então usada de entrada no software

Statistica (ver. 6.0, StatSoft) e Canoco (ver. 4.5, Biometris) para realização de análise de componente principal (PCA).

PCR EM TEMPO-REAL DO RDNA 16S

Com o objetivo de quantificar a comunidade bacteriana nas diversas amostras obtidas nesse estudo foi testado e aplicado um sistema de PCR em Tempo-real. Utilizando-se dos iniciadores P1 (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') e P2 (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'), descritos por (Muyzer, Dewaal & Uitterlinden, 1993) se aplicou o seguinte protocolo de PCR: 10 μ L contendo 5 μ L do tampão 2x (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Qiagen, The Netherlands), 0.2 μ M de cada iniciador e 1 μ L de DNA molde (100x diluído). PCR foi realizado em um aparelho Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) sob reação de 95°C por 15 min.; 30 ciclos de 94°C por 1 min., 55°C por 1 s, 72°C por 1 min. com curva de dissociação ao final para verificar contaminação por dímeros dos iniciadores. A coleta de dados foi realizada durante a fase de anelamento.

Com o objetivo de obter quantificação absoluta do número de cópias deste gene na amostra, foi montada uma curva padrão que consistia de um clone contendo o gene *rrs* (obtenção descrita acima) cujo inserto foi amplificado, quantificado em espectrofotômetro e diluído às concentrações (10^7 , 10^8 , 10^{10} e 10^{11} cópias/ μ L) e aplicadas em triplicatas em todas as corridas juntamente com as amostras a serem quantificadas.

BIBLIOTECA DE CLONES DO GENE *nifH*

Quatro amostras foram selecionadas para construção de biblioteca de clone do gene *nifH* (figura 1). As amostras provenientes dos mesocosmos que receberam adição de óleo (tanto o com histórico de contaminação como o sem) no T-0 e no T-75 as bibliotecas foram então denominadas Vir-T0, Vir-T75, Pol-T0 e Pol-T75 onde a sigla Pol remete ao histórico de poluição, e Vir o contrário.

Os genes *nifH* da comunidade foram amplificados usando os iniciadores específicos FGPH19 (5'- TAC GGC AAR GGT GGN ATH G -3', Simonet *et al.*, 1991) e PolR (5'- ATS GCC ATC ATY NTCR CCG GA -3', Poly, Monrozier & Bally, 2001) segundo apresentado anteriormente (Diallo *et al.*, 2004). As misturas de reação (25 μ L) contendo 10,2 mM Tris, 2,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 μ M de cada iniciador, e 2,5 U de Taq DNA polimerase. A PCR foi realizada em um aparelho PerkinElmer GeneAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Nieuwerkerk a/d IJssel, the Netherlands) sob reação de 95°C por 5 min.; 30 ciclos de 94°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 1 min. com um último passo de alongamento de 72°C por 7 min.

Os amplicons foram então ligados em vetor pGEM-T easy vector (Promega, Madison, USA) de acordo com instruções do fabricante. Os produtos da ligação foram então inseridos para células competentes *Escherichia coli* MM294 (Sylphium Life Sciences, Groningen, The Netherlands) por transformação de acordo com protocolo do fornecedor do plasmídeo, depois as células foram plaqueadas em meio seletivo e crescidas a 37°C (Sambrook & Russell, 2001). Colônias brancas foram selecionadas e analisadas em gel de agarose para verificação do tamanho do inserto. Aquelas contendo insertos de tamanho correto foram então seqüenciadas. Reações de seqüenciamento foram realizadas em material plasmidial de acordo com o PE ABI Prism protocol (Applied Biosystems, Foster City, USA) usando-se o iniciador SP6 (Promega, Madison, USA) de modo a evitar contaminação das seqüências por vetor. O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador de DNA ABI377 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

ANÁLISE DE SEQUÊNCIA- NIFH.

Todos os cromatogramas foram analisados usando o software Bioedit (Hall, 1999). Seqüências contendo bases ambíguas foram então retiradas das análises. Seqüências de vetor foram detectadas usando-se o VecScreen encontrado no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) e essas seqüências foram então apagadas usando através do Bioedit. As seqüências foram então classificadas usando-se a ferramenta através do BLAST-n do NCBI (Altschul *et al.*, 1990). A seqüência de organismo cultivável mais próxima foi então selecionada para construção de árvores filogenéticas. Quando não havia seqüências oriundas de organismos cultiváveis dentre as 50 mais similares foi selecionada a seqüência mais similar do banco de dados para o alinhamento.

As seqüências foram então alinhadas usando-se o software ClustalX (Thompson *et al.*, 1997), e o alinhamento obtido, após pequenas edições (extremidades), foi usado para construção de matriz de distância através do programa Phylip 3.66 utilizando o modelo de substituição de Jukes e Cantor (Jukes & Cantor, 1969). Foram construídos alinhamentos e matrizes de similaridade para cada dupla de bibliotecas para comparação usando o J-LIBSHUFF (Schloss, Larget & Handelsman, 2004).

A construção de árvores filogenéticas pelo método de Neighbor-joining foi realizada usando o software MEGA 4 usando o modelo de substituição de Jukes e Cantor com o teste de Bootstrap de 1000 repetições.

PCR EM TEMPO-REAL- NIFH.

Com o objetivo de quantificar a comunidade diazotrófica presente nas amostras o protocolo de PCR para detecção do gene *nifH* (Diallo *et al.*, 2004) foi adaptado para utilização em PCR em tempo-real. Os iniciadores específicos FGPH19 (Simonet *et al.*, 1991) e PolR (Poly, Monrozier & Bally, 2001) foram utilizados na reação de 10 µL contendo 5 µL do tampão 2x (QuantiTect SYBR Green PCR Kit Qiagen, The Netherlands), 0.5 µM de cada iniciador e 1 µL de DNA molde. PCR foi realizado em um aparelho Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) sob reação de 95°C por 15 min; 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 s, 72°C por 1 min com curva de dissociação ao final para verificar contaminação por dímeros dos iniciadores. A coleta de dados foi realizada durante a fase de anelamento.

Com o objetivo de obter quantificação absoluta do número de cópias do gene na amostra, foi montada uma curva padrão que consistia de um clone contendo o gene *nifH* (obtenção descrita acima) cujo inserto foi amplificado, quantificado em espectrofotômetro e diluído de modo a obter as concentrações (10^7 , 10^8 , 10^{10} e 10^{11} cópias/µL) e aplicadas em triplicatas em todas as corridas juntamente com as amostras a serem quantificadas.

RESULTADOS

HIDROCARBONETOS TOTAIS DE PETRÓLEO

Para o propósito desse trabalho, devido a dificuldade de se obter uma amostragem padronizada, optou-se pela utilização de quantificações relativas dos hidrocarbonetos. Essa dificuldade de amostragem pode ser observada nos valores absolutos dos HTPs. Os valores observados na amostra Vir T75 são superiores os observados em VirT0. Esse aparente aumento se deve a diferenças na amostragem, que no T75 carregaram menor quantidade de sedimento de profundidade ficando assim enriquecidos de HTPs se comparados com amostras mais profundas. Assim, os valores, tanto expressos abaixo (tabela 2) quanto os utilizados para análises posteriores, sempre expressos em quantidades relativas.

Inicialmente, para avaliar as diferenças na resposta da comunidade a adição de óleo, quatro amostras foram usadas para quantificação dos hidrocarbonetos totais de petróleo por cromatografia gasosa (figura 3). A observação do perfil cromatográfico da amostra indicou uma diferenciação da degradação dos hidrocarbonetos entre os dois manguezais. Enquanto os perfis observados para as amostras obtidas no início do experimento apresentaram perfis cromatográficos bastante similares entre si (figura 3-A e B), os perfis obtidos das amostras após setenta e cinco dias (figura 3-C e D) apresentaram grandes diferenças. Ficou evidente a grande diminuição na quantidade relativa de hidrocarbonetos resolvidos (picos) na amostra Pol T75 (figura 3-D) enquanto na amostra Vir T75 essa foi menos evidente. Observa-se, entretanto, a diminuição dos picos de alguns dos hidrocarbonetos resolvidos, comparando-se com os não resolvidos.

Tabela 1: Quantidades relativas* de hidrocarbonetos totais de petróleo observados nas amostras.

	Vir T0	Vir T75	Pol T0	Pol 75
<i>n</i> C10	0,044743	N.D.	0,017615	N.D.
<i>n</i> C11	0,135124	N.D.	0,131469	N.D.
<i>n</i> C12	0,425609	0,003144	0,281914	N.D.
<i>n</i> C13	0,499337	0,029837	0,360967	N.D.
<i>n</i> C14	0,649111	0,177695	0,486063	N.D.
<i>n</i> C15	0,62724	0,359059	0,512844	N.D.
<i>n</i> C16	0,730112	0,398993	0,656342	N.D.
<i>n</i> C17	0,851955	0,547725	0,712697	N.D.
Pri	0,555621	0,635909	0,510481	N.D.
<i>n</i> C18	0,810269	0,529907	0,670306	N.D.
Phy	0,364845	0,467262	0,361468	N.D.
<i>n</i> C19	0,866817	0,597512	0,711766	N.D.
<i>n</i> C20	0,768109	0,502096	0,585882	N.D.
<i>n</i> C21	0,736278	0,413493	0,521365	N.D.
<i>n</i> C22	0,69807	0,368318	0,483055	N.D.
<i>n</i> C23	0,725316	0,360282	0,508189	N.D.
<i>n</i> C24	0,565265	0,270875	0,370276	N.D.
<i>n</i> C25	0,625976	0,351617	0,425341	N.D.
<i>n</i> C26	0,493012	0,242925	0,31607	N.D.
<i>n</i> C27	0,495015	0,258298	0,314065	N.D.
<i>n</i> C28	0,417545	0,27105	0,274037	N.D.
<i>n</i> C29	0,388297	0,285864	0,248545	N.D.
<i>n</i> C30	0,291697	0,221054	0,184816	N.D.
<i>n</i> C31	0,358521	0,542484	0,261363	N.D.
<i>n</i> C32	0,260762	0,333205	0,162904	N.D.
<i>n</i> C33	0,202686	0,270351	0,13018	N.D.
<i>n</i> C34	0,166164	0,19471	0,148082	N.D.
<i>n</i> C35	0,096811	0,12728	0,05485	N.D.
<i>n</i> C36	0,060658	0,047656	0,038238	N.D.
<i>n</i> -Alcanos:	12,99065	7,705393	9,56931	N.D.
HRP	22,77428	15,38563	18,23452	4,95927
UCM	77,22572	84,61437	81,76548	95,04073
HTP (%)	100	100	100	100
HTP **	18,64 g/kg	28,62 g/kg	13,96 g/kg	3,92 g/kg

*- Valores expressos como porcentagens do total de HTP; UCM - Unresolved Complex Mixture (mistura complexa não resolvida) ; HTP - Hidrocarbonetos Totais do Petróleo; HRP - Hidrocarbonetos Resolvidos do Petróleo. **- quantidade absoluta observada. N.D. - não detectados.

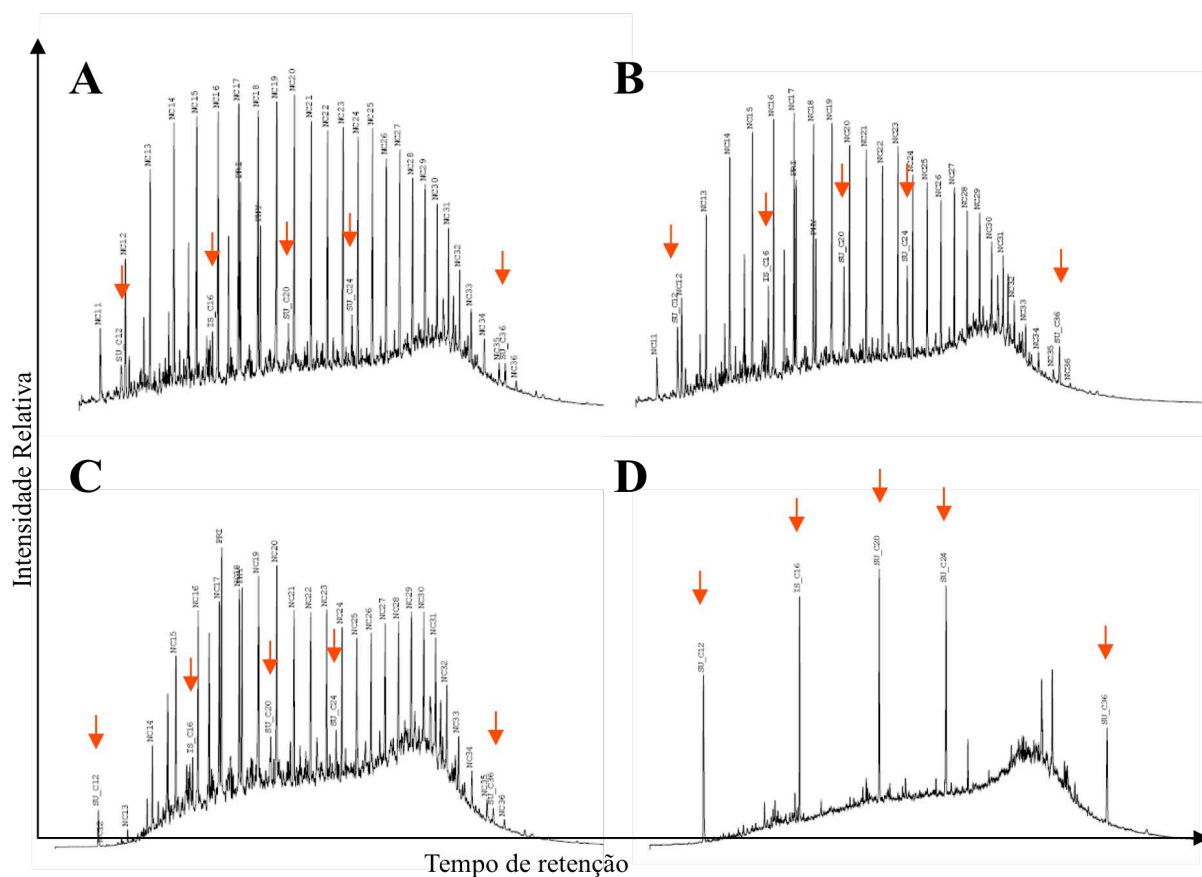


Figura 3: Quantidades relativas de hidrocarbonetos totais de petróleo nas amostras; A- Vir T0, B- Pol T0, C- Vir T75, D- Pol T75. Picos assinalados com setas vermelhas são os padrões adicionados às corridas.

De acordo com a tabela 2, com relação ao mesocosmo Vir, pode-se observar que houve uma queda de aproximadamente 40% tanto nos HRP's quanto nos n-alcenos em geral ao final de 75 dias de incubação. O oposto se observa para a fração UCM onde um aumento de 10% na quantidade relativa deste composto ao longo do experimento. Isso mostra que aparentemente ocorreu degradação da fração resolvida (de mais fácil degradação) enquanto a fração complexa (mais refrataria a degradação) não apresentou grandes alterações. A fração de C10 a C27 foi a que apresentou maior queda na quantidade relativa (de 100% a 40%), enquanto os alcanos mais longos apresentaram pequena diminuição ou até aumento.

Já com relação ao mesocosmo Pol observa-se queda total de todos os n-alcenos após o mesmo tempo de incubação. Indicando que os microrganismos hidrocarbonoclasticos nesse ambiente estavam mais aptos a degradar esse material prontamente.

PCR-DGGE- BACTÉRIA

Os perfis observados para as comunidades bacterianas em todas as amostras mostraram-se bastante complexos (figura 4), apresentando do um grande número de filotipos (bandas) Os filotipos observados nas amostras de ambos os manguezais são bastante similares quanto a sua presença, porém as abundâncias relativas não eram equivalentes. As bandas dominantes em um manguezal embora estivessem presentes no outro não demonstravam intensidade equivalente.

Uma importante observação com relação aos mesocosmos controle (sem adição de óleo) é o fato de ambos terem apresentado uma alta estabilidade. Ambos apresentaram apenas um pequeno número de bandas que mostraram alteração (2-3 bandas), e essas alterações não foram persistentes ao longo do tempo, não podendo ser observadas em mais de uma amostra. Essa observação reforça qualquer alteração observada nos microcosmos que receberam adição de óleo, pois se pode considerar que o projeto do mesocosmo não levou a alteração da comunidade.

Ao longo do experimento, o mesocosmo Pol que recebeu óleo mostrou, surpreendentemente, uma grande estabilidade da comunidade bacteriana. Grande parte das bandas observadas inicialmente não apresentou mudanças na sua intensidade. No mesocosmo proveniente do manguezal sem contato prévio com hidrocarbonetos, pode-se observar o surgimento de bandas (1-4 bandas) que não estavam presentes no início do experimento ou na amostra anterior. Contrariamente, nas amostras provenientes do manguezal com histórico de poluição, grande parte das alterações observadas é devido à alteração na intensidade relativa das bandas, e menos ao surgimento ou desaparecimento destas (variando de uma (T-7) a nove (T-66) bandas por amostra).

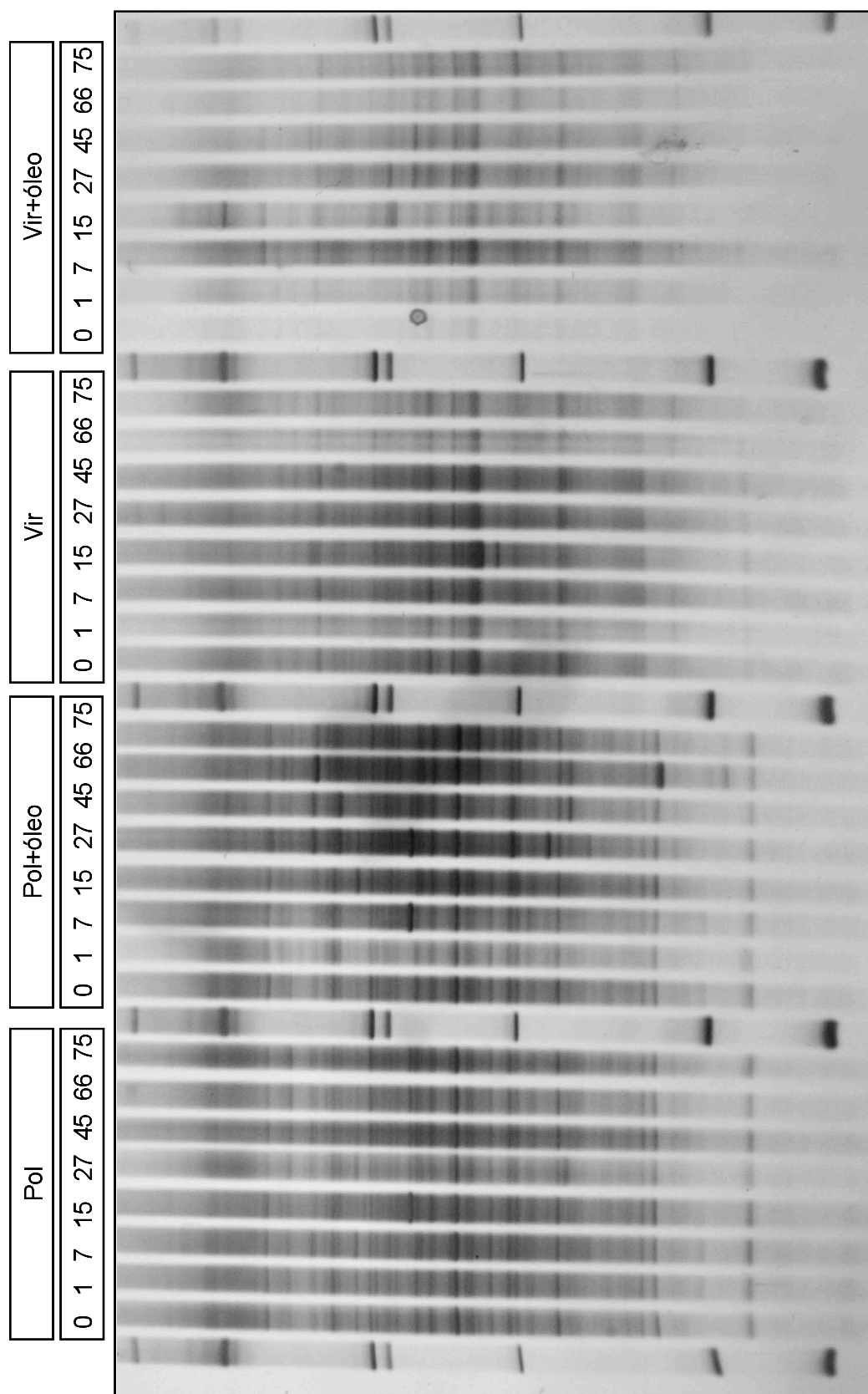


Figura 4: Perfis de DGGG do gene *rrs* bacteriano proveniente dos quatro mesocosmos. A numeração das trilhas indica a data de amostragem.

As comunidades em todos os mesocosmos apresentaram grande número de filotipos (figura 4). O número de filotipos observados variou de 51 (Pol T75) a 13 Vir+óleo T0. A média de filotipos observados foi de $33,3 \pm 7,5$, $34,3 \pm 3,9$, $24,0 \pm 2,9$ e $21,3 \pm 4,2$ no mesocosmos Pol, Pol+óleo, Vir e Vir+óleo, respectivamente.

A Figura 5 mostra ordenação de MDS usando similaridades entre as amostras por Bray-Curtis. As amostras podem ser separadas em dois grandes grupos baseados em seus manguezais de origem (com ou sem histórico de poluição). Dentro destes grupos formados pode-se distinguir também a separação das amostras entre as que receberam adição de óleo e aquelas que não receberam. Entretanto, as amostras oriundas do manguezal com histórico de poluição (Pol e Pol+óleo) não apresentaram uma separação tão clara quanto às amostras sem histórico de contaminação. A inspeção visual dos gráficos de MDS, aparentemente, indica que as comunidades presentes nos mesocosmos são diferentes e, portanto, seu comportamento ao longo do tempo também. Esse resultado é corroborado pelo teste de ANOSIM que mostrou que as diferenças acima indicadas são de fato significativas a exceção da comparação pareada de Pol e Pol+óleo que de acordo com o teste apresentam alguma sobreposição entre os grupos (R pareado de 0,477 e nível de significância de 0,1%).

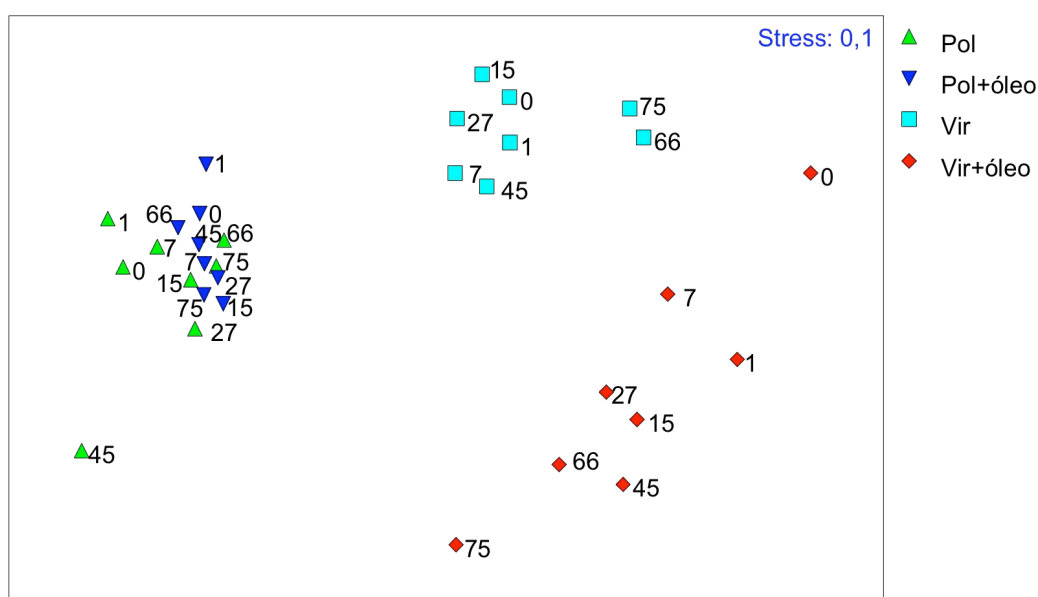


Figura 5: Diagramas de ordenação em duas dimensões. Análise de MDS dos perfis de PCR-DGGE da comunidade bacteriana nas amostras; valores ao lado dos pontos representam o dia das amostragens.

Comparando as bandas que aparecem nos dois mesocosmos (poluído e sem poluição) após a adição de óleo é visível que suas posições não são as mesmas indicando que esses filotipos não são os mesmos. As mudanças observadas no mesocosmo oriundo do manguezal poluído são menores que as do não poluído. Esse resultado indica que possivelmente a comunidade bacteriana presente no ambiente com histórico de contato com

hidrocarbonetos, devido a esse contato prévio, já havia selecionado populações microbianas mais aptas a viver sob essa condição e assim foi capaz a responder mais rapidamente a adição de óleo.

PCR-DGGE- CRCHAEA

O perfil da comunidade observada para o domínio Archaea mostrou, assim como foi observado para o domínio Bactéria, um perfil bastante complexo (figura 6). Um fator diferencial entre ambas as comunidades é o fato do perfil observado para as Archaeas indicar uma maior estabilidade desta comunidade. Isso se deve à grande parte das bandas em todos os mesocosmos não apresentaram nenhuma alteração na intensidade.

O padrão observado no manguezal poluído foi diferente do observado para o não poluído. Entretanto a maioria das bandas observadas nas amostras estavam presentes em ambos os manguezais, embora sua intensidade relativa variasse entre os manguezais.

A riqueza de filotipos archaea observados variou de 31 (Pol T27) a 21 (Vir T7), com medias de $25,3 \pm 2,2$, $27,3 \pm 1,8$, $28,1 \pm 1,5$ e $26,75 \pm 1,3$ no mesocosmos Vir, Vir+óleo, Pol e Pol+óleo, respectivamente.

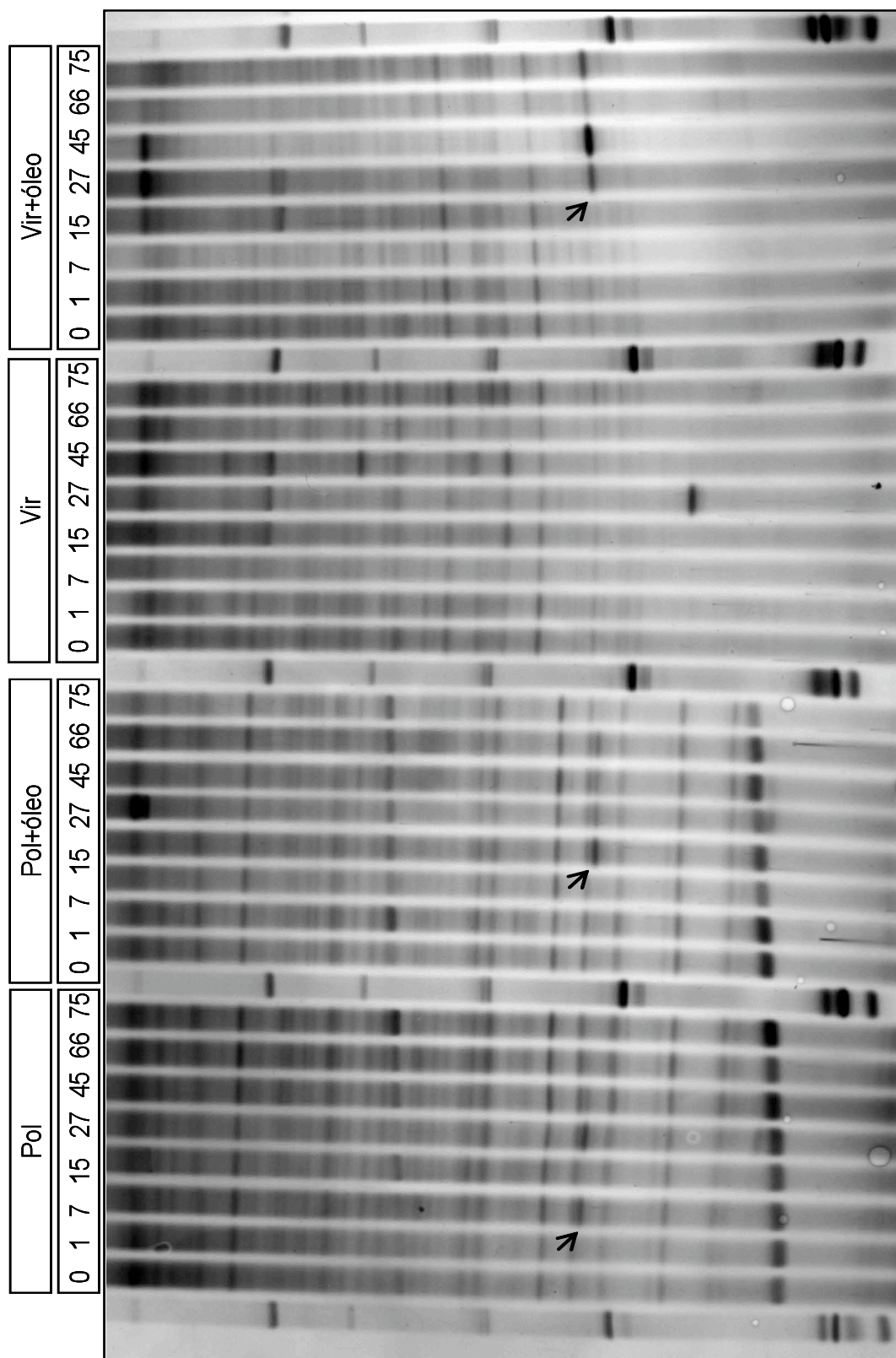


Figura 6: Perfis de DGGGE do gene *rrs* da comunidade Archaea proveniente dos quatro mesocosmos. / numeração das trilhas indica a data de amostragem.

Figura 7 mostra ordenação de MDS usando similaridades entre as amostras por Bray-Curtis. Assim como observado para as comunidades bacterianas, as amostras podem ser separadas em dois grandes grupos baseados em seus manguezais de origem (com ou sem histórico de poluição). Entretanto, as comunidades archaeas podem ser melhor separadas entre as que receberam adição de óleo e aquelas que não receberam. O teste de ANOSIM mostrou que as diferenças acima indicadas são de fato significativas.

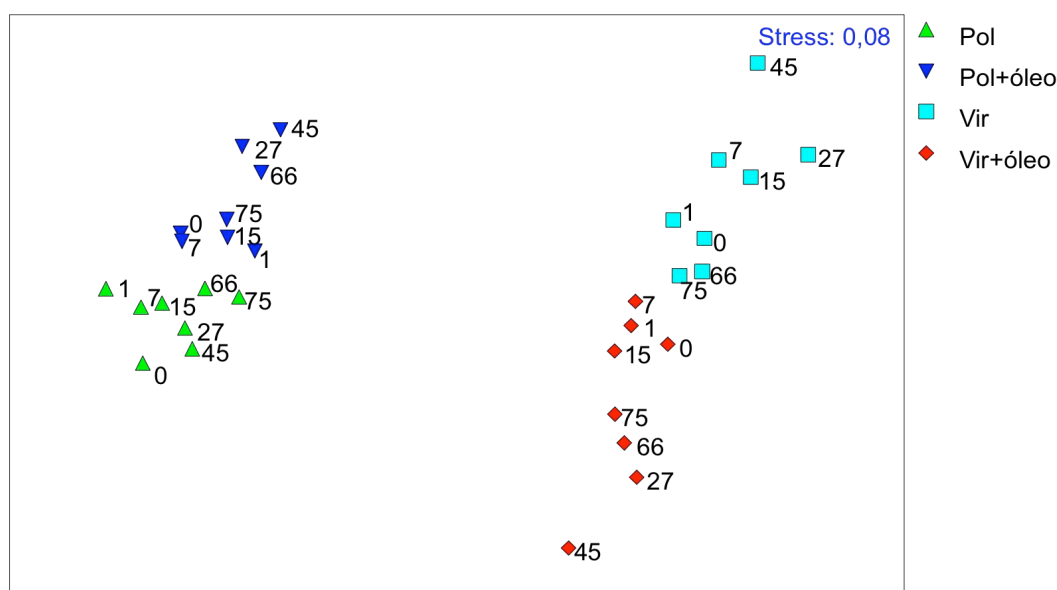


Figura 7: Diagramas de ordenação em duas dimensões. Análise de MDS dos perfis de PCR-DGGE das comunidades archaea presentes nas amostras; valores ao lado dos pontos representam o dia das amostragens.

A comunidade Archaea de ambos os ambientes mostraram certa consistência quanto à resposta a adição de hidrocarbonetos. A banda mais proeminente que surgiu em resposta a adição de óleo em ambos os sistemas apresentavam a mesma posição no DGGE, o que indica que esta pode ser a mesma população (figura 6, seta). Essa banda, como pode ser observada na figura 6, já estava presente na amostra mesmo antes da adição de óleo na amostra proveniente do manguezal poluído. As demais alterações observadas nas amostras não se referem ao surgimento de filotipos, mas a mudanças na intensidade destas.

Conforme mencionado anteriormente as alterações observadas nas archaeas após a adição de óleo foram menos intensas do que as vistas para as comunidades bacterianas. Esse comportamento indica que as Archaeas dominantes não foram diretamente afetadas pelos hidrocarbonetos, seja positivamente (fonte de carbono), ou negativamente (toxicidade), e como

as alterações observadas na comunidade bacteriana não foi tão intensas, o efeito indireto da adição de óleo pode ser muito sutil para ser notado.

BIBLIOTECAS DE CLONE DE RDNA 16S BACTERIANO

Com o objetivo de estender a compreensão da dinâmica da comunidade microbiana sob as condições experimentais criadas para esse trabalho, quatro bibliotecas de clone foram construídas a partir de amostras oriundas dos mesocosmos que receberam adição de óleo (Poluído e não poluído), tanto no início do experimento (T-0) quanto no final do experimento (T-75).

Um total de 420 clones foram seqüenciados (tabela 3) encontrando um número de UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais) variando de 61 a 89. O número de UTOs estimado (Chao1) para as amostras variou de 208 a 326. O baixo número de UTOs estimado se deve principalmente a esses índices sofrerem influência do tamanho da amostragem, isto é quanto maior a amostragem maior a estimativa. A riqueza estimada para as amostras não pode ser considerada como diferente, entretanto a média observada para a biblioteca Vir-T0 apresentou média levemente superior (326,2 UTOs) às observadas nas demais bibliotecas. A riqueza observada pelo estimador ACE apresentou comportamento semelhante ao observado por Chao1 (tabela 3).

A diversidade capturada nas quatro bibliotecas foi então calculada usando-se o índice de diversidade de Shannon (H') e pelo recíproco do índice de Simpson ($1/D$). Assim como a riqueza, a diversidade calculada não pode ser considerada diferente entre as quatro bibliotecas. No entanto, a média observada na biblioteca Vir-T0 foi levemente mais baixa que as demais, o que indica uma menor equitabilidade dentro desta biblioteca (tabela 3).

Tabela 3: Índices de diversidade e riqueza estimadas para as quatro bibliotecas*.

	Número de clones	UTOs encontrados	Índice de Shannon (H')	Recíproco do índice de Simpson ($1/D$)	Estimador Chao1	Estimador ACE
Vir T0	81	61	394.40 (374.89; 413.92)	79.02	326.2 (167.45; 1721.69)	338.28 (184.12; 685.44)
Vir T75	114	89	438.95 (424.29; 453.60)	174.08	231.05 (162.36; 364.07)	289.46 (184.91; 507.96)
Pol T0	96	73	417.53 (401.32; 433.75)	130.28	223.27 (143.70; 392.38)	245.30 (156.84; 427.09)
Pol T75	127	86	430.23 (416.05; 444.41)	117.94	208.00 (146.43; 332.29)	207.50 (150.73; 314.02)

* - valores calculados usando índice de similaridade de 0.97. Valores entre parêntesis representam os intervalos de confiança de 95%.

A aplicação de análise de curva de rarefação de cada uma das bibliotecas (figura 8) com definição de UTOs em três níveis diferentes de similaridade (0,01, 0,03 e 0,05) mostra que nenhuma delas capturou a totalidade da diversidade bacteriana encontrada nas amostras no nível de espécie (0,01 e 0,03 de similaridade). A biblioteca Pol T75 (figura 8-D) começa a iniciar a estabilização no que se refere a gênero (0,05 de similaridade). Isso indica que nessa amostra embora a diversidade de espécies (97% de similaridade), tal qual o das demais bibliotecas, essa diversidade se encontra restrita a um número de gêneros (95% de similaridade) menor que o observado nas outras bibliotecas.

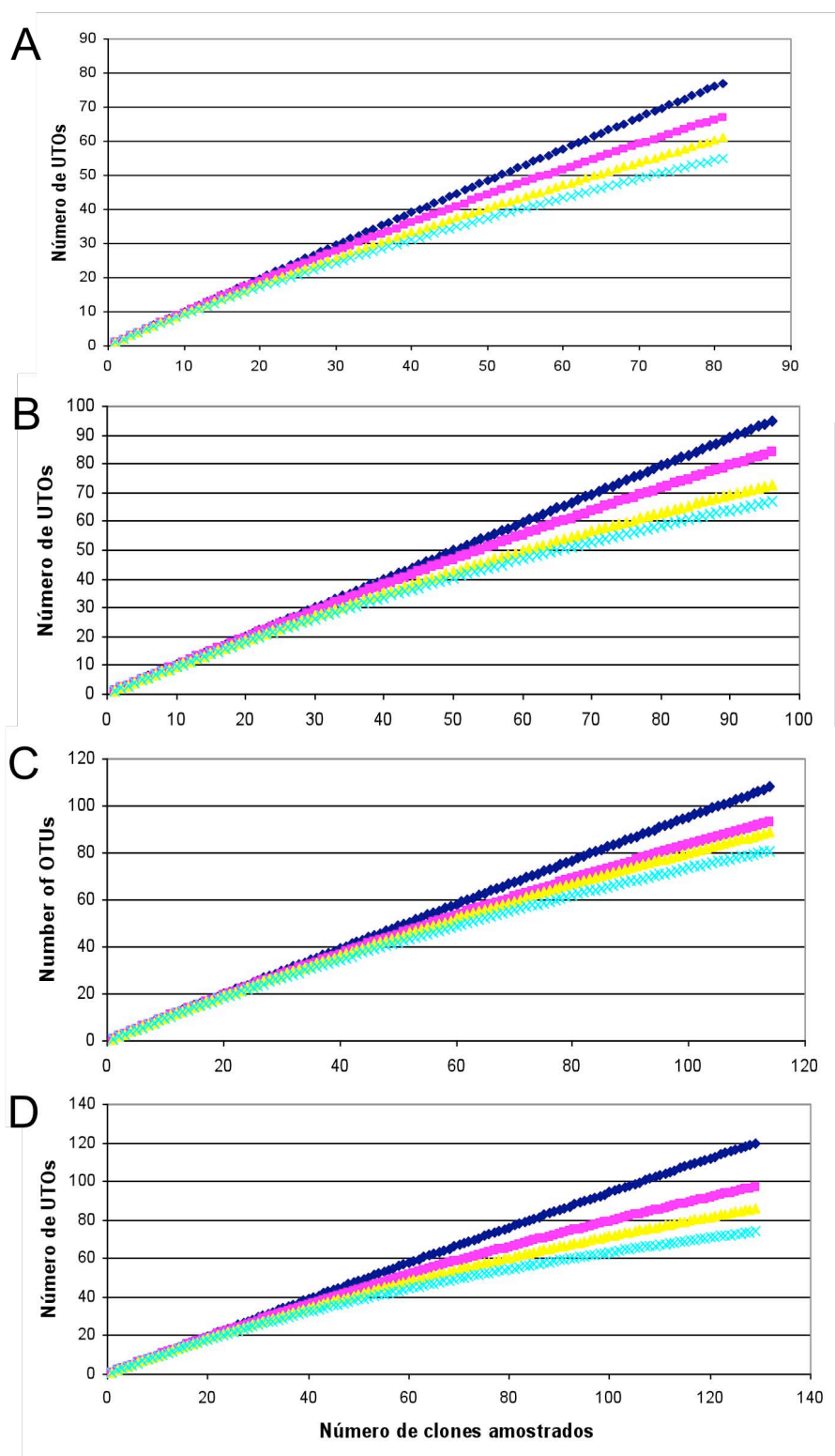


Figura 8: Análise de rarefação das quatro bibliotecas; A– Vir-T-0; B– Pol-T-0; C– Vir-T-75; D– Pol-T-75. círculo azul escuro– representa rarefação de clones únicos; Quadrado rosa – 99% de similaridade; triângulo amarelo – 97% de similaridade ; cruz azul clara – 95% de similaridade.

A análise de curva de rarefação (figura 9) comparando as quatro bibliotecas de clone mostra que todas as bibliotecas capturaram praticamente a mesma extensão da diversidade e indica que todas apresentam comunidades com diversidades semelhantes. De fato, todas as bibliotecas mostraram-se longe de atingir o limite superior da curva. Esse resultado está em concordância com o observado para as estimativas de diversidade e riqueza (tabela 3).

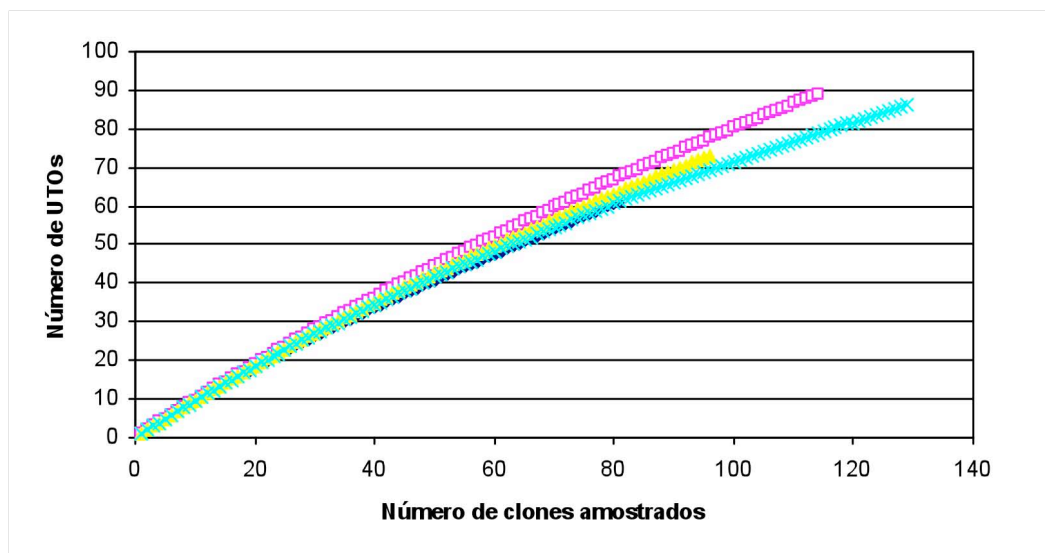


Figura 9: Análise de rarefação das quatro bibliotecas, as curvas representam: círculo azul escuro – Vir T0; Quadrado rosa – Vir T75; triângulo amarelo – Pol T0; cruz azul clara – Pol T75.

A classificação das seqüências pelo Greengenes (figura 10, Anexo I), mostra que em todas as bibliotecas o filo *Proteobacteria* foi o predominante (37,5 a 57,9% das seqüências obtidas). Após a contaminação houve uma alteração na composição das comunidades que apresentavam maior abundância de *Anaerolinea* nas amostras T0 e após setenta e cinco dias foram aparentemente substituídos pelas *Deltaproteobacterias*. As *Anaerolineas* apresentavam uma abundância de 29,6 e 23,9% nas amostras Vir-T0 e Pol-T0 respectivamente, ao fim do experimento continham 8,7 e 12,4%. Quanto as *Deltaproteobacterias*, suas abundâncias mudaram de 14,8 e 11,4 para 23,6 e 18,3% nas amostras Vir e Pol respectivamente. Observa-se que as alterações foram maiores nas bibliotecas oriundas do manguezal poluído que no sem histórico de poluição.

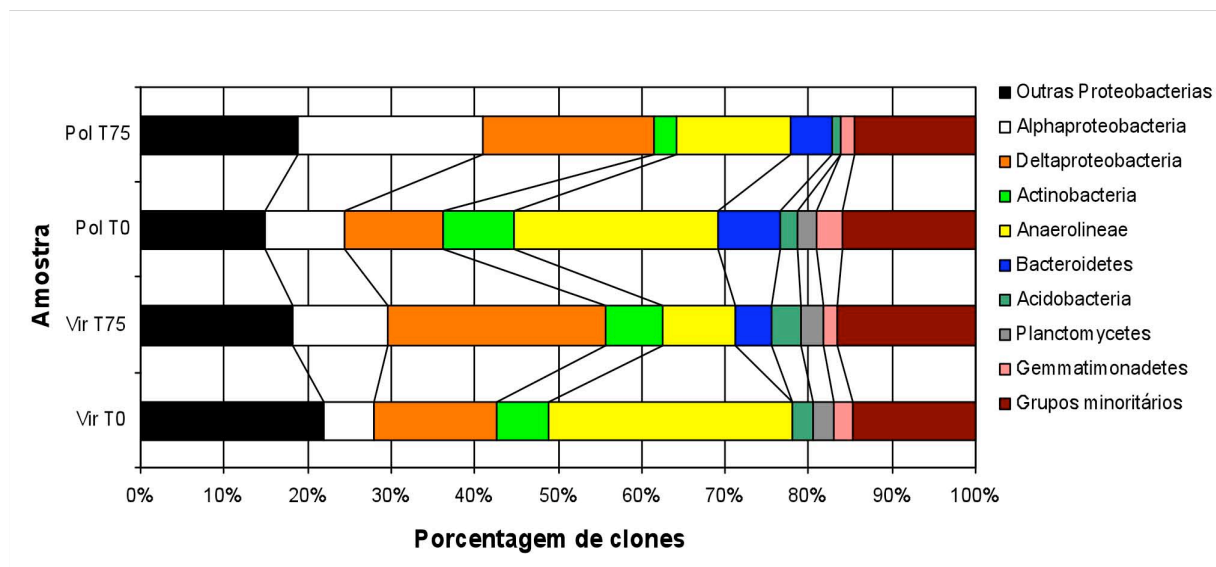


Figura 10: Gráfico de classificação das seqüências obtidas nas quatro bibliotecas de clones. Valores mostrados como abundância relativa ao total de seqüências.

De maneira geral as comunidades bacterianas observadas no início do experimento são mais similares entre si que ao final dos 75 dias. Entretanto, como as quatro bibliotecas mostraram semelhanças entre elas, para tirar conclusões mais precisas deve-se estender a análise destes dados. Por essa razão, todas as seqüências das quatro bibliotecas foram unidas para seleção de UTOs e agrupadas usando 97% de similaridade, permitindo-se assim identificar que clones pertencem a que UTO. Esses grupos foram então usados para construção de uma matriz mostrando a presença (e abundância relativa) de cada uma das UTO definidas nas quatro bibliotecas.

Na figura 11 observa-se o diagrama de Venn montado a partir da matriz de UTOs acima mencionada, pode-se observar que a grande maioria das UTOs encontradas nas bibliotecas são únicas para aquela biblioteca, e pequenas sobreposições são observadas entre as bibliotecas. A única exceção é entre as bibliotecas Vir T0 e Pol T0 que conforme acima mencionado são aparentemente mais similares entre si que as demais.

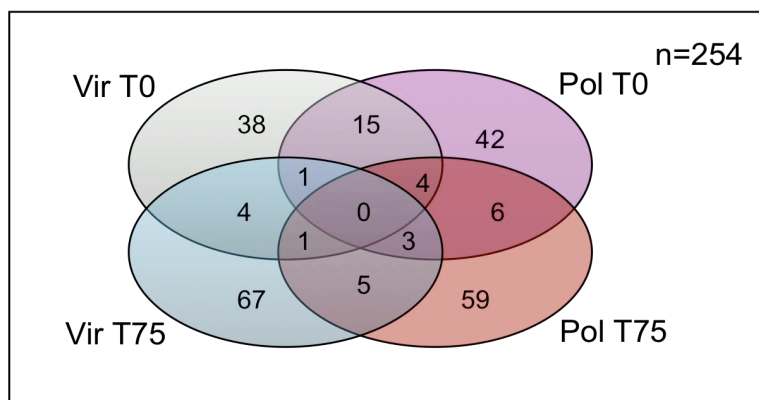


Figura 11: Diagrama de Venn das UTOs observadas nas bibliotecas das amostras dos mesocosmos. As interseções entre os conjuntos Vir T0 e Pol T75 ($n=6$) e Vir T75 e Pol T0 ($n=3$) não estão representadas no diagrama embora façam parte do universo do diagrama.

O gráfico de PCA (figura 12) mostra que as comunidades bacterianas nas bibliotecas Vir-T0 e Pol-T0 são mais similares entre si e ao fim do experimento estas são diferentes das iniciais e entre si. Embora a PCA não apresente a significância do resultado obtido, a elipse de correlação de 95% corrobora essa afirmação.

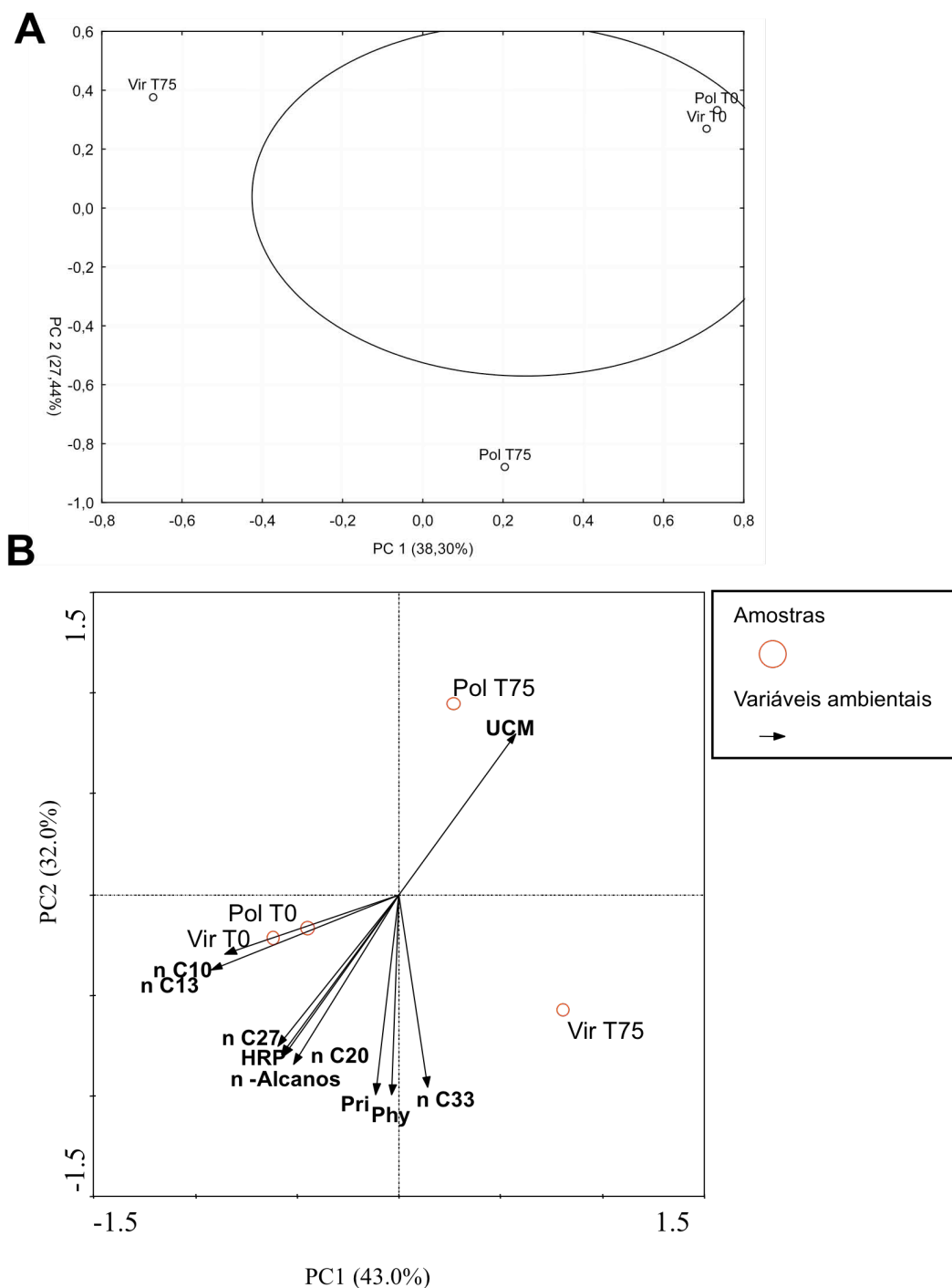


Figura 12: Diagramas de ordenação em duas dimensões. A- Análise de componente principal (PCA) e das quatro bibliotecas de clone. Os valores entre parêntesis representam a quantidade de variância representada por cada componente (PC). A elipse marca a faixa de correlação de 0,95 entre as amostras. B- Análise de componente principal (PCA) das quatro bibliotecas de clone. Setas indicam o comportamento das variáveis ambientais nas amostras. UCM- Mistura complexa não resolvida (unresolved complex mixture)

No gráfico da PCA (figura 12-B) se observa como as variáveis ambientais mensuradas (HTPs) se correlacionam com as comunidades presentes nas bibliotecas oriundas das amostras do T0. A amostra Pol T75 esta correlacionada com o aumento da quantidade relativa de UCMs enquanto a amostra Vir T75 se correlaciona com o aumento da fração de hidrocarbonetos maior que C27. Já as amostras do T0 se correlacionam com o aumento com maiores valores dos hidrocarbonetos de cadeia mais curta (C10, C13).

De acordo com a análise de *Libshuff* (tabela 4), as duas bibliotecas construídas a partir das amostras do tempo inicial (T0) não podem ser consideradas diferentes (menor $p=0,151$). A divergência observada entre as amostras ao fim do experimento é observada nessa análise. O menor valor de p observado para essas análises foi de 0,001, isto demonstra que essas bibliotecas são de fato diferentes e assim o padrão de dispersão das amostras observado na PCA é significativo. No entanto a análise mostrou um fato que não pode ser observado nas demais análises da biblioteca embora estivesse claro no DGGE. Como a análise de *Libshuff* avalia o quanto uma biblioteca cobre a diversidade contida em outra biblioteca, um resultado que indique que a diferença entre duas bibliotecas é não significativa indica que esta biblioteca é uma amostra da outra. Assim, a biblioteca Pol T75 pode ser considerada uma amostra da biblioteca Pol T0 ($p=0.467$) embora o oposto não seja verdadeiro, indicando que a comunidade ali presente ainda apresenta similaridade com a comunidade inicial.

Tabela 4: Delta-C e Valores de p para análises de *Libshuff** das bibliotecas de *rrs*

	Vir T0	Vir T75	Pol T0	Pol T75
Vir T0	-	0.884 (0.001)	0.074 (0.350)	-
Vir T75	0.763 (0.001)	-	-	0.373 (0.001)
Pol T0	0.138 (0.151)	-	-	0.619 (0.002)
Pol T75	-	0.799 (0.001)	0.081 (0.467)	-

* A tabela está organizada para representar a cobertura de X (colunas) por Y (linhas); valores de p apresentados entre parêntesis. Valores em negrito são considerados significantes.

PCR EM TEMPO-REAL- RDNA 16S.

Com o objetivo de determinar alterações no tamanho da comunidade bacteriana encontrada nas amostras em relação à contaminação por hidrocarbonetos foi desenvolvido um sistema de PCR em Tempo-real baseado nos iniciadores desenvolvidos por Muyzer *et al.* (1993). Esse sistema visando à detecção do domínio Bacteria foi adaptado para quantificação deste grupo de microrganismos. A seleção desses iniciadores se deve a estes gerarem banda única na reação de PCR sem presença de dímeros dos iniciadores.

Inicialmente, um clone de 16S da biblioteca anteriormente mencionada foi selecionado para seu uso como curva padrão (conforme descrito anteriormente nos M&M) (figura 13-A). Essa curva padrão foi adicionada a todas as quantificações para evitar qualquer diferença entre ensaios.

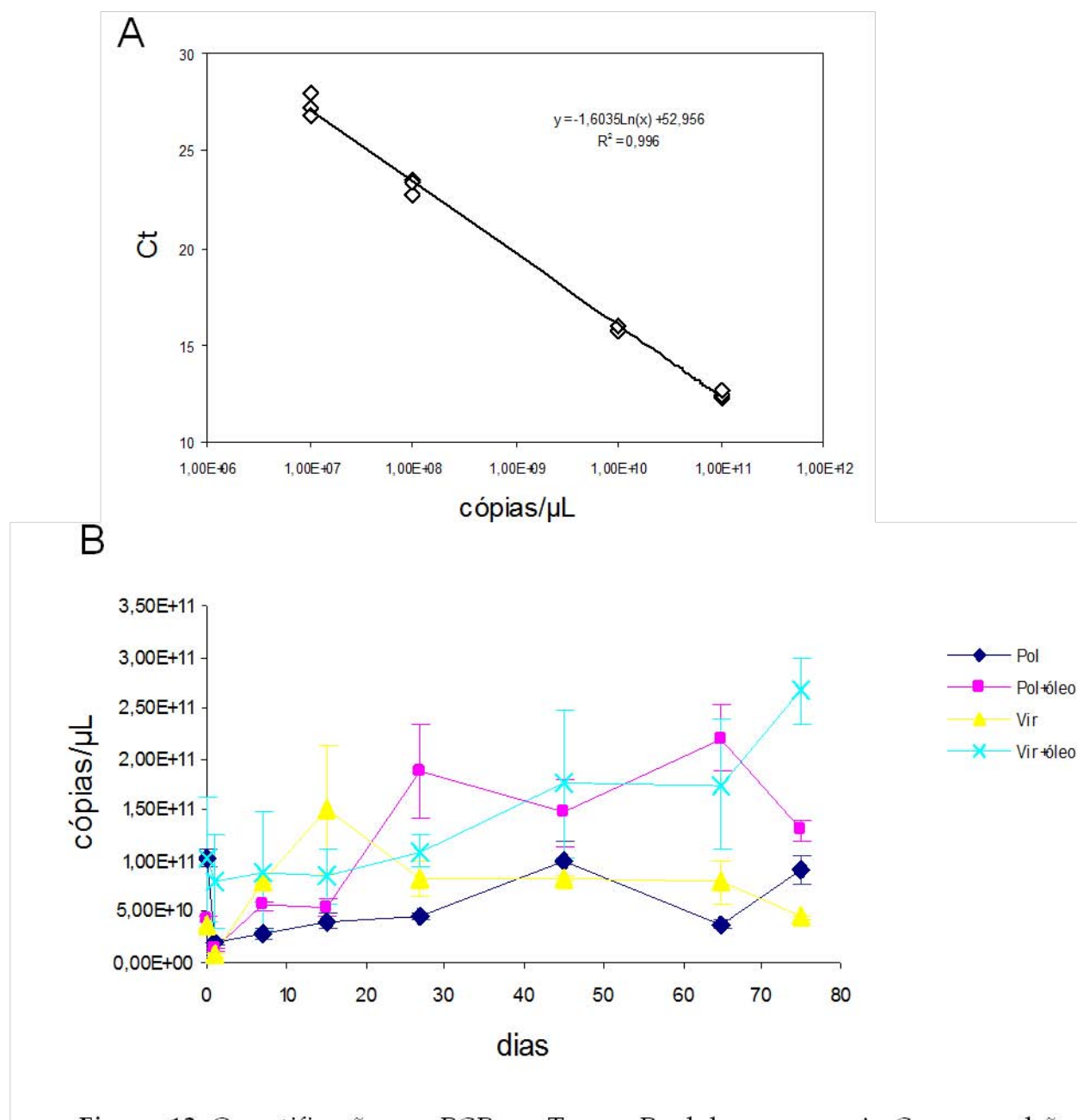


Figura 13: Quantificação por PCR em Tempo-Real do gene *rrs*. A- Curva-padrão de rDNA 16S; B- Quantificação do rDNA das amostras provenientes dos mesocosmos.

Como as amostras extraídas foram compostas a (exceção das amostras do microcosmo Vir+óleo) e não houve replica real dos mesocosmos o desvio padrão das amostras é devido à variação no PCR (figura 13-B). As amostras provenientes dos mesocosmos sem adição de óleo apresentaram a comunidade bacteriana bastante estável. Os dois mesocosmos onde foi adicionado óleo apresentaram poucas alterações apresentando aumento no tamanho da comunidade após 45 dias de experimento. Esse comportamento assemelha-se com o observado para a estrutura da comunidade analisado por PCR-DGGE, onde a adição de hidrocarbonetos as amostras levou a

alteração na estrutura da comunidade enquanto os controles apresentaram mais estabilidade. Outra característica em comum entre esse resultado e os observados para PCR-DGGE bacteriano, é o fato de as alterações no mesocosmo Pol serem maiores que as observadas em Vir.

DIVERSIDADE FUNCIONAL: BIBLIOTECA DE CLONES DE *nifH*

Como o nitrogênio é um dos elementos limitantes na degradação de compostos ricos em carbono, uma das hipóteses desse trabalho é que os microrganismos diazotróficos seriam especialmente afetados pela adição de hidrocarbonetos ao ambiente. Desta maneira, com o objetivo de avaliar o impacto da adição de óleo na comunidade diazotrófica optou-se pela construção de bibliotecas de clone do gene *nifH* que codifica para a proteína nitrogenase redutase.

Das quatro bibliotecas (Vir T0, Pol T0, Vir T75 e Pol T75) obteve-se um total de 63 clones que apresentaram seqüências de qualidade suficiente para análise (15, 10, 18, e 20, respectivamente).

As seqüências obtidas foram então comparadas com o banco de dados de seqüências Genbank encontrado no NCBI utilizando-se a ferramenta Blast-N (tabela 5). Inicialmente, pode-se perceber que aproximadamente metade dos clones obtidos pertence às Gamaproteobactérias. O segundo grupo de seqüências mais abundantes apresentou maior homologia às alfa-proteobactérias. Conforme foi apresentado anteriormente, embora o grupo das alfa-proteobactérias tenha sido bem representado nas bibliotecas de rDNA 16S (5-26% dos clones) nenhum clone relacionado as gamaproteobactérias foi detectado nessas bibliotecas.

Outra característica que pode ser observada para tanto na tabela 4 quanto pelas árvores filogenéticas (figuras 14 e 15) é a diminuição da diversidade de genes *nifH* encontrado nas bibliotecas. A biblioteca Pol T0 (figura 14-A), foram observados dois grandes grupos formados por quatro divisões do filo Proteobacteria (α , β , γ e δ). Ao fim do experimento (T75; Figura 14-B), observou-se uma severa diminuição da diversidade deste gene. Apenas um grupo de seqüências extremamente semelhante entre si pode ser observado semelhante ao grupo I das nitrogenases (Zehr *et al.*, 2003).

ário da classificação das seqüências obtidas nas bibliotecas de clone de *nifH*.

st N*	Filiação	Score	Valor-E	Nº de acc
sulfosporosinus orientis	Clostridiales; Peptococcaceae; Desulfosporosinus.	110	8,00E-20	AF227928
thylomonas methanica cultured bacterium**	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylomonas. Amostra ambiental.	333	3,00E-88	AF484674
rhodospirillum rubrum ATCC 11170 cultured bacterium	Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae; Rhodospirillum. Amostra ambiental.	150	4,00E-33	DQ140666
thylomonas rubra	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylomonas.	69,4	1,00E-08	CP000230
thylomonas methanica	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylomonas.	154	3,00E-34	DQ140666
thylomonas methanica	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylomonas.	230	5,00E-57	AF484674
thylomonas methanica	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylomonas.	278	2,00E-71	AF484674
thylomonas methanica cultured bacterium	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylomonas. Amostra ambiental.	351	9,00E-94	AF484674
xanthobacter autotrophicus Py2	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Xanthobacter.	366	3,00E-98	AF484674
azotomonas agilis	Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Azomonas.	279	5,00E-72	AB184888
thylomonas methanica	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylomonas.	988	1,00E-136	CP000783
pseudomonas azotifigens	Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.	313	4,00E-82	AF216888
thylomonas methanica cultured bacterium	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylomonas. Amostra ambiental.	361	2,00E-96	AF484674
xanthobacter autotrophicus Py2 cultured marine bacterium	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Xanthobacter. Amostra ambiental.	281	1,00E-72	AB189458
thylomonas methanica cultured marine bacterium	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylomonas. Amostra ambiental.	375	6,00E-101	AF484674
thylomonas rubra	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylomonas.	206	8,00E-50	AB184948
thylomonas methanica	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylomonas.	966	3,00E-133	CP000783
azotobacter vinelandii	Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Azotobacter.	427	2,00E-116	AY896433
thylomonas methanica	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylomonas.	390	2,00E-105	AY896433
thylomonas methanica	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylomonas.	289	8,00E-75	AF484674
thylomonas methanica	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylomonas.	340	2,00E-90	AF484674
azotobacter vinelandii	Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Azotobacter.	381	1,00E-102	M20568
thylomonas methanica	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylomonas.	351	1,00E-93	AF484674
thylomonas methanica	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylomonas.	337	3,00E-89	AF484674
thylomonas methanica	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylomonas.	350	3,00E-93	AF484674
geobacter sulfurreducens PCA	Deltaproteobacteria; Desulfuromonadales; Geobacteraceae; Geobacter.	254	3,00E-64	AE017188
azotobacter vinelandii	Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Azotobacter.	399	3,00E-108	M20568
zoogloea oryzae cultured bacterium	Betaproteobacteria; Rhodocyclales; Rhodocyclaceae; Zoogloea. Amostra ambiental.	381	1,00E-102	AB201048
thylomonas methanica cultured bacterium	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylomonas. Amostra ambiental.	204	3,00E-49	AF286688

Resultados

st N*	Filiação	Score	Valor-E	Nº de acc
uncultured bacterium	Amostra ambiental.	344	2,00E-91	DQ82573
otobacter chroococcum	Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Azotobacter.	292	6,00E-76	M73020
seudomonas azotifigens	Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.	342	5,00E-91	AB18945
sulfovibrio dechloracetivorans	Deltaproteobacteria; Desulfovibrionales; Desulfovibrionaceae; Desulfovibrio.	270	3,00E-69	DQ33720
ctothiorhodospira shaposhnikovii	Gammaproteobacteria; Chromatiales; Ectothiorhodospiraceae; Ectothiorhodospira.	433	3,00E-118	EF199953
uncultured nitrogen-fixing bacterium	Amostra ambiental.	305	7,00E-80	DQ40277
uncultured nitrogen-fixing bacterium	Amostra ambiental.	189	7,00E-45	DQ40262
thioalkalispira microaerophila	Gammaproteobacteria; Chromatiales; Ectothiorhodospiraceae; Thioalkalispira.	372	7,00E-100	EF199958
rhodopseudomonas palustris BisA53	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Rhodopseudomonas.	102	1,00E-18	CP00046
geobacter uraniumreducens Rf4	Deltaproteobacteria; Desulfuromonadales; Geobacteraceae; Geobacter.	394	1,00E-106	CP000698
geobacter sulfurreducens PCA	Deltaproteobacteria; Desulfuromonadales; Geobacteraceae; Geobacter.	276	6,00E-71	AE01718
uncultified nitrogen-fixing bacteria	Amostra ambiental.	259	6,00E-66	AF21692
geothobacter autotrophicus Py2	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Xanthobacter.	929	1,00E-127	CP00078
geobacter sulfurreducens PCA	Deltaproteobacteria; Desulfuromonadales; Geobacteraceae; Geobacter.	193	6,00E-46	AE01718
methylococcus capsulatus str. Bath	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylococcus.	494	1,00E-136	AE01728
methylococcus capsulatus str. Bath	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylococcus.	488	7,00E-135	AE01728
azorhizobium caulinodans ORS 571	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Azorhizobium.	831	9,00E-114	AP00938
azorhizobium caulinodans ORS 571	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Azorhizobium.	897	9,00E-124	AP00938
azorhizobium caulinodans ORS 571	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Azorhizobium.	1023	1,00E-142	AP00938
methylococcus capsulatus	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylococcus.	470	2,00E-129	AF48467
methylococcus capsulatus	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylococcus.	427	2,00E-116	AF48467
azorhizobium caulinodans ORS 571	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Azorhizobium.	990	1,00E-137	AP00938
geothobacter autotrophicus Py2	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Xanthobacter.	984	5,00E-136	CP00078
methylococcus capsulatus str. Bath	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylococcus.	490	2,00E-135	AE01728
methylococcus capsulatus str. Bath	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylococcus.	499	3,00E-138	AE01728
azorhizobium caulinodans ORS 571	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Azorhizobium.	842	2,00E-115	AP00938
methylococcus capsulatus	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylococcus.	433	3,00E-118	AF48467
geothobacter autotrophicus Py2	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Xanthobacter.	818	5,00E-111	CP00078
azorhizobium caulinodans ORS 571	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Azorhizobium.	968	2,00E-134	AP00938
azorhizobium caulinodans ORS 571	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Azorhizobium.	888	2,00E-121	AP00938
st N*	Filiação	Score	Valor-E	Nº de acc

Resultados

thylococcus capsulatus str. Bath	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylococcus.	518	9,00E-144	AE01728:
rhizobium caulinodans ORS 571	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Azorhizobium.	872	7,00E-120	AP00938:
thylococcus capsulatus	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylococcus.	466	3,00E-128	AF48467:
thylococcus capsulatus str. Bath	Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylococcus.	505	7,00E-140	AE01728:

de organismo cultivado de maior similaridade; ** - Sequência mais similar do Genbank

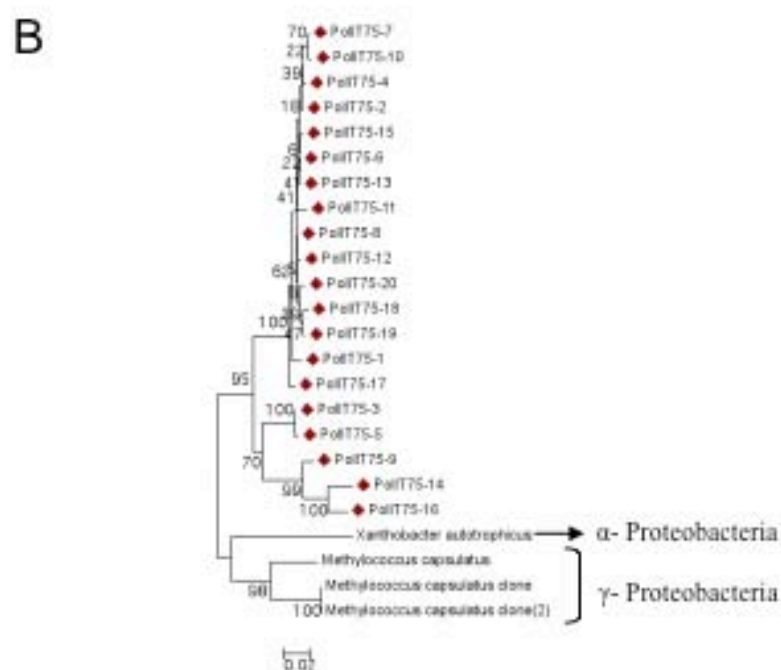
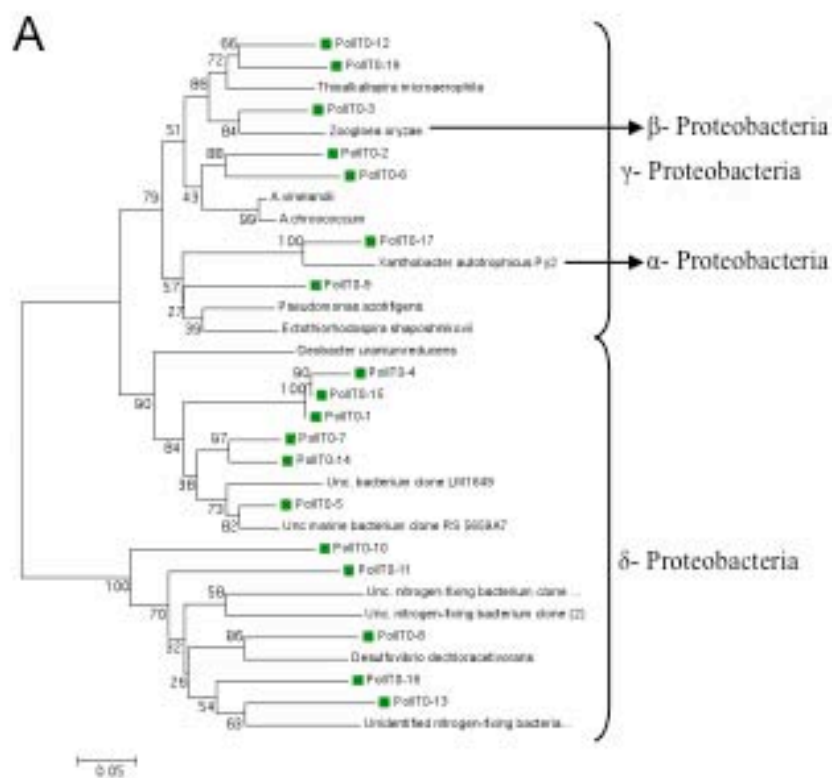


Figura 14: Relações evolutivas das seqüências de *nifH* provenientes das bibliotecas e seus vizinhos mais próximos. Comprimento dos ramos da árvore estão na unidade do número de substituições por base. As seqüências estão separadas em cores para facilitar a identificação da origem; seqüências provenientes do Genbank não apresentam marcação. A- Biblioteca Pol T0; B- Biblioteca Pol T75. Árvore construída com Bootstrap de 1000 réplicas.

Embora menos evidente, a mesma observação pode ser feita para as seqüências obtidas dos mesocosmos Vir (figura 15). Nas amostras provenientes do T0 (figura 15-A) pode-se observar um grupo de seqüências agrupando se com *Desulfosporosinus orientis* (Firmicutes) contendo um terço das seqüências obtidas desta amostra. Já na amostra Vir T75 (figura 15-B), este grupo não está representado por nenhuma seqüência.

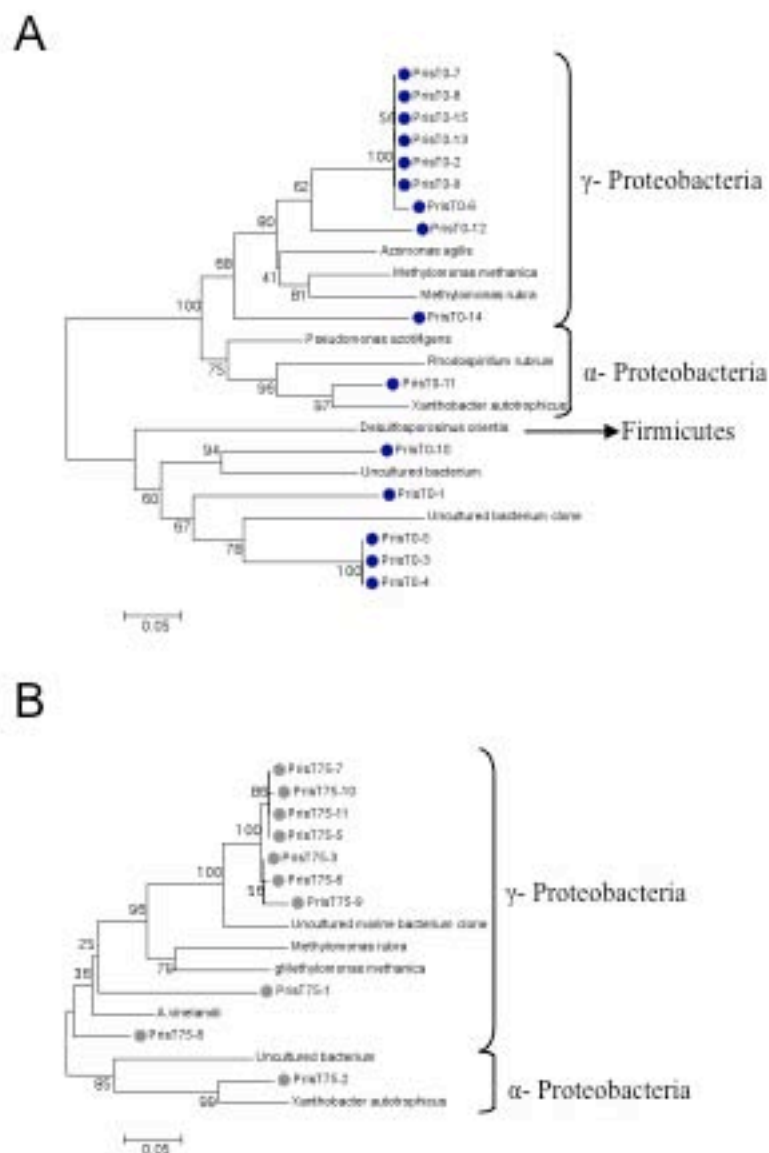


Figura 15: Relações evolutivas das seqüências de *nifH* provenientes das bibliotecas e seus vizinhos mais próximos. Comprimento dos ramos da árvore estão na unidade de número de substituições por base. As seqüências estão separadas em cores para facilitar a identificação da origem; seqüências provenientes do Genbank não apresentam marcação. A- Biblioteca Vir T0; B- Biblioteca Vir T75. Árvore construída com Bootstrap de 1000 réplicas.

A comparação das bibliotecas por β -Libshuff (tabela 6) mostra que as ao contrário do observado para as bibliotecas de *rrs* as bibliotecas do gene *nifH* no início do experimento (T0) foram diferentes entre si e assim permaneceram até o fim do experimento. Porém, quando se compara as amostras provenientes dos mesocosmos no T0 e no T75 o resultado obtido foi inverso entre os mesocosmos. As amostras Vir embora tenham apresentado alterações ao longo do tempo não podem ser consideradas diferentes, ao passo que as amostras provenientes de Pol são diferentes.

Tabela 6: Delta-C e Valores de p para análises de β -Libshuff* das bibliotecas de *nifH*

	Vir-T0	Vir-T75	Pol-T0	Pol-T75
Vir-T0	-	4.8 (0.0933)	15.6 (0.0000)	-
Vir-T75	0.3 (0.7924)	-	-	15.4 (0.000)
Pol-T0	2.2 (0.1760)	-	-	32.9 (0.000)
Pol-T75	-	22.3 (0.0008)	47.3 (0.0000)	-

* A tabela está organizada para representar a cobertura de X (colunas) por Y (linhas); valores de p apresentados entre parêntesis. Valores em negrito são considerados significantes.

Assim, percebe-se também que as alterações observadas no mesocosmo Pol foram mais intensas que as observadas em Vir. Esse resultado está em acordo com o já mostrado com relação ao PCR-DGGE da comunidade bacteriana.

PCR EM TEMPO-REAL- *NIFH*.

Com o objetivo de determinar alterações no tamanho da comunidade diazotrófica encontrada nas amostras em relação à contaminação por hidrocarbonetos, foi desenvolvido um sistema de PCR em Tempo-real baseado no sistema de PCR desenvolvido anteriormente (Diallo *et al.*, 2004). Esse sistema visando detecção do gene que codifica a proteína NifH foi adaptado para quantificação deste gene, o que correlaciona-se com a grandeza da comunidade diazotrófica do ambiente. Esse sistema foi selecionado pois para todas as amostras gerou apenas uma banda sem presença de dímeros dos iniciadores.

Inicialmente, um clone de *nifH* da biblioteca anteriormente mencionada foi selecionado para seu uso como curva padrão (conforme descrito anteriormente nos M&M) (figura 17-A). Essa curva padrão foi adicionada a todas as quantificações para evitar qualquer diferença entre ensaios.

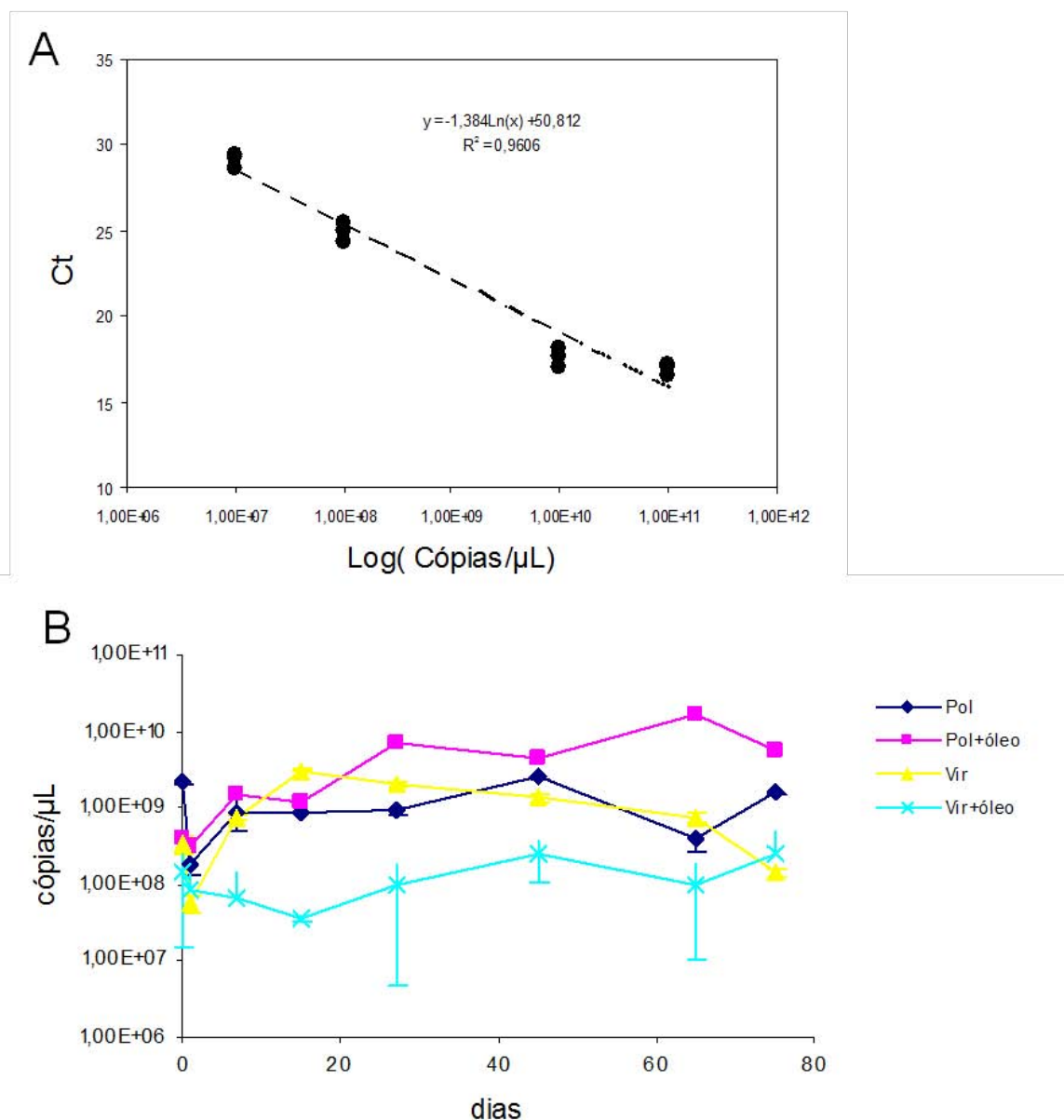


Figura 17: Quantificação por PCR em Tempo-Real do gene *nifH*. A- Curva-padrão de *nifH*; B- Quantificação do *nifH* das amostras provenientes dos mesocosmos.

As amostras provenientes dos mesocosmos sem adição de óleo apresentaram a comunidade bacteriana bastante estável (figura 17-B). Assim, se observou semelhança entre alterações no tamanho da comunidade diazotrófica e variação entre na estrutura da comunidade por PCR-DGGE (Bactéria ou Archaea).

Observa-se com relação ao mesocosmos que receberam a adição de óleo (pol+óleo e Vir+óleo) que, quando comparados aos seus contrapontos não contaminados, esses apresentaram alterações no número de cópias dos genes *nifH*. O mesocosmo Pol+óleo, apresenta um ligeiro aumento no número de cópias se comparados com o mesocosmo

Pol. Assim como, ao longo do tempo se observa também o aumento no número de cópias se comparado com o observado no início do experimento.

Já com relação ao mesocosmo Vir+óleo, o comportamento observado foi o oposto, o número de cópias observado é de fato menor que o observado no mesocosmo Vir, assim como o número de cópias foi apenas ligeiramente reduzido no início do experimento e a partir daí manteve-se estável.

Como foi observada alteração na estrutura da comunidade diazotrófica nas amostras com óleo, se observou a possibilidade de aumento relativo do número de cópias de *nifH* nos sedimentos (figura 18) ao longo do experimento. Conforme pode ser observado na figura 16 é impossível observar algum tipo de correlação entre o tempo e aumento no número de cópias relativas, assim, embora poucas populações de procaríotos fixadores de nitrogênio tenham obtido vantagem nos sistemas sob impacto por hidrocarbonetos, a representatividade deste grupo dentro da comunidade total permaneceu praticamente inalterada. A exceção do mesocosmo Vir+óleo, cujo número de cópias relativas de *rrs* relativo a *nifH* foi aumentado, indicando que o gene que codifica a proteína NifH foi negativamente selecionado pela adição de petróleo.

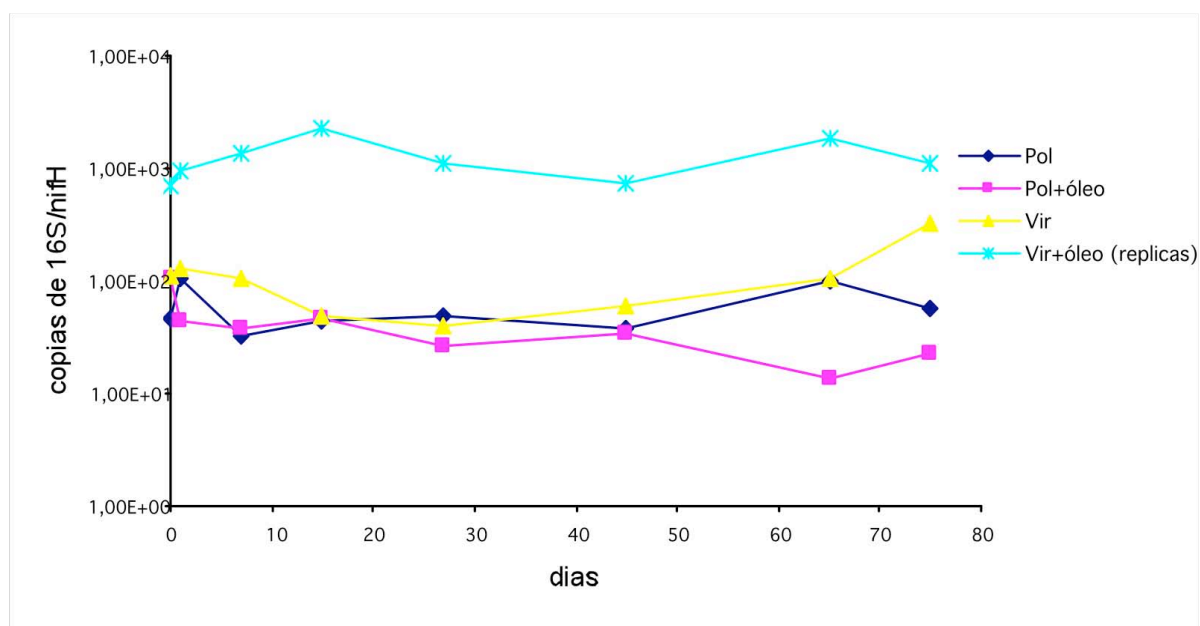


Figura 18: Quantidade relativa de cópias de 16S/nifH

DISCUSSÃO

DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS

Segundo o perfil cromatográfico das amostras Vir T0 e Pol T0, as quantidades relativas dos hidrocarbonetos são bastante similares. Isso se deve a maior parte destes ter sido adicionada a amostra e não se referirem a hidrocarbonetos de ocorrência natural nos ambientes em questão. Conforme esperado, o mesocosmo proveniente do manguezal que já tinha contato com hidrocarbonetos apresentou maior degradação de hidrocarbonetos. Percebe-se que a fração UCM aumentou no T75 em ambas as amostras. Considerando que essa fração é a de degradação mais difícil (Atlas, 1991), e observando que os demais picos de HTP apresentaram uma redução quando comparados a UCM, pode-se afirmar que houve degradação nas amostras.

Levando em consideração que parte dos hidrocarbonetos pode ter sido retirada das amostras por volatilização e/ou retirada pela ação da maré simulada não se pode afirmar que extensão da degradação nas amostras foi exatamente a observada. Porém, como o objetivo nesse trabalho é comparar o comportamento das comunidades microbianas nos dois ambientes e como ambos foram submetidos às mesmas condições experimentais, a análise comparativa pode ser considerada válida.

Observou-se também que na amostra Vir T75 houve consumo principalmente dos n-alcenos da fração entre C10 a C27. Esses compostos são os de maior degradabilidade entre os hidrocarbonetos resolvidos por HTP. As frações de cadeia mais longa, ao contrário, se mostraram mais refratárias a degradação.

Diferenças na degradação de hidrocarbonetos como as apresentadas aqui já foram observadas anteriormente (Johnsen & Karlson, 2005; Olivera, Esteves & Commendatore, 1997; Polymenakou *et al.*, 2006) onde se observou que em ambientes previamente contaminados por hidrocarbonetos a degradação destes compostos foi mais eficiente que em ambientes sem contato prévio. Esse comportamento também já foi correlacionado com a maior contagem de bactérias capazes de degradar esses compostos (Polymenakou *et al.*, 2006).

Desta maneira, podemos sugerir que a amostra proveniente do manguezal com histórico da contaminação de fato apresentou maior degradação de hidrocarbonetos. O contato prévio com hidrocarbonetos pode ter selecionado populações hidrocarbonoclásticas (ou populações mais eficientes) nesse ambiente, seja por emigração de populações ou seleção de populações autóctones, que ao

receber novo aporte de hidrocarbonetos rapidamente responderam com crescimento e consumo destes compostos. A existência de forte seleção de organismos quando se compara ambientes contaminados por hidrocarbonetos com seus pares não contaminados (Labbe *et al.*, 2007; Margesin *et al.*, 2003). Outra hipótese que pode ser levantada é a de que nesse ambiente houve grande estímulo à aquisição de genes de degradação de óleo ou de resistência a sua toxicidade e, assim, os microrganismos já presentes e bem adaptados ao ambiente anterior passaram a ser capazes também de lidar com a presença desses compostos. Essa alternativa é corroborada pelo fato de inúmeros organismos apresentarem os operons de degradação de compostos de petróleo em elementos móveis, como transposons e plasmídeos (Diaz, 2004; Ma *et al.*, 2007; Marri, Hao & Golding, 2007).

PCR-DGGE- BACTÉRIA

As comunidades bacterianas encontradas nos dois manguezais apresentaram grande complexidade (dada pelo grande número de bandas) e uma aparente equitabilidade (dado pelas bandas apresentarem intensidades bastante similares). As comunidades observadas nos dois manguezais (considerando as amostras T0) apresentaram estruturas bastante semelhantes onde as principais diferenças observadas entre as amostras se referem à dominância relativa entre as bandas observadas no gel. Essa observação está em concordância com o observado na literatura, onde se observa diferenças na composição de comunidades bacterianas motivadas pela presença de hidrocarbonetos (Labbe *et al.*, 2007; Margesin *et al.*, 2003; Osborn, Moore & Timmis, 2000; Perez-Jimenez & Kerkhof, 2005). Possivelmente, as diferenças entre as comunidades observadas nesses trabalhos se devem ao fato da maioria destes terem sido realizados em amostras de solo, que por ser mais heterogêneo que o sedimento, permite a existência de diversos micro-ambientes o que levaria a uma maior diferença entre as amostras. Assim como, ao se analisar grupos funcionais específicos como as bactérias redutoras de sulfato (Perez-Jimenez & Kerkhof, 2005) ou fixadoras de nitrogênio (esse trabalho), maximizam-se as diferenças ao se analisar uma parcela da comunidade possivelmente ligada ao consumo de carbono.

A grande estabilidade da comunidade observada ao longo do tempo em ambos os mesocosmos sob influência do óleo, onde, embora se observem alterações

no perfil da comunidade, não se observa grande desaparecimento de bandas ou surgimento de novas, essa observação está de acordo com observações anteriores em solos tropicais (Evans *et al.*, 2004) onde a comunidade bacteriana apresentou suaves alterações até 90 dias após a adição de óleo, quando estabilizou-se até o fim de 365 dias, porém a maioria dos trabalhos mostram grandes alterações na comunidade bacteriana após adição de hidrocarbonetos (Bordenave *et al.*, 2007; Macnaughton *et al.*, 1999; Miralles *et al.*, 2007b).

Assim como nos resultados de HTP, as estruturas da comunidade bacteriana observada nos dois sistemas de mesocosmo apresentaram diferenças na dinâmica observada entre eles. O mesocosmo montado a partir de amostra poluída (Pol+óleo) apresentou maiores alterações em seu perfil (principalmente mudanças na intensidade relativa de bandas) e essas alterações mais intensas já foram observadas mais cedo (T7). Já no mesocosmo Vir +óleo as alterações observadas foram também no T7, embora de menor intensidade. Grande parte das alterações observadas nesse mesocosmo foi o surgimento de novas bandas. Esse comportamento corrobora a hipótese apresentada acima de que a comunidade bacteriana no manguezal previamente poluído sofreu uma seleção de populações microbianas mais aptas a lidar com a poluição por óleo que em ambientes sem contato com o poluente.

PCR-DGGE- CRCHAEA

As Archaeas são encontradas globalmente e constituem uma grande porção dos organismos mesofílicos em ambientes marinhos e terrestres (Nicol & Schleper, 2006). Sequências de rRNA 16S de membros desse grupo já foram encontrados em amostras de solos florestais, agrícolas, pasto, alpinos (Bintrim *et al.*, 1997; Buckley, Graber & Schmidt, 1998; Jurgens, Lindström & Saano, 1997; Nicol, Glover & Prosser, 2003), água doce (Jurgens *et al.*, 2000), sedimentos, (Schleper, Holben & Klenk, 1997; Vetriani *et al.*, 1999), tecidos e trato intestinal de animais terrestres e marinhos (Friedrich *et al.*, 2001; Preston *et al.*, 1996; van der Maarel *et al.*, 1998). Na maioria dos solos estudados membros do grupo 1.1b dominam enquanto em ambientes marinhos o grupo predominante é o 1.1a (Ochsenreiter *et al.*, 2003). Estes archaeas representam 1-5% das sequências de rRNA procariótico encontrado nesses ambientes (Ochsenreiter *et al.*, 2003). Membros desse grupo foram recentemente identificados como portadores de genes codificando para amônia monoxigenase (Beman &

Francis, 2006; He *et al.*, 2007; Könneke *et al.*, 2005; Leininger *et al.*, 2006; Schleper, Jurgens & Jonuscheit, 2005; Treusch *et al.*, 2005; Venter *et al.*, 2004). Assim, negligenciar os efeitos de qualquer tratamento sobre os membros deste grupo é ignorar grande parte da comunidade microbiana e que é responsável por grande parte de processos importantes como a metanogênese, oxidação de amônia e fixação de N₂.

Assim como o perfil da comunidade bacteriana, a comunidade archaea apresentou alta complexidade (dada pelo grande número de bandas). Essa complexidade foi menor que a observada para as comunidades bacterianas, conforme previamente observado (Bohn, Bjornsson & Mattiasson, 2007; Casamayor *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*, 2007).

A grande estabilidade observada após a adição de óleo contrasta-se com observações anteriores (Roling *et al.*, 2004), onde a detecção de membros desse grupo tornava-se mais difícil após a adição de óleo, o que levou o autor a afirmar que é possível que esse grupo não esteja diretamente ligado à degradação de hidrocarbonetos. No entanto, assim como no presente trabalho, Sasaki *et al.* (2007) observou que a comunidade archaea variou menos que a comunidade bacteriana em biorreator.

Os sedimentos de manguezais são ambientes normalmente anóxicos. Como já foi observado que a degradação de hidrocarbonetos em ambientes anaeróbicos está estreitamente ligada à metanogênese (Chang, Um & Holoman, 2006; Chang *et al.*, 2006; Zengler *et al.*, 1999) e as archaeas são responsáveis pela formação de metano em ambientes anóxicos, a observação de poucas alterações na estrutura destes membros da comunidade microbiana é surpreendente.

No entanto, caso as populações detectadas pelo sistema de PCR-DGGE (majoritárias) usado nesse trabalho não sejam diretamente afetadas pelo óleo (toxicidade, fonte de C, etc...), o efeito indireto deste pode ser de uma magnitude inferior à sensibilidade desta técnica, tornando essas alterações imperceptíveis. Assim, as alterações em populações (bandas) minoritárias podem ser mascaradas pelas populações majoritárias que permaneceram inalteradas.

Porém, pouco se conhece da biologia dos membros desse grupo e seu papel ecológico em ambientes poluídos por petróleo. Por esse motivo, pouco se pode concluir dos resultados obtidos e mais estudos com relação ao papel exercido pelas archaeas nos ambientes poluídos por petróleo se fazem necessários.

BIBLIOTECAS DE CLONE DE RDNA 16S BACTERIANO

Como já se sabe, embora seja uma ferramenta excelente para comparar comunidades microbianas presentes em diversas amostras, a resolução filogenética do PCR-DGGE é baixa, o principal fato que leva a isso é a co-migração de bandas. Assim, usualmente se associa ao PCR-DGGE o seqüenciamento de bandas ou de clones obtidos diretamente do PCR. Neste estudo optou-se pela utilização do seqüenciamento direto do PCR e não de bandas do gel devido ao primeiro ser menos laborioso e com isso permitindo seqüenciamento de maior número de clones. Com isso, se pode obter uma visão mais ampla da diversidade na amostra e também a classificação filogenética.

Inicialmente, analisando os parâmetros de diversidade e riqueza, é possível observar que todas as bibliotecas apresentam medidas de diversidade e riqueza estimadas bastante similares. Como os estimadores de riqueza são limitados pelo tamanho da amostragem, e de acordo com as curvas de rarefação grande parte da diversidade presente nas amostras não foi capturada nas bibliotecas, o número de UTOs estimada pode ser considerada uma subestimação e, assim, a diversidade real é maior que a estimada neste trabalho.

Porém, esses dados foram obtidos a partir das seqüências obtidas agrupadas seguindo o conceito de que se pode considerar como de uma mesma espécie seqüências de *rrs* com 97% de similaridade. Porém, esse valor de corte é arbitrário e embora válido para um grande número de espécies microbianas cultiváveis essas são a minoria (Gevers *et al.*, 2005; Stackebrandt & Goebel, 1994). O valor aqui utilizado (97%) é uma aproximação, não existe uma similaridade que pode ser considerada real dado que alguns gêneros possuem maior conservação nas seqüências de rRNA que outros (Gevers *et al.*, 2005; Pommier *et al.*, 2007; Stackebrandt & Goebel, 1994). Entretanto, como pode ser observado na figura 8, as diferenças observadas alterando-se o corte mudam muito pouco os padrões observados.

Em ambos os mesocosmos no T0 uma das principais classes encontradas foi a dos *Anaerolineae*, classe na qual se encontram principalmente bactérias não cultivadas e dos quais os poucos representantes obtidos em cultura são anaeróbios estritos (Yamada *et al.*, 2007; Yamada *et al.*, 2006). Esses organismos são provavelmente

provenientes de camadas de maior profundidade dado que o oxigênio é totalmente ausente a profundidade de poucos milímetros (Holguin, Vazquez & Bashan, 2001).

Um grupo de bactérias bastante presente nas bibliotecas e que apresentou grande variação principalmente no mesocosmo Pol foi o das *Alphaproteobacterias*. Dentre os gêneros observados dentro deste grupo estão alguns ligados a fixação biológica de N₂ (Zehr *et al.*, 2003), como *Azospirillales*, *Bradyrhizobiales*, *Rhizobiales* e *Rhodobacterales* (Anexo1).

Outro grupo que apresentou grande variação entre o início e o final do experimento em ambos os mesocosmos foram as *Deltaproteobacterias*, representadas principalmente pelas *Desulfobacteraceae*, *Desulfobulbaceae*, *Desulfuromonadales*, *Desulfobacterium*. Essas bactérias redutoras de sulfato (BRS) são amplamente encontradas em sedimentos, tanto marinhos, como de água doce (Asami, Aida & Watanabe, 2005; Da Silva, Johnson & Alvarez, 2007; Foti *et al.*, 2007; Kjeldsen *et al.*, 2007; Klepac-Ceraj *et al.*, 2004; Kondo *et al.*, 2007; Miletto, Bodelier & Laanbroek, 2007; Mussmann *et al.*, 2005; Rees & Patel, 2001; Suzuki *et al.*, 2007a; Suzuki *et al.*, 2007b). Essas bactérias são comumente encontradas em sedimentos anóxicos e usam o sulfato como receptor final de elétrons (Wilms *et al.*, 2006) e, frequentemente associadas à degradação anaeróbica de hidrocarbonetos (Kniemeyer *et al.*, 2007; Miralles *et al.*, 2007a; Miralles *et al.*, 2007b; Perez-Jimenez & Kerkhof, 2005). Desta maneira, observa-se que grande parte dos clones seqüenciados continha fragmentos de gene *rrs* similares a organismos anaeróbios em contraste com o observado anteriormente (Liang *et al.*, 2007) onde a esses grupos não foram observados.

O predomínio de Proteobacterias nos sedimentos aquáticos já foi observado tanto para os de água doce (Brie, Moreira & Lopez-Garcia, 2007; Lehours *et al.*, 2007), quanto salgada (Glockner, Fuchs & Amann, 1999; Liang *et al.*, 2007; Wilms *et al.*, 2006). Porém, em água doce a classe de maior importância é a *Betaproteobacteria* (Brie, Moreira & Lopez-Garcia, 2007), enquanto em sedimentos marinhos foi observada a dominância de *Deltaproteobacteria* (Wilms *et al.*, 2006) e *Gammaproteobacteria* (Liang *et al.*, 2007; Wilms *et al.*, 2006).

Outros grupos predominantes nas comunidades de sedimentos de água salgada são: *Actinobacteria*, *Chloroflexi* e *Bacteroidetes*, que foram após as Proteobacterias os grupos mais encontrados nesse trabalho e bastante representativos em trabalhos anteriores (Glockner, Fuchs & Amann, 1999; Liang *et al.*, 2007). Porém, ao se comparar o perfil filogenético capturado nas quatro bibliotecas apresentadas

nesse trabalho com outro exemplo encontrado na literatura (Liang *et al.*, 2007), observa-se grandes discrepâncias. Liang e colaboradores (2007) observaram que os grupos *Gamma* e *Epsilonproteobacteria* foram os mais representados na biblioteca enquanto as *Alpha* e *Delta* não ultrapassavam 11% da comunidade. Contrariando essa observação, nas bibliotecas aqui apresentadas foi observado que *Alpha* e *Deltaproteobacterias* estavam entre os grupos dominantes enquanto *Gamma* e *Epsilon* tiveram detecção nula ou baixa. Da mesma maneira, os *Chloroflexi*, aqui, representavam apenas 6% do total de clones observados. Uma explicação para esse fato é que a amostragem usada no presente trabalho ter sido mais profunda (0-5cm), o que privilegiaria organismos anaeróbios (*Anaerolineae* e BRS) devido a maior profundidade, enquanto Liang e colaboradores (2007) coletaram amostras mais superficiais (0-2cm), onde a disponibilidade de oxigênio é maior, além do fato desta camada sofrer maior influência de organismos da coluna d'água onde há prevalência de *Bacteroidetes*, *Alpha* e *Gammaproteobacterias* (Glockner, Fuchs & Amann, 1999).

Embora as classes observadas em todos os mesocosmos sejam similares na sua composição e contribuição para a formação da comunidade, nota-se na figura 11 que a grande maioria das UTOs observadas são únicas para cada uma das bibliotecas. Esse resultado entra em contradição com o observado no PCR-DGGE onde a maioria das bandas observadas no gel apresentava a mesma posição migratória em todas as amostras. Uma das justificativas para esse comportamento é o número maior de UTOs capturadas na biblioteca se comparada ao DGGE, onde se observa em Pol T0 61 e 29 UTOs respectivamente. Essa discrepância se deve principalmente a maior aleatoriedade de captura pela biblioteca e a co-migração de bandas no DGGE.

A análise estatística da estrutura da comunidade por análise de componente principal demonstra que, ao contrário do que se observa na literatura (Labbe *et al.*, 2007; Margesin *et al.*, 2003; Osborn, Moore & Timmis, 2000; Perez-Jimenez & Kerkhof, 2005), a comunidade microbiana de um ambiente impactado por um poluente pode ser bastante semelhante a seu par sem contato com este. Entretanto, a correlação entre as alterações na comunidade e uma maior capacidade de consumir o poluente naquele ambiente observada aqui está de acordo com observações prévias (Johnsen & Karlson, 2005; Olivera, Esteves & Commendatore, 1997; Polymenakou *et al.*, 2006). Essa observação foi então corroborada pela análise de *Libshuff*.

Esse resultado mostrou que embora as comunidades bacterianas não fossem diferentes no início do experimento elas divergem ao fim deste. Essa divergência

pode ser relacionada ao contato no passado com compostos oriundos de petróleo. Demonstrando assim o papel do histórico de um ambiente na estrutura de uma comunidade (Buckley *et al.*, 2006; Hamamura *et al.*, 2006; Oline, 2006). Assim, embora não seja evidente o efeito do contato prévio com o poluente sobre a comunidade microbiana ao observá-las (bibliotecas T0), este efeito se torna evidente quando esta é desafiada com a adição de óleo (dado pela divergência no T75).

PCR EM TEMPO-REAL: rDNA 16S

O PCR em Tempo-real vem sendo amplamente utilizado em estudos de ecologia microbiana com o objetivo de monitorar alterações no tamanho da comunidade microbiana (Zhang & Fang, 2006). A maioria dos trabalhos utiliza como alvo o gene que codifica para o rRNA 16S (Zhang & Fang, 2006).

A quantificação do número de cópias do gene *rrs* nas amostras provenientes dos mesocosmos indica que a adição de óleo induziu a um leve aumento no número de cópias após 45 dias se comparada ao observado para os mesocosmos controle (sem óleo). Embora seja comum observar alterações no tamanho da comunidade microbiana heterotrófica (Maruyama *et al.*, 2003; Ramsay *et al.*, 2000) e de populações de degradadores de hidrocarbonetos (Maruyama *et al.*, 2003; Ramsay *et al.*, 2000; Uyttebroek *et al.*, 2007; Vinas *et al.*, 2005), o tamanho da comunidade total raramente é alterado (Ka, Yu & Mohn, 2001; Maruyama *et al.*, 2003). Entretanto, aqui não foi avaliada alterações na atividade bacteriana, o que se avalia por alterações na concentração de rRNA/rDNA. O efeito positivo da adição de hidrocarbonetos na concentração de rRNA relativamente ao rDNA já foi observado anteriormente (Ka, Yu & Mohn, 2001). Assim, essa variação observada provavelmente ligada a um efeito estimulatório da presença dos hidrocarbonetos está em oposição aos resultados anteriormente obtidos (Maruyama *et al.*, 2003; Ramsay *et al.*, 2000; Uyttebroek *et al.*, 2007; Vinas *et al.*, 2005).

BIBLIOTECAS DE CLONE DE *nifH*

Conforme mencionado anteriormente, os manguezais são ecossistemas ricos em matéria orgânica, entretanto, com relação ao nitrogênio e o fósforo esses ambientes podem ser considerados deficientes (Alongi, Christoffersen & Tirendi, 1993; Holguin, Guzman & Bashan, 1992; Sengupta & Chaudhuri, 1991; Vazquez *et al.*,

2000). Como os manguezais são ambientes onde há o acúmulo de matéria orgânica biodegradável observa-se altas taxas de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Potts, 1984).

Por outro lado, em ambientes impactados por petróleo raramente observa-se a FBN a despeito da limitação freqüente deste composto (Musat, Harder & Widdel, 2006). Nos casos onde foi observada a fixação de N_2 foi impossível correlacioná-la à degradação dos hidrocarbonetos (Eckford *et al.*, 2002; Laguerre, Bossand & Bardin, 1987; Piehler *et al.*, 1999; Prantera *et al.*, 2002; Toccalino, Johnson & Boone, 1993).

Esses dados nos levam a postular que os organismos fixadores de N_2 seriam de extrema importância em sedimentos de manguezais impactados por hidrocarbonetos. Desta maneira, as populações bacterianas responsáveis pela FBN seriam selecionadas devido a sua adaptabilidade ao impacto por óleo (Prantera *et al.*, 2002).

Dos 63 clones analisados, 30 clones apresentaram maior similaridade com seqüências obtidas de organismos cultivados do grupo das *Gammaproteobacterias*, 15 com as *Alphaproteobacteria*, 11 não apresentaram organismos cultiváveis entre as 50 seqüências mais similares no banco de dados Genbank do NCBI, entre os 7 clones restantes 5 foram mais similares a *Deltaproteobacterias*, 1 *Betaproteobacteria* e 1 com *Firmicutes*.

Com relação a divisão das seqüências de NifH baseadas nas seqüências de aminoácidos (Chien & Zinder, 1996; Zehr *et al.*, 2003), 45 seqüências englobando as seqüências de *Alpha* e *Gammaproteobacterias* se encontram no grupo I, que consiste das seqüências de NifH contendo Molibdênio e alguns contendo Vanádio. Mais precisamente os grupos 1J e 1K (Zehr *et al.*, 2003) que são grupos filogeneticamente próximos. Apenas cinco seqüências puderam ser afiliadas ao grupo III englobando as seqüências similares aos grupos *Deltaproteobacteria* e *Firmicutes* esse grupo engloba organismos anaeróbios estritos fixadores de N_2 . A construção de árvores filogenéticas baseadas nas seqüências de nucleotídeos (figuras 12 a 14) observa-se que os ramos destas árvores construídas agrupam os clones respeitando a classificação proposta anteriormente (Chien & Zinder, 1996; Zehr *et al.*, 2003). Como exemplo, pode-se pegar os clones obtidos a partir da biblioteca Pol T75, os clones obtidos se assemelharam a seqüências de *Gamma* e *Alphaproteobacterias*, porém, a árvore filogenética os coloca em um ramo da árvore separado de ambos os grupos, embora originário do mesmo ramo ancestral.

Organismos associados aos gêneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Clostridium* e *Klebsiella* foram isolados de sedimentos e rizosfera de mangues (Sengupta & Chaudhuri, 1991). A exceção do gênero *Klebsiella* todos os demais grupos foram observados nas bibliotecas Vir T0 e Pol T0 (anteriores a adição de óleo), indicando que esses grupos são normalmente encontrados em ambos os sedimentos dos manguezais.

Nenhum dos clones aqui obtidos apresentou similaridade com seqüências provenientes de *Cianobactéria*. Esse grupo é comumente observado em ambientes marinhos impactados com petróleo (Hoffmann, 1996; Höpner *et al.*, 1996; Musat, Harder & Widdel, 2006; Perez-Vargas *et al.*, 2000; Sanchez *et al.*, 2005; Sorkhoh *et al.*, 1992) e já foi postulado que estes seriam responsáveis por boa parte do aporte de N nesses ambientes (Musat, Harder & Widdel, 2006; Sanchez *et al.*, 2005). Entretanto, bactérias heterotróficas são bastante comuns e abundantes em bibliotecas de amostras aquáticas (Bostrom *et al.*, 2007). Assim como no presente trabalho, seqüências oriundas de *Proteobacterias* são aparentemente prevalentes em bibliotecas de amostras oceânicas (Bird *et al.*, 2005; Church *et al.*, 2005a; Church *et al.*, 2005b; Langlois, LaRoche & Raab, 2005; Zehr, Mellon & Zani, 1998).

Nas bibliotecas construídas observa-se em ambos os manguezais a seleção por grupos específicos de organismos. Em ambos os manguezais, as seqüências obtidas nas bibliotecas do T75 se agruparam com seqüências do grupo I de *nifH*, entretanto os genótipos observados no mesocosmo Pol não são os mesmos observados em Vir (figura 14). Ao analisarmos a árvore obtida verifica-se que a maioria dos genótipos obtidos na biblioteca Pol T75 está em um ramo contendo apenas seqüências relacionadas a organismos não cultivados com homologia entre si (menos de 0,05 substituições por base).

Já no mesocosmo Vir, embora se observe declínio na diversidade de genótipos de *nifH*, ainda há certa diversidade de seqüências representando ambos os principais grupos encontrados no ambiente antes da adição de óleo. O genótipo dominante na biblioteca Vir T0 ainda é encontrado na biblioteca Vir T75 e ainda apresenta dominância com relação aos demais genótipos.

Pela análise de J-Libshuff as bibliotecas VirT0, Pol T0 e Vir T75 não podem ser consideradas diferentes. Assim, embora se observe diferenças entre as bibliotecas Vir T0 e Vir T75 (conforme acima mencionado) essas diferenças não são significativas. Isso indica que o impacto provocado pela adição de óleo no mesocosmo Vir, embora

tenha levado a alterações significativas na estrutura da comunidade (observada por análise do rDNA 16S) não levou a mudanças significativas na diversidade de *nifH*.

Nesse trabalho não foi analisada a FBN propriamente dita e sim a alteração da diversidade associada a degradação dos hidrocarbonetos nos mesocosmos, que pode indicar que a alteração observada nas populações estaria ligada a uma possível alteração na FBN. Essa observação está em oposição ao que foi anteriormente observado (Musat, Harder & Widdel, 2006), onde a adição de óleo não pode ser relacionada ao aumento da FBN em sedimentos marinhos. Não obstante, com relação a outro compartimento do ciclo do nitrogênio, a oxidação de amônia, já foi observado que em ambientes previamente impactados por hidrocarbonetos apresentavam maior resistência a novo distúrbio que ambientes não contaminados (Deni & Penninckx, 1999).

PCR EM TEMPO-REAL: *NIFH*

Embora seja bastante exploratória, a análise de bibliotecas de clone de *nifH* baseados em DNA limita a interpretação dos dados, principalmente no que se refere a importância do processo dentro daquela comunidade e sua atividade. Para demonstrar essa importância a pergunta que deve ser respondida não é o “quem exerce essa função” e sim o “quanto”. Assim, com o objetivo de compreender numericamente como os organismos participantes em um processo são afetados por um impacto, recentemente diversos autores vêm empregando o PCR quantitativo para analisar amostras ambientais (Bostrom *et al.*, 2007; Church *et al.*, 2005b; Juraeva *et al.*, 2006; Noda *et al.*, 1999; Short & Zehr, 2005).

Observa-se em todas as amostras um leve aumento no número de cópias ao longo do experimento, entretanto quando comparamos as amostras com adição de óleo com as amostras controle, observa-se que embora os mesocosmos Pol e Pol+óleo apresentem certa homogenia entre o número de cópias de *nifH*, o mesocosmo Vir apresenta um redução no número de cópias. Essa observação é contrária ao que foi observado para o *rrs* no qual o número de cópias de ambos os mesocosmos sob adição de óleo mostraram um leve aumento no número de cópias. Isso leva a um aumento relativo no número de cópias de *rrs* em relação ao de *nifH* nesse mesocosmo.

Esse comportamento diferenciado entre os mesocosmos indica certa seleção negativa das populações diazotróficas no mesocosmo Vir+óleo enquanto a população bacteriana tem seu crescimento estimulado. Conforme mencionado anteriormente, já foi observada a inibição da oxidação de amônia pela adição de óleo (Deni & Penninckx, 1999) em ambientes sem contato prévio com o poluente. O mesmo foi observado com relação à FBN em sedimentos (Musat, Harder & Widdel, 2006). Porém, no mesocosmo Pol+óleo não foi observada alteração na relação *rrs/nifH*. Assim, o fato de não ter sido observado o estímulo a FBN no mesocosmo Vir+óleo, assim como em estudos anteriores (Deni & Penninckx, 1999; Musat, Harder & Widdel, 2006), pode estar associado ao fato dos sedimentos estudados não terem sido previamente expostos ao poluente e por isso não ter passado por um processo de seleção de organismos mais aptos a sobreviver nesse ambiente.

Entretanto, como o processo de FBN não foi quantificado, essas afirmações são meramente especulativas, os genótipos avaliados podem estar sendo selecionados por outras características fisiológicas. Contudo, esses dados apontam em direção oposta ao obtido até o momento (Musat, Harder & Widdel, 2006), sugerindo que em ambientes previamente impactados, a seleção de populações mais adaptadas à vida na presença de hidrocarbonetos leva a uma maior resistência desse fenótipo (FBN) no ambiente (Deni & Penninckx, 1999). Essa observação pode estar relacionada com uma maior aptidão desses ambientes a utilização de hidrocarbonetos como fonte de carbono.

CONCLUSÕES

- A degradação de hidrocarbonetos no manguezal com histórico de poluição é maior que no manguezal sem este histórico.
- De acordo com o PCR-DGGE, a maioria dos filotipos bacterianos não é afetada pela adição do óleo.
- O mesmo DGGE indica que mesocosmo montado a partir do manguezal poluído (Pol+óleo) apresenta maior estabilidade se comparado com o mesocosmo não poluído (Vir+óleo), quando se adicionou óleo.
- Os filotipos de Archaea encontrados no PCR-DGGE indicam que estes apresentam maior estabilidade quando se adiciona hidrocarbonetos ao mesocosmo.

- As bibliotecas de clone indicam que os manguezais apresentam um grande número de UTOs relacionadas a organismos anaeróbios (*Anaerolineae* e BRS).
- Após a adição de petróleo observa-se uma diminuição na presença de *Anaerolineae* com aumento de BRS (*Deltaproteobacteria*), esse último grupo é comumente associado a degradação anaeróbica de hidrocarbonetos.
- As comunidades de ambos os manguezais, embora apresentem históricos diferentes não apresentam comunidades diferentes. Entretanto ao serem desafiadas com a adição de petróleo essas respondem de maneira diferente.
- Através de PCR quantitativo observa-se um leve aumento do número de cópias de *rrs*, o que pode estar correlacionado com aumento da população, após a adição de hidrocarbonetos.
- Pelo seqüenciamento de bibliotecas de clone de *nifH* observa-se a predominância de genótipos oriundos de proteobactérias do grupo I (*Alpha* e *Gammaproteobacterias*).
- A adição de petróleo levou a seleção de genótipos diazotróficos mais adaptados ao novo ambiente, dado pela redução na diversidade.
- Somando-se a isso está o fato do número de cópias de *rrs* relativo ao de *nifH* ter aumentado no mesocosmo Vir indicando uma maior sensibilidade dos organismos diazotróficos nesse ambiente.
- O número de cópias de *nifH* se relaciona com a capacidade de remoção de hidrocarbonetos observada nos manguezais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. (1994) Biodegradation and bioremediation. (San Diego, Academic Press Inc)
- ALONGI, D. M., CHRISTOFFERSEN, P. & TIRENDI, F. (1993) The influence of forest type on microbial-nutrient relationships in tropical mangrove sediments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **171**:201-223
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**:403-410
- AN, H. R., MAINELIS, G. & WHITE, L. (2006) Development and calibration of Real-time PCR for quantification of airborne microorganisms in air samples. *Atmospheric Environment*, **40**:7924-7939
- ARAÚJO, D. S. D. & MACIEL, N. C. (1979) Os manguezais do recôncavo da baía de Guanabara. (Rio de Janeiro, FEEMA)
- ARRIGO, K. R. (2005) Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature*, **437**:349-355
- ASAMI, H., AIDA, M. & WATANABE, K. (2005) Accelerated sulfur cycle in coastal marine sediment beneath areas of intensive shellfish aquaculture. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**:2925-2933
- ATLAS, R. M. (1991) Microbial hydrocarbon degradation - bioremediation of oil-spills. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **52**:149-156
- AVRAHAMI, S., CONRAD, R. & BRAKER, G. (2002) Effect of soil ammonium concentration on N₂O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**:5685-5692
- AYUKAI, T. & MILLER, D. (1998) Phytoplankton biomass, production and grazing mortality in Exmouth gulf, a shallow embayment on the arid, tropical coast of western Australia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **225**:239-251
- BANO, N., RUFFIN, S., RANSOM, B. & HOLLIBAUGH, J. T. (2004) Phylogenetic composition of Arctic ocean archaeal assemblages and comparison with antarctic assemblages. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**:781-789
- BEIJERINCK, M. (1913) De infusies en de ontdekking der bacterien, jaarboek van de koninklijke akademie v. Wetenschappen. (Amsterdam, Muller)
- BEMAN, J. M. & FRANCIS, C. A. (2006) Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified subtropical estuary: Bahia del Tobarí, Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**:7767-7777
- BINTRIM, S. B., DONOHUE, T. J., HANDELSMAN, J., ROBERTS, G. P. & GOODMAN, R. M. (1997) Molecular phylogeny of archaea from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**:277-282
- BIRD, C., MARTINEZ, J. M., O'DONNELL, A. G. & WYMAN, M. (2005) Spatial distribution and transcriptional activity of an uncultured clade of planktonic diazotrophic gamma-proteobacteria in the arabian sea. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**:2079-2085
- BOER, B. (1993) Anomalous pneumatophores and adventitious roots of *Avicennia marina* (Forssk) Vierh mangroves 2 years after the 1991 gulf-war oil-spill in Saudi-Arabia. *Marine Pollution Bulletin*, **27**:207-211
- BOHN, I., BJORNSSON, L. & MATTIASSON, B. (2007) Effect of temperature decrease on the microbial population and process performance of a mesophilic anaerobic bioreactor. *Environmental Technology*, **28**:943-952
- BORDENAVE, S., GONI-URRIZA, M. S., CAUMETTE, P. & DURAN, R. (2007) Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**:6089-6097
- BOSTROM, K. H., RIEMANN, L., KUHL, M. & HAGSTROM, A. (2007) Isolation and gene quantification of heterotrophic N₂-fixing bacterioplankton in the Baltic Sea. *Environmental Microbiology*, **9**:152-164
- BRASSEUR, G., LEVICAN, G., BONNEFOY, V., HOLMES, D., JEDLICKI, E. & LEMESLE-MEUNIER, D. (2004) Apparent redundancy of electron transfer pathways via bc(1) complexes and terminal oxidases in the extremophilic chemolithoautotrophic

- acidithiobacillus ferrooxidans. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, **1656**:114-126
- BRIEE, C., MOREIRA, D. & LOPEZ-GARCIA, P. (2007) Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton from a suboxic freshwater pond. *Research in Microbiology*, **158**:213-227
- BUCKLEY, D. H., GRABER, J. R. & SCHMIDT, T. M. (1998) Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom Crenarchaeota and their diversity and abundance in soils. *Applied and Environmental Microbiology* **64**:4333-4339
- BUCKLEY, D. H., HUANGYUTITHAM, V., NELSON, T. A., RUMBERGER, A. & THIES, J. E. (2006) Diversity of planctomycetes in soil in relation to soil history and environmental heterogeneity *Applied and Environmental Microbiology*, **72**:4522-4531
- BURNS, K. A., CODI, S. & DUKE, N. C. (2000) Gladstone, Australia field studies: Weathering and degradation of hydrocarbons in oiled mangrove and salt marsh sediments with and without the application of an experimental bioremediation protocol. *Marine Pollution Bulletin*, **41**:392-402
- CASAMAYOR, E. O., MASSANA, R., BENLLOCH, S., OVREAS, L., DIEZ, B., GODDARD, V. J., GASOL, J. M., JOINT, I., RODRIGUEZ-VALERA, F. & PEDROS-ALIO, C. (2002) Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environmental Microbiology*, **4**:338-348
- CHANG, W., UM, Y. & HOLOMAN, T. R. P. (2006) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degradation coupled to methanogenesis. *Biotechnology Letters*, **28**:425-430
- CHANG, Y. T., LEE, J. F., CHAO, H. P. & LIAO, W. L. (2006) Bacterial community changes with n 'n ' dimethylformamide (DMF) additives during polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) biodegradation. *Environmental Technology*, **27**:1-14
- CHIEN, Y. T. & ZINDER, S. H. (1996) Cloning, functional organization, transcript studies, and phylogenetic analysis of the complete nitrogenase structural genes (*nifHDK2*) and associated genes in the archaeon *Methanosarcina barkeri* 227. *Journal of Bacteriology*, **178**:143-148
- CHO, J. C. & TIEDJE, J. M. (2000) Biogeography and degree of endemism of fluorescent pseudomonas strains in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**:5448-5456
- CHURCH, M. J., JENKINS, B. D., KARL, D. M. & ZEHR, J. P. (2005a) Vertical distributions of nitrogen-fixing phylotypes at Station Aloha in the oligotrophic north pacific ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, **38**:3-14
- CHURCH, M. J., SHORT, C. M., JENKINS, B. D., KARL, D. M. & ZEHR, J. P. (2005b) Temporal patterns of nitrogenase gene (*nifH*) expression in the oligotrophic north pacific ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**:5362-5370
- CITRON, G. & SCHAEFFER-NOVELLI, Y. (1983) *Introducción a la ecología de manglar*. Oficina Regional de Ciencia y Tecnología de la UNESCO para América Latina y el Caribe,
- CLARKE, K. R. (1993) Nonparametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, **18**:117-143
- CONRAD, T. (1997) The 'trio' + ozone - verve-537-503. *Down Beat*, **64**:91-91
- CRUMP, B. C., ADAMS, H. E., HOBBIE, J. E. & KLING, G. W. (2007) Biogeography of bacterioplankton in lakes and streams of an arctic tundra catchment. *Ecology*, **88**:1365-1378
- CRUMP, B. C., HOPKINSON, C. S., SOGIN, M. L. & HOBBIE, J. E. (2004) Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: Combined influences of bacterial growth and residence time. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**:1494-1505
- DA CUNHA, C. D. & LEITE, S. G. F. (2000) Gasoline biodegradation in different soil microcosms. *Brazilian Journal of Microbiology*, **31**:45-49
- DA SILVA, M. L. B., JOHNSON, R. L. & ALVAREZ, P. J. J. (2007) Microbial characterization of groundwater undergoing treatment with a permeable reactive iron barrier. *Environmental Engineering Science*, **24**:1122-1127
- DENI, J. & PENNINCKX, M. J. (1999) Nitrification and autotrophic nitrifying bacteria in a hydrocarbon-polluted soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**:4008-4013

- DESANTIS, T. Z., HUGENHOLTZ, P., LARSEN, N., ROJAS, M., BRODIE, E. L., KELLER, K., HUBER, T., DALEVI, D., HU, P. & ANDERSEN, G. L. (2006) Greengenes, a chimera-checked 16s rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**:5069-5072
- DIALLO, M. D., WILLEMS, A., VLOEMANS, N., COUSIN, S., VANDEKERCKHOVE, T. T., DE LAJUDIE, P., NEYRA, M., VYVERMAN, W., GILLIS, M. & VAN DER GUCHT, K. (2004) Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N₂-fixing bacterial diversity in soil under acacia tortilis ssp raddiana and balanites aegyptiaca in the dryland part of senegal. *Environmental Microbiology*, **6**:400-415
- DIAZ, E. (2004) Bacterial degradation of aromatic pollutants: A paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology*, **7**:173-180
- DIXON, R. & KAHN, D. (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, **2**:621-631
- DODGE, R. E., BACA, B. J., KNAP, A. H., SNEDAKER, S. C. & SLEETER, T. D. (1995) The effects of oil and chemically dispersed oil in tropical ecosystems: 10 years of monitoring experimental sites. *in*: Mrcs technical report series. (Marine Spill Response Corporation, Washington, D.C) pp-95-104
- DOS SANTOS, R. D. M. (2007) Avaliação da adição do pó da casca de coco verde, como material estruturante, na biorremediação de solo contaminado com petróleo. Programa de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química (Universidade Federal do Rio de Janeiro). Rio de Janeiro.
- ECKFORD, R., COOK, F. D., SAUL, D., AISLABIE, J. & FOGHT, J. (2002) Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria isolated from fuel-contaminated antarctic soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**:5181-5185
- EDWARDS, U., ROGALL, T., BLOCKER, H., EMDE, M. & BOTTGER, E. C. (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes - characterization of a gene coding for 16s-ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, **17**:7843-7853
- ERIKSSON, M., DALHAMMAR, G. & BORG-KARLSON, A. K. (1999) Aerobic degradation of a hydrocarbon mixture in natural uncontaminated potting soil by indigenous microorganisms at 20°C and 6°C. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **51**:532-535
- EVANS, F. F., ROSADO, A. S., SEBASTIAN, G. V., CASELLA, R., MACHADO, P., HOLMSTROM, C., KJELLEBERG, S., VAN ELSAS, J. D. & SELDIN, L. (2004) Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*, **49**:295-305
- FERRARI, V. C. & HOLLIBAUGH, J. T. (1999) Distribution of microbial assemblages in the central arctic ocean basin studied by PCR/DGGE: Analysis of a large data set. *Hydrobiologia*, **401**:55-68
- FOTI, M., SOROKIN, D. Y., LOMANS, B., MUSSMAN, M., ZACHAROVA, E. E., PIMENOV, N. V., KUENEN, J. G. & MUYZER, G. (2007) Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**:2093-2100
- FRANCIS, C. A., BEMAN, J. M. & KUYPERS, M. M. M. (2007) New processes and players in the nitrogen cycle: The microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *Isme Journal*, **1**:19-27
- FRIEDRICH, M. W., SCHMITT-WAGNER, D., LUEDERS, T. & BRUNE, A. (2001) Axial differences in community structure of crenarchaeota and euryarchaeota in the highly compartmentalized gut of the soil-feeding termite cubitermes orthognathus. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:4880-4890
- FRISHMAN, D., ALBERMANN, K., HANI, J., HEUMANN, K., METANOMSKI, A., ZOLLNER, A. & MEWES, H. W. (2001) Functional and structural genomics using pedant. *Bioinformatics*, **17**:44-57
- FURUKAWA, K., NODA, N., TSUNEDA, S., SAITO, T., ITAYAMA, T. & INAMORI, Y. (2006) Highly sensitive Real-time PCR assay for quantification of toxic cyanobacteria based on microcystin synthetase a gene. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **102**:90-96

- GEVERS, D., COHAN, F. M., LAWRENCE, J. G., SPRATT, B. G., COENYE, T., FEIL, E. J., STACKEBRANDT, E., VAN DE PEER, Y., VANDAMME, P., THOMPSON, F. L. & SWINGS, J. (2005) Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*, **3**:733-739
- GLOCKNER, F. O., FUCHS, B. M. & AMANN, R. (1999) Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: A first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**:3721-3726
- HALL, T. A. (1999) Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**:95-98
- HAMAMURA, N., OLSON, S. H., WARD, D. M. & INSKEEP, W. P. (2006) Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**:6316-6324
- HAMELIN, J., FROMIN, N., TARNAWSKI, S., TEYSSIER-CUVELLE, S. & ARAGNO, M. (2002) *NifH* gene diversity in the bacterial community associated with the rhizosphere of *Molinia coerulea*, an oligonitrophilic perennial grass. *Environmental Microbiology*, **4**:477-481
- HE, J., SHEN, J., ZHANG, L., ZHU, Y., ZHENG, Y., XU, M. & DI, H. J. (2007) Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environmental Microbiology*, **9**:2364-2374
- HEAD, I. M., JONES, D. M. & ROLING, W. F. M. (2006) Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, **4**:173-182
- HEIDER, J., SPORMANN, A. M., BELLER, H. R. & WIDDEL, F. (1998) Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, **22**:459-473
- HENRY, S., BAUDOIN, E., LOPEZ-GUTIERREZ, J. C., MARTIN-LAURENT, F., BAUMANN, A. & PHILIPPOT, L. (2004) Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted Real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, **59**:327-335
- HENRY, S., BRU, D., STRES, B., HALLET, S. & PHILIPPOT, L. (2006) Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16s rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**:5181-5189
- HEUER, H. & SMALLA, K. (1997) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. *in*: Van Elsas, J. D., Trevors, J. T. & Wellington, E. M. H. *Modern soil microbiology*. (Marcel Dekker, New York USA) pp-353-373
- HILL, E. C. (1984) Biodegradation of petroleum products. *in*: Atlas, R. M. *Petroleum microbiology*. (McMillan Publishing Co, New York) pp-579-612
- HOFFMANN, L. (1996) Recolonisation of the intertidal flats by microbial mats after the gulf war oil spill. *in*: Krupp, F., Abuzinada, A. H. & Nader, I. A. *A marine wildlife sanctuary for the arabian gulf*. (NCWCD, Senckenbergische Nat.forschende Gesellschaft, Riyadh, Frankfurt) pp-96-115
- HOLGUIN, G., BASHAN, Y., MENDOZA-SALGADO, R., AMADOR, E., TOLEDO, G., VÁZQUEZ, P. & AMADOR, A. (1999) La microbiología de los manglares. Bosques en la frontera entre el mar y la tierra. *Ciencia y Desarrollo*, 26-35
- HOLGUIN, G., GUZMAN, M. A. & BASHAN, Y. (1992) 2 new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees - their isolation, identification and *in vitro* interaction with rhizosphere staphylococcus sp. *FEMS Microbiology Ecology*, **101**:207-216
- HOLGUIN, G., VAZQUEZ, P. & BASHAN, Y. (2001) The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: An overview. *Biology and Fertility of Soils*, **33**:265-278
- HÖPNER, T., YOUSEF, M., BERTHE-CORTI, L., FELZMANN, H., STRUCK, H. & AL-THUKAIR, A. (1996) Cyanobacterial mats on oil-polluted sediments-start of a promising self-remediation process? *in*: Krupp, F., Abuzinada, H. A. & Nader, I. A. A

- marine sanctuary for the arabian gulf. (NCWCD, Senckenbergische Nat.forschende Gesellschaft, Riyadh, Frankfurt) pp-85-95
- HUBER, J. A., MARK WELCH, D., MORRISON, H. G., HUSE, S. M., NEAL, P. R., BUTTERFIELD, D. A. & SOGIN, M. L. (2007) Microbial population structures in the deep marine biosphere. *Science*, **318**:97-100
- HUGENHOLTZ, P. & PACE, N. R. (1996) Identifying microbial diversity in the natural environment: A molecular phylogenetic approach. *Trends in Biotechnology*, **14**:190-197
- INNEREBNER, G., KNAPP, B., VASARA, T., ROMANTSCHUK, M. & INSAM, H. (2006) Traceability of ammonia-oxidizing bacteria in compost-treated soils. *Soil Biology & Biochemistry*, **38**:1092-1100
- IWAMOTO, T., TANI, K., NAKAMURA, K., SUZUKI, Y., KITAGAWA, M., EGUCHI, M. & NASU, M. (2000) Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, **32**:129-141
- JOHNSEN, A. R. & KARLSON, U. (2005) PAH degradation capacity of soil microbial communities - does it depend on PAH exposure? *Microbial Ecology*, **50**:488-495
- JUCK, D., CHARLES, T., WHYTE, L. G. & GREER, C. W. (2000) Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern canadian communities. *FEMS Microbiology Ecology*, **33**:241-249
- JUKES, T. H. & CANTOR, C. R. (1969) Evolution of protein molecules. *in*: HN, M. Mammalian protein metabolism. (Academic Press, New York) pp-21-132
- JURAEVA, D., GEORGE, E., DAVRANOV, K. & RUPPEL, S. (2006) Detection and quantification of the *nifH* gene in shoot and root of cucumber plants. *Canadian Journal of Microbiology*, **52**:731-739
- JURGENS, G., GLÖCKNER, F., AMANN, R., SAANO, A., MONTONEN, L., LIKOLAMMI, M. & MÜNSTER, U. (2000) Identification of novel archaea in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent in situ hybridization. *FEMS Microbiology Ecology*, **34**:45-56
- JURGENS, G., LINDSTRÖM, K. & SAANO, A. (1997) Novel group within the kingdom crenarchaeota from boreal forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**:803-805
- KA, J. O., YU, Z. & MOHN, W. W. (2001) Monitoring the size and metabolic activity of the bacterial community during biostimulation of fuel-contaminated soil using competitive PCR and RT-PCR. *Microbial Ecology*, **42**:267-273
- KARNER, M. B., DELONG, E. F. & KARL, D. M. (2001) Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the pacific ocean. *Nature*, **409**:507-510
- KARTAL, B., KUYPERS, M. M. M., LAVIK, G., SCHALK, J., DEN CAMP, H., JETTEN, M. S. M. & STROUS, M. (2007) Anammox bacteria disguised as denitrifiers: Nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. *Environmental Microbiology*, **9**:635-642
- KJELDSSEN, K. U., LOY, A., JAKOBSEN, T. F., THOMSEN, T. R., WAGNER, M. & INGVOSEN, K. (2007) Diversity of sulfate-reducing bacteria from an extreme hypersaline sediment, Great Salt lake (Utah). *FEMS Microbiology Ecology*, **60**:287-298
- KLEKOWSKI, E. J., CORREDOR, J. E., MORRELL, J. M. & DELCASTILLO, C. A. (1994) Petroleum pollution and mutation in mangroves. *Marine Pollution Bulletin*, **28**:166-169
- KLEPAC-CERAJ, V., BAHR, M., CRUMP, B. C., TESKE, A. P., HOBBIE, J. E. & POLZ, M. F. (2004) High overall diversity and dominance of microdiverse relationships in salt marsh sulphate-reducing bacteria. *Environmental Microbiology*, **6**:686-698
- KLOTZ, M. G. & STEIN, L. Y. (2008) Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. *FEMS Microbiology Letters*, **278**:146-156
- KNIEMEYER, O., MUSAT, F., SIEVERT, S. M., KNITTEL, K., WILKES, H., BLUMENBERG, M., MICHAELIS, W., CLASSEN, A., BOLM, C., JOYE, S. B. & WIDDEL, F. (2007) Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. *Nature*, **449**:898-U810

- KONDO, R., PURDY, K. J., SILVA, S. D. Q. & NEDWELL, D. B. (2007) Spatial dynamics of sulphate-reducing bacterial compositions in sediment along a salinity gradient in a UK estuary. *Microbes and Environments*, **22**:11-19
- KÖNNEKE, M., BERNHARD, A. E., DE LA TORRE, J. R., WALKER, C. B., WATERBURY, J. B. & STAHL, D. A. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, **437**:543-546
- KORDA, A., SANTAS, P., TENENTE, A. & SANTAS, R. (1997) Petroleum hydrocarbon bioremediation: Sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **48**:677-686
- KRISTENSEN, E., JENSEN, M. H., BANTA, G. T., HANSEN, K., HOLMER, M. & KING, G. M. (1998) Transformation and transport of inorganic nitrogen in sediments of a southeast asian mangrove forest. *Aquatic Microbial Ecology*, **15**:165-175
- LABBE, D., MARGESIN, R., SCHINNER, F., WHYTE, L. G. & GREER, C. W. (2007) Comparative phylogenetic analysis of microbial communities in pristine and hydrocarbon-contaminated alpine soils. *FEMS Microbiology Ecology*, **59**:466-475
- LAGUERRE, G., BOSSAND, B. & BARDIN, R. (1987) Free-living dinitrogen-fixing bacteria isolated from petroleum refinery oily sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**:1674-1678
- LAI, H. C. (1986) Effects of oil on mangrove organisms. *in*: Maclean, J. L., L.B., D. & L.V., H. Proceedings of the first asian fisheries forum. pp-285-288
- LAMBAIS, M. R., CROWLEY, D. E., CURY, J. C., BULL, R. C. & RODRIGUES, R. R. (2006) Bacterial diversity in tree canopies of the atlantic forest. *Science*, **312**:1917-1917
- LANE, D. J. (1991) 16s/23s rRNA sequencing. *in*: Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. (Wiley, New York) pp-115-175
- LANGLOIS, R. J., LAROCHE, J. & RAAB, P. A. (2005) Diazotrophic diversity and distribution in the tropical and subtropical atlantic ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**:7910-7919
- LEHOURS, A. C., EVANS, P., BARDOT, C., JOBLIN, K. & GERARD, F. (2007) Phylogenetic diversity of archaea and bacteria in the anoxic zone of a meromictic lake (lake Pavin, France). *Applied and Environmental Microbiology*, **73**:2016-2019
- LEININGER, S., URICH, T., SCHLOTTER, M., SCHWARK, L., QI, J., NICOL, G. W., PROSSER, J. I., SCHUSTER, S. C. & SCHLEPER, C. (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, **442**:806-809
- LEWIS, R. R. I. (1983) Impact of oil spills on mangrove forests. *in*: Teas, H. J. Tasks for vegetation science vol. 8 (biology and ecology of mangroves). (Dr. W.Junk Publishers, The Hague) pp-171-183.
- LIANG, J. B., CHEN, Y. Q., LAN, C. Y., TAM, N. F. Y., ZAN, Q. J. & HUANG, L. N. (2007) Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment. *Marine Biology*, **150**:739-747
- LOZUPONE, C., HAMADY, M. & KNIGHT, R. (2006) Unifrac - an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *Bmc Bioinformatics*, **7**:
- MA, Y. F., WU, J. F., WANG, S. Y., JANG, C. Y., ZHANG, Y., QI, S. W., LIU, L., ZHAO, G. P. & LIU, S. J. (2007) Nucleotide sequence of plasmid pCNB-1 from *Comamonas* strain cnb-1 reveals novel genetic organization and evolution for 4-chloronitrobenzene degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**:4477-4483
- MACNAUGHTON, S. J., STEPHEN, J. R., VENOSA, A. D., DAVIS, G. A., CHANG, Y. J. & WHITE, D. C. (1999) Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**:3566-3574
- MARGESIN, R., LABBE, D., SCHINNER, F., GREER, C. W. & WHYTE, L. G. (2003) Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**:3085-3092
- MARRI, P. R., HAO, W. & GOLDING, G. B. (2007) The role of laterally transferred genes in adaptive evolution. *BMC Evolutionary Biology*, **7**:
- MARTINY, J. B. H., BOHANNAN, B. J. M., BROWN, J. H., COLWELL, R. K., FUHRMAN, J. A., GREEN, J. L., HORNER-DEVINE, M. C., KANE, M., KRUMINS, J. A., KUSKE, C.

- R., MORIN, P. J., NAEEM, S., OVREAS, L., REYSENBACH, A. L., SMITH, V. H. & STALEY, J. T. (2006) Microbial biogeography: Putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology*, **4**:102-112
- MARUYAMA, A., ISHIWATA, H., KITAMURA, K., SUNAMURA, M., FUJITA, T., MATSUO, M. & HIGASHIHARA, T. (2003) Dynamics of microbial populations and strong selection for *Cycloclasticus pugetii* following the Nakhodka oil spill. *Microbial Ecology*, **46**:442-453
- MCMAHON, K. D., MARTIN, H. G. & HUGENHOLTZ, P. (2007) Integrating ecology into biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, **18**:287-292
- MEYER, S., MOSER, R., NEEF, A., STAHL, U. & KAMPFER, P. (1999) Differential detection of key enzymes of polyaromatic-hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes. *Microbiology-Uk*, **145**:1731-1741
- MILETTO, M., BODELIER, P. L. E. & LAANBROEK, H. J. (2007) Improved pcr-dgge for high resolution diversity screening of complex sulfate-reducing prokaryotic communities in soils and sediments. *Journal of Microbiological Methods*, **70**:103-111
- MIRALLES, G., GROSSI, V., ACQUAVIVA, M., DURAN, R., BERTRAND, J. C. & CUNY, P. (2007a) Alkane biodegradation and dynamics of phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria in an anoxic coastal marine sediment artificially contaminated with oil. *Chemosphere*, **68**:1327-1334
- MIRALLES, G., NERINI, D., MANTE, C., ACQUAVIVA, M., DOUMENQ, P., MICHOTÉY, V., NAZARET, S., BERTRAND, J. C. & CUNY, P. (2007b) Effects of spilled oil on bacterial communities of mediterranean coastal anoxic sediments chronically subjected to oil hydrocarbon contamination. *Microbial Ecology*, **54**:646-661
- MONTOYA, J. P., HOLL, C. M., ZEHR, J. P., HANSEN, A., VILLAREAL, T. A. & CAPONE, D. G. (2004) High rates of N₂ fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic pacific ocean. *Nature*, **430**:1027-1031
- MUSAT, F., HARDER, J. & WIDDEL, F. (2006) Study of nitrogen fixation in microbial communities of oil-contaminated marine sediment microcosms. *Environmental Microbiology*, **8**:1834-1843
- MUSSMANN, M., ISHII, K., RABUS, R. & AMANN, R. (2005) Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured deltaproteobacteria in an intertidal mud flat of the Wadden sea. *Environmental Microbiology*, **7**:405-418
- MUYZER, G., DEWAAL, E. C. & UITTERLINDEN, A. G. (1993) Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16s ribosomal-RNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**:695-700
- NICOL, G. W., GLOVER, L. A. & PROSSER, J. I. (2003) The impact of grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. *Environ Microbiol*, **5**:152-162
- NICOL, G. W. & SCHLEPER, C. (2006) Ammonia-oxidising crenarchaeota: Important players in the nitrogen cycle? *Trends in Microbiology*, **14**:207-212
- NODA, S., OHKUMA, M., USAMI, R., HORIKOSHI, K. & KUDO, T. (1999) Culture-independent characterization of a gene responsible for nitrogen fixation in the symbiotic microbial community in the gut of the termite *Neotermes koshunensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**:4935-4942
- NYER, E. K. (1998) Groundwater and soil remediation: Practical methods and strategies. (Michigan, Ann Arbor Press)
- OCHSENREITER, T., SELEZI, D., QUAISER, A., BONCH-OSMOLOVSKAYA, L. & SCHLEPER, C. (2003) Diversity and abundance of crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16s rna surveys and real time PCR. *Environmental Microbiology* **5**:787-797
- OLINE, D. K. (2006) Phylogenetic comparisons of bacterial communities from serpentine and nonserpentine soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**:6965-6971
- OLIVERA, N. L., ESTEVES, J. L. & COMMENDATORE, M. G. (1997) Alkane biodegradation by a microbial community from contaminated sediments in Patagonia, Argentina. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **40**:75-79

- OMOREGIE, E. O., CRUMBLISS, L. L., BEBOUT, B. M. & ZEHR, J. P. (2004) Determination of nitrogen-fixing phylotypes in *Lyngbya sp* and *Microcoleus chthonoplastes* cyanobacterial mats from Guerrero Negro, Baja California, Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**:2119-2128
- OSBORN, A. M., MOORE, E. R. B. & TIMMIS, K. N. (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, **2**:39-50
- PEREZ-JIMENEZ, J. R. & KERKHOF, L. J. (2005) Phylogeography of sulfate-reducing bacteria among disturbed sediments, disclosed by analysis of the dissimilatory sulfite reductase genes (*dsrAB*). *Applied and Environmental Microbiology*, **71**:1004-1011
- PEREZ-VARGAS, J., POGGI-VARALDO, H. M., CALVA-CALVA, G., RIOS-LEAL, E., RODRIGUEZ-VARQUEZ, R., FERRERA-CERRATO, R. & ESPARZA-GARCIA, F. (2000) Nitrogen-fixing bacteria capable of utilising kerosene hydrocarbons as a sole carbon source. *Water Science and Technology*, **42**:407-410
- PHILIPPOT, L. & HALLIN, S. (2005) Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. *Current Opinion in Microbiology*, **8**:234-239
- PIEHLER, M. F., SWISTAK, J. G., PINCKNEY, J. L. & PAERL, H. W. (1999) Stimulation of diesel fuel biodegradation by indigenous nitrogen fixing bacterial consortia. *Microbial Ecology*, **38**:69-78
- POLY, F., MONROZIER, L. J. & BALLY, R. (2001) Improvement in the *rflp* procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, **152**:95-103
- POLYMENAKOU, P. N., TSELEPIDES, A., STEPHANOU, E. G. & BERTILSSON, S. (2006) Carbon speciation and composition of natural microbial communities in polluted and pristine sediments of the eastern Mediterranean sea. *Marine Pollution Bulletin*, **52**:1396-1405
- POMMIER, T., CANBACK, B., RIEMANN, L., BOSTROM, K. H., SIMU, K., LUNDBERG, P., TUNLID, A. & HAGSTROM, A. (2007) Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Molecular Ecology*, **16**:867-880
- POTTS, M. (1984) Nitrogen fixation in mangrove forests. *in*: Por, F. D. & Dor, I. *Hydrobiology of the mangal. The ecosystem of the mangrove forest.* (Junk, The Hague) pp-155-162
- POWELL, S. M., FERGUSON, S. H., BOWMAN, J. P. & SNAPE, I. (2006) Using real-time *pcr* to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in antarctic soil during bioremediation. *Microbial Ecology*, **52**:523-532
- PRANTERA, M. T., DROZDOWICZ, A., LEITE, S. G. & ROSADO, A. S. (2002) Degradation of gasoline aromatic hydrocarbons by two N₂-fixing soil bacteria. *Biotechnology Letters*, **24**:85-89
- PRESTON, C. M., WU, K. Y., MOLINSKI, T. F. & DELONG, E. F. (1996) A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. Nov., sp. Nov. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:6241-6246
- RAMSAY, M. A., SWANNELL, R. P. J., SHIPTON, W. A., DUKE, N. C. & HILL, R. T. (2000) Effect of bioremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, **41**:413-419
- RAYMOND, J., SIEFERT, J. L., STAPLES, C. R. & BLANKENSHIP, R. E. (2004) The natural history of nitrogen fixation. *Molecular Biology and Evolution*, **21**:541-554
- REES, G. N. & PATEL, B. K. C. (2001) *Desulforegula conservatrix* gen. Nov., sp nov., a long-chain fatty acid-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from sediments of a freshwater lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**:1911-1916
- RITTMANN, B. E. (2006) Microbial ecology to manage processes in environmental biotechnology. *Trends in Biotechnology*, **24**:261-266
- RITTMANN, B. E., HAUSNER, M., LOFFLER, F., LOVE, N. G., MUYZER, G., OKABE, S., OERTHER, D. B., PECCIA, J., RASKIN, L. & WAGNER, M. (2006) A vista for

- microbial ecology and environmental biotechnology. *Environmental Science & Technology*, **40**:1096-1103
- ROLING, W. F. M., DE BRITO, I. R. C., SWANNELL, R. P. J. & HEAD, I. M. (2004) Response of archaeal communities in beach sediments to spilled oil and bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**:2614-2620
- ROSADO, A. S. & DUARTE, G. F. (2002) Utilização de eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TGGE) para estudar a diversidade microbiana. *in*: de Mello, I. S., Valadares-Inglis, M. C., Nass, L. L. & Valois, A. C. C. Genética e melhoramento de microrganismos. (Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna) pp-p. 97-128
- ROSADO, A. S., DUARTE, G. F., SELDIN, L. & VAN ELSAS, J. D. (1997) Molecular microbial ecology: A minireview. *Revista De Microbiologia*, **28**:135-147
- ROTTHAUWE, J. H., WITZEL, K. P. & LIESACK, W. (1997) The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**:4704-4712
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. (2001) Molecular cloning: A laboratory manual (third edition). (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press) p- 2,344
- SANCHEZ, O., DIESTRA, E., ESTEVE, I. & MAS, J. (2005) Molecular characterization of an oil-degrading cyanobacterial consortium. *Microbial Ecology*, **50**:580-588
- SANTORO, A. E., BOEHM, A. B. & FRANCIS, C. A. (2006) Denitrifier community composition along a nitrate and salinity gradient in a coastal aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**:2102-2109
- SASAKI, K., HARUTA, S., UENO, Y., ISHII, M. & IGARASHI, Y. (2007) Microbial population in the biomass adhering to supporting material in a packed-bed reactor degrading organic solid waste. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **75**:941-952
- SCHLEPER, C., HOLBEN, W. & KLENK, H. P. (1997) Recovery of crenarchaeotal ribosomal DNA sequences from freshwater-lake sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**:321-323
- SCHLEPER, C., JURGENS, G. & JONUSCHEIT, M. (2005) Genomic studies of uncultivated archaea. *Nature Reviews Microbiology*, **3**:479-488
- SCHLOSS, P. D. & HANDELSMAN, J. (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**:1501-1506
- SCHLOSS, P. D. & HANDELSMAN, J. (2006a) Introducing sons, a tool for operational taxonomic unit-based comparisons of microbial community memberships and structures. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**:6773-6779
- SCHLOSS, P. D. & HANDELSMAN, J. (2006b) Introducing treeclimber, a test to compare microbial community structures. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**:2379-2384
- SCHLOSS, P. D., LARGET, B. R. & HANDELSMAN, J. (2004) Integration of microbial ecology and statistics: A test to compare gene libraries. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**:5485-5492
- SEABRA, P. N. C. (2005) Aplicação de biopilha na biorremediação de solos contaminados com petróleo. Programa de Engenharia Química da COPPE (Universidade Federal do Rio de Janeiro). Rio de Janeiro.
- SEITZINGER, S. P. & KROEZE, C. (1998) Global distribution of nitrous oxide production and n inputs in freshwater and coastal marine ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles*, **12**:93-113
- SEITZINGER, S. P. & SANDERS, R. W. (1997) Contribution of dissolved organic nitrogen from rivers to estuarine eutrophication. *Marine Ecology-Progress Series*, **159**:1-12
- SENGUPTA, A. & CHAUDHURI, S. (1991) Ecology of heterotrophic dinitrogen fixation in the rhizosphere of mangrove plant community at the Ganges river estuary in india. *Oecologia*, **87**:560-564

- SHORT, S. M., JENKINS, B. D. & ZEHR, J. P. (2004) Spatial and temporal distribution of two diazotrophic bacteria in the Chesapeake bay. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**:2186-2192
- SHORT, S. M. & ZEHR, J. P. (2005) Quantitative analysis of *nifH* genes and transcripts from aquatic environments. *in: Environmental microbiology*. pp-380-394
- SIMONET, P., GROJEAN, M. C., MISRA, A. K., NAZARET, S., COURNOYER, B. & NORMAND, P. (1991) Frankia genus-specific characterization by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**:3278-3286
- SINGLETON, D. R., FURLONG, M. A., RATHBUN, S. L. & WHITMAN, W. B. (2001) Quantitative comparisons of 16s rDNA sequence libraries from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:4373-4376
- SOGIN, M. L., MORRISON, H. G., HUBER, J. A., WELCH, D. M., HUSE, S. M., NEAL, P. R., ARRIETA, J. M. & HERNDL, G. J. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "Rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**:12115-12120
- SORKHOH, N., ALHASAN, R., RADWAN, S. & HOPNER, T. (1992) Self-cleaning of the gulf. *Nature*, **359**:109-109
- STACKEBRANDT, E. & GOEBEL, B. M. (1994) A place for DNA-DNA reassociation and 16s ribosomal-RNA sequence-analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **44**:846-849
- STROUS, M., PELLETIER, E., MANGENOT, S., RATTEI, T., LEHNER, A., TAYLOR, M. W., HORN, M., DAIMS, H., BARTOL-MAVEL, D., WINCKER, P., BARBE, V., FONKNECHTEN, N., VALLENET, D., SEGURENS, B., SCHENOWITZ-TRUONG, C., MEDIGUE, C., COLLINGRO, A., SNEL, B., DUTILH, B. E., OP DEN CAMP, H. J. M., VAN DER DRIFT, C., CIRPUS, I., VAN DE PAS-SCHOONEN, K. T., HARHANGI, H. R., VAN NIFTRIK, L., SCHMID, M., KELTJENS, J., VAN DE VOSENBERG, J., KARTAL, B., MEIER, H., FRISHMAN, D., HUYNEN, M. A., MEWES, H. W., WEISSENBACH, J., JETTEN, M. S. M., WAGNER, M. & LE PASLIER, D. (2006) Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, **440**:790-794
- SUZUKI, D., UEKI, A., AMAISHI, A. & UEKI, K. (2007a) *Desulfopila aestuarii* gen. nov., sp nov., a gram-negative, rod-like, sulfate-reducing bacterium isolated from an estuarine sediment in japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**:520-526
- SUZUKI, D., UEKI, A., AMAISHI, A. & UEKI, K. (2007b) Diversity of substrate utilization and growth characteristics of sulfate-reducing bacteria isolated from estuarine sediment in japan. *Journal of General and Applied Microbiology*, **53**:119-132
- THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D. G. (1997) The clustal-x windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **25**:4876-4882
- TOCCALINO, P. L., JOHNSON, R. L. & BOONE, D. R. (1993) Nitrogen limitation and nitrogen-fixation during alkane biodegradation in a sandy soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**:2977-2983
- TREUSCH, A. H., LEININGER, S., KLETZIN, A., SCHUSTER, S. C., KLENK, H. P. & SCHLEPER, C. (2005) Novel genes for nitrite reductase and *amo*-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology*, **7**:1985-1995
- TROTT, L. A. & ALONGI, D. M. (2000) The impact of shrimp pond effluent on water quality and phytoplankton biomass in a tropical mangrove estuary. *Marine Pollution Bulletin*, **40**:947-951
- USEPA-8015B (1996) Nonhalogenated organics using GC/FID. Environmental Protection Agency, , **Revision 2**:28
- UYTTEBROEK, M., SPODEN, A., ORTEGA-CALVO, J. J., WOUTERS, K., WATTIAU, P., BASTIAENS, L. & SPRINGAEL, D. (2007) Differential responses of eubacterial, mycobacterium, and sphingomonas communities in polycyclic aromatic hydrocarbon

- (PAH)-contaminated soil to artificially induced changes in pah profile. *Journal of Environmental Quality*, **36**:1403-1411
- VAN DER MAAREL, M. J., ARTZ, R. R., HAANSTRA, R. & FORNEY, L. J. (1998) Association of marine archaea with the digestive tracts of two marine fish species. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**:2894-2498
- VAZQUEZ, P., HOLGUIN, G., PUENTE, M. E., LOPEZ-CORTES, A. & BASHAN, Y. (2000) Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, **30**:460-468
- VENTER, J. C., REMINGTON, K., HEIDELBERG, J. F., HALPERN, A. L., RUSCH, D., EISEN, J. A., WU, D. Y., PAULSEN, I., NELSON, K. E., NELSON, W., FOUTS, D. E., LEVY, S., KNAP, A. H., LOMAS, M. W., NEALSON, K., WHITE, O., PETERSON, J., HOFFMAN, J., PARSONS, R., BADEN-TILLSON, H., PFANNKOCH, C., ROGERS, Y. H. & SMITH, H. O. (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso sea. *Science*, **304**:66-74
- VERGARA-FILHO, W. L. (1993) A utilização da endofauna e incrustantes como indicadores para monitoramento de áreas de manguezais. Manguezal do Rio são braz, mangaratiba, rio de janeiro. (PUC). Rio de Janeiro.
- VETRIANI, C., JANNASCH, H. W., MACGREGOR, B. J., STAHL, D. A. & REYSENBACH, A. L. (1999) Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**:4375-4384
- VINAS, M., SABATE, J., ESPUNY, M. J. & SOLANAS, A. M. (2005) Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**:7008-7018
- WATANABE, K. & HAMAMURA, N. (2003) Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation. *Current Opinion in Biotechnology*, **14**:289-295
- WILMS, R., KOPKE, B., SASS, H., CHANG, T. S., CYPIONKA, H. & ENGELN, B. (2006) Deep biosphere-related bacteria within the subsurface of tidal flat sediments. *Environmental Microbiology*, **8**:709-719
- YAMADA, T., IMACHI, H., OHASHI, A., HARADA, H., HANADA, S., KAMAGATA, Y. & SEKIGUCHI, Y. (2007) *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp nov and *longilinea arvooryzae* gen. nov., sp nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum chloroflexi isolated from methanogenic propionate-degrading consortia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**:2299-2306
- YAMADA, T., SEKIGUCHI, Y., HANADA, S., IMACHI, H., OHASHI, A., HARADA, H. & KAMAGATA, Y. (2006) *Anaerolinea thermolimosa* sp nov., *levilinea saccharolytica* gen. nov., sp nov and *leptolinea tardivitalis* gen. nov., so. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes anaerolineae classis nov and caldililineae classis nov in the bacterial phylum chloroflexi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**:1331-1340
- ZEHR, J. P., JENKINS, B. D., SHORT, S. M. & STEWARD, G. F. (2003) Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross-system comparison. *Environmental Microbiology*, **5**:539-554
- ZEHR, J. P., MELLON, M. T. & ZANI, S. (1998) New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of nitrogenase (*nifH*) genes (vol 64, pg 3444, 1998). *Applied and Environmental Microbiology*, **64**:5067-5067
- ZENGLER, K., RICHNOW, H. H., ROSSELLO-MORA, R., MICHAELIS, W. & WIDDEL, F. (1999) Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature*, **401**:266-269
- ZHANG, T. & FANG, H. H. P. (2006) Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **70**:281-289
- ZYSMAN, N. (1989) Era verde?. Ecosystemas brasileiros ameaçados. (São Paulo, Atual)

ELA DE CLASSIFICAÇÃO DOS CLONES DE RRS

Identificador*	Filiação taxonômica**					
26987	Bacteria	Acidobacteria	BPC102			
27612	Bacteria	Acidobacteria	RB25	JG37-AG-81		
35402	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobidae	koll13	JTB31	Uncl.
52611	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobidae	koll13	JTB31	Uncl.
57146	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobidae	Microthrixineae	Candidatus Microthrix	
95734	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteridae	Corynebacterineae	Mycobacteriaceae	Uncl.
70096	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteridae	Corynebacterineae	Mycobacteriaceae	Uncl.
07104	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	GoM_GC185_546E	GoM
34312	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	T78	Eub_
14124	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	T78	Eub_
07569	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	GoM_GC185_546E	GoM
18833	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	T78	Eub_
41361	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	DRC31	Napoli-2B-44 BC07-2B-44	Uncl.
47887	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	DRC31	Unclassified	
44036	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	MSB-4F5		
6043	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	MSB-4F5		
48818	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	OPB11	UNNAMEABLE 1178613543	
31638	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	OPB11	Unclassified	
55198	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	OPB11	Napoli-4B-61 BC07-4B-61	
6777	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20		
70125	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20		
72494	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20		
60808	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20		
84514	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20		
687	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20		
78802	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20		
69107	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20		
72683	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20		
75008	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20		
41594	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Unclassified		
5013	Bacteria	Chloroflexi	Dehalococcoidetes	GIF9	Unclassified	

00713	Bacteria	Firmicutes	Lachnospiraceae	RL302_aal95g03	RL241 aaj03c07	RL19
7745	Bacteria	Firmicutes	Symbiobacteria	OPB54	BSV81	
83758	Bacteria	Gemmatimonadetes	Gemm_4			
88064	Bacteria	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemm-1c		
32035	Bacteria	Lentisphaerae	Unclassified			
49065	Bacteria	OS-K	Sva0450			
1097	Bacteria	Planctomycetes	agg27	CL500-15	B83	
40518	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetacia	Pirellulales	A17	A25
43571	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Azospirillales	Azos
5921	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Uncl.
33993	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Unclassified	
31754	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyll
67378	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Bradyrhizobiales	
80444	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Hyph H9
57073	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	B2M28		
60677	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	B2M28		
7809	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	KCM-B-13	KCM-B-23	
93976	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	KCM-B-13	KCM-B-23	
50067	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	MP1-2H		
37757	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	OM60	Unclassified	
40228	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Piscirickettsiaceae	Unclassified	
55402	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	sulfur oxidizing symbionts	Unclassified	
11159	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	sulfur oxidizing symbionts	Symbionts	Uncl.
69049	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
44239	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
7761	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
90647	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
49297	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
89993	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
69456	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
38411	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
51768	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
73075	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		

67469	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Bdellovibrionales	Bdellovibrio	Uncl.
4469	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacteraceae	Unclassified	
62596	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacteraceae	Unclassified	
67654	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterium	Unclassified	
59907	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterium	Unclassified	
89242	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobulbaceae	Desulfocapsa	
9084	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	Uncl.
45184	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales	Unclassified	
06276	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Polyangiaceae	Uncl.
50285	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Nitrospina	Bol11	
33818	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacteraceae	Thermodesulforhabdus	
42553	Bacteria	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	TM3	
28746	Bacteria	TM7	TM7-1	Unclassified		
41449	Bacteria	Verrucomicrobia	Verruco-7	Unclassified		
83384	Bacteria	WS3	Unclassified			
90957	Bacteria	WS6	toluene-degrading methanogenic consortium bacterium	WCHB1-15	WCHB1-01	
53774	Bacteria	Acidobacteria	RB25	JG37-AG-81		
14458	Bacteria	Acidobacteria	RB25	Unclassified		
65924	Bacteria	Acidobacteria	Sva0725			
64442	Bacteria	Acidobacteria	Sva0725			
59679	Bacteria	Acidobacteria	Unclassified			
52698	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobidae	a13110		
90037	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobidae	CL500-29	ML316M-15	
67828	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobidae	koll13	JTB31	Uncl.
45315	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobidae	koll13	Unclassified	
51608	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobidae	Microthrixineae	Unclassified	
74558	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteridae	Streptomycineae		
99692	Bacteria	Actinobacteria	Rubrobacteridae	Thermoleophilaceae	Unclassified	
68948	Bacteria	AD3	JG37-AG-4	JG30-KF-C12	JG30-KF-A11	
48764	Bacteria	Bacteroidetes	Crenotrichaceae	Unclassified		
48614	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriales	Cytophaga	Zobellia	Robiq
57727	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriales	Cytophaga	Zobellia	Aure
77014	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriales	LCP-72		

28688	Bacteria	Bacteroidetes	Flexibacterales	Microscilla		
23063	Bacteria	Caldithrix_KSB1	Caldithrixales	Unclassified		
51172	Bacteria	Chlorobi	ZB1	Unclassified		
25534	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	GoM_GC185_546E	GoM
73428	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	SB-34	
43454	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Unclassified	
53556	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	GoM_GC185_546E	GoM
6075	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	GCA004	
47437	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	GCA004	
47611	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	DRC31	Napoli-2B-44 BC07-2B-44	Uncl.
68501	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SJA-101	UNNAMEABLE 1178613713	
32103	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SOGA31		
12918	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Unclassified		
21377	Bacteria	Chloroflexi	Dehalococcoidetes	Unclassified		
78341	Bacteria	Firmicutes	Desulfosporosinus	Unclassified		
41405	Bacteria	Gemmatimonadetes	Gemm_2			
52277	Bacteria	Gemmatimonadetes	Gemm_2			
90419	Bacteria	Lentisphaerae	Unclassified			
41089	Bacteria	OD2	candidate_division_OP11	Unclassified		
43469	Bacteria	OP8	OP8_1	Unclassified		
45664	Bacteria	OP8	OP8_1	Unclassified		
48643	Bacteria	OP8	OP8_1	Unclassified		
43847	Bacteria	OS-K	Sva0450			
63526	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetacia	Pirellulales	Unclassified	
49719	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetacia	Pirellulales	Unclassified	
83268	Bacteria	Planctomycetes	Unclassified			
28673	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alcanivoracaceae	Unclassified	
72349	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rose
61244	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyll
48774	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rose
78482	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rose
5684	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Unclassified	
37001	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Unclassified	
76505	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Bradyrhizobiales	

39399	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Hyph Rose
75284	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Bradyrhizobiales	
50663	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyph Phyll
38673	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Oleomonas	ZA25
88234	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Hypl
3235	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Bradyrhizobiales	
97057	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Betaproteobacteria	Thiobacillus	Hyph
74093	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Chromatiaceae	Allochrochromatium	
53134	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	HTCC2207		
63148	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Oceanospirillaceae	Marinobacterium	
62901	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	OM60	Unclassified	
70633	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	OM60	Unclassified	
82944	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	OM60	Unclassified	
38716	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Piscirickettsiaceae	<i>Oligobrachia mashikoi</i> endosymbiont	Uncl.
85807	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Psychromonadaceae		
63628	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	SZB50		
73526	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
17612	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
50533	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
67058	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
37248	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
69093	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
77494	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
87406	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
80401	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
64718	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
68381	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
286	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Xanthomonadales	gamma proteobacterium WJ2	
8495	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacteraceae	Unclassified	
60692	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacteraceae	Unclassified	
84125	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacteraceae	Unclassified	
59529	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterium	Unclassified	

7434	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobulbaceae	Unclassified	
54515	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobulbaceae	Unclassified	
60183	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobulbaceae	Unclassified	
7338	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobulbaceae	Unclassified	
72363	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobulbaceae	Unclassified	
6607	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobulbaceae	Desulfobulbus	BD1-
65837	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobulbaceae	Unclassified	
4171	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobulbaceae	Desulfobulbus	
75125	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobulbaceae	Desulfobulbus	deltap MLM BD1-
64689	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobulbaceae	Desulfobulbus	BD1-
87628	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	Desu
17787	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales	Unclassified	
58119	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales	Unclassified	
23339	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales	Geobacteraceae	Uncl.
46492	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales	Unclassified	
38876	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	EB1021	H16	
80793	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Hyd89-23		
06625	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Hyd89-23		
41449	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Hyd89-23		
09357	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Polyangiaceae	Uncl.
25839	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Unclassified	
01436	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Unclassified	
26784	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	NB1-j	Unclassified	
62048	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Nitrospina	Bol11	
04619	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	SHA-72		
74325	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Unclassified		
93525	Bacteria	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Sulfurovumales	Sulfurovumaceae	Sulfu
54428	Bacteria	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	TM3	
94416	Bacteria	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Unclassified	
22423	Bacteria	TM6				
88602	Bacteria	WS3	Unclassified			
17162	Bacteria	Acidobacteria	FW32			
49806	Bacteria	Acidobacteria	Sva0725			

90168	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobidae	CL500-29	ML316M-15	
33469	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobidae	koll13	JTB31	Uncl.
28731	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobidae	koll13	JTB31	Uncl.
32844	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobidae	koll13	Unclassified	
33949	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobidae	koll13	Unclassified	
40635	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobidae	koll13	BS1-0-27	
6059	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobidae	Unclassified		
86418	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteridae	Corynebacterineae	Mycobacteriaceae	Uncl.
50533	Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidales	Unclassified		
63337	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriales	Cytophaga	Zobellia	Robiq
63555	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriales	Cytophaga	Zobellia	Robiq
17889	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriales	Cytophaga	Zobellia	Robiq
50765	Bacteria	Bacteroidetes	Flexibacterales	Roseivirga		
38745	Bacteria	Bacteroidetes	Saprosirales	Saprosiraceae	Ebpr18	
38222	Bacteria	Bacteroidetes	Saprosirales	Saprosiraceae	SF07	
17191	Bacteria	Caldithrix_KSB1	Unclassified			
55591	Bacteria	Chlorobi	ZB1	PHOS-HE36		
54534	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	A4b	Unclassified	
25228	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	T78	Eub_
26813	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	T78	Eub_
43022	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	GoM GC185 546E	GoM
13121	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	DRC31	Napoli-2B-44 BC07-2B-44	Uncl.
51288	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	DRC31	Unclassified	
50881	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	DRC31	Unclassified	
52785	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	DRC31	Napoli-2B-44 BC07-2B-44	Uncl.
54384	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Eub6	UNNAMEABLE 1178613600	
59693	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	H143f		
32437	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	MSB-4F5		
46826	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	MSB-4F5		
67266	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	MSB-4F5		
47422	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	OPB11	UNNAMEABLE 1178613543	
9132	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	OPB11	Unclassified	
75808	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20		
29414	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20		

74282	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20		
75909	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20		
73192	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20		
59137	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20		
01959	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SJA-15		
18862	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Unclassified		
13121	Bacteria	Chloroflexi	Chloroflexi-4	SAR261		
46507	Bacteria	Gemmatimonadetes	Gemm_4			
69238	Bacteria	Gemmatimonadetes	Gemm_4			
1706	Bacteria	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemm-1c		
41268	Bacteria	OP11	Eub_2	OPB92	SM1F02	Uncl.
72072	Bacteria	OS-K	Sva0450			
37931	Bacteria	Planctomycetes	WPS-1	BD2-16		
84896	Bacteria	Planctomycetes	WPS-1	BD2-16		
38237	Bacteria	Planctomycetes	WPS-1	BD2-16		
06058	Bacteria	Planctomycetes	WPS-1	CL120-56	CL500-3	HTA
16537	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	AEGEAN_245		
89877	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alcanivoracaceae	Unclassified	
8197	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Bradyrhizobiales	Rhod
7479	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	H9
69035	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rose
69921	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rose
66695	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	H9
5466	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	MNH2	
59573	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rose
51695	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	MNH2	
93627	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	B91-12		
67654	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Thau
8979	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Thau
86214	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Chromatiaceae	Unclassified	
81534	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Chromatiaceae	Unclassified	
75502	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	KCM-B-13	KCM-B-23	
22641	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	MP1-2H		
59384	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Piscirickettsiaceae	Unclassified	

70415	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	sulfuroxidizingsymbionts	Unclassified	
11595	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	sulfuroxidizingsymbionts	Symbionts	Uncl.
90066	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
69776	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
96781	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
45169	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
62829	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
66826	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
22249	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacteraceae	Unclassified	
76331	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacteraceae	Unclassified	
46884	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacteraceae	Unclassified	
64936	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterium	ODP1230B1718	
62567	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterium	ODP1230B1718	
63933	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterium	Unclassified	
65677	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterium	Unclassified	
86713	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobulbaceae	WCHB1-67	
50271	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobulbaceae	Desulfobulbus	Uncl.
1193	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobulbaceae	Desulfobulbus	BD1-
8495	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Hyd89-23		
58715	Bacteria	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Unclassified	
6667	Bacteria	TM6				
91102	Bacteria	TM7	TM7-1	Unclassified		
07889	Bacteria	TM7	TM7-1	Unclassified		
12336	Bacteria	WS6	toluene-degrading methanogenic consortium bacterium	WCHB1-15	WCHB1-01	
20087	Bacteria	ZB2	BD5-13			
93878	Bacteria	Acidobacteria	ABS-327	Unclassified		
38585	Bacteria	Acidobacteria	RB25	Unclassified		
54195	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobidae	koll13	Unclassified	
79209	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteridae	Corynebacterineae	Mycobacteriaceae	Uncl.
93932	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteridae	Corynebacterineae	Gordoniaceae	
98979	Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidales	Unclassified		
5389	Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidales	Unclassified		
75982	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriales	Cytophaga	Unclassified	

58119	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriales	Cytophaga	Zobellia	<i>Cytop</i>
43338	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriales	Cytophaga	Zobellia	<i>Cytop</i>
77072	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriales	Cytophaga	Zobellia	Uncl.
18397	Bacteria	Caldithrix_KSB1	Caldithriales	Unclassified		
79543	Bacteria	Chlorobi	Chlorobiales	Chlorobiaceae	Prosthecochloris	<i>Prost. vibrio</i>
59428	Bacteria	Chlorobi	Chlorobiales	Chlorobiaceae	Prosthecochloris	Uncl.
28034	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	T78	Eub_
27321	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	T78	Eub_
19473	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	T78	Eub_
01799	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	SHD-14	
16174	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	SHD-14	
05912	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Caldilineaceae	Unclassified	
14924	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	DRC31	Napoli-2B-44 BC07-2B-44	Uncl.
5921	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	DRC31	Napoli-2B-44 BC07-2B-44	Uncl.
58744	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	OPB11	Unclassified	
43861	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	OPB11	Unclassified	
52277	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	OPB11	Unclassified	
57073	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	OPB11	Unclassified	
27801	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	S0208	Unclassified	
63206	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20		
5498	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20		
55838	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20		
41812	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20		
9741	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Unclassified		
34229	Bacteria	Chloroflexi	Bljii12	EB1097	Unclassified	
93311	Bacteria	Chloroflexi	Dehalococcoidetes	H14f		
88471	Bacteria	Chloroflexi	Dehalococcoidetes	vadinBA26		
97105	Bacteria	Gemmatimonadetes	Gemm_4			
2266	Bacteria	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Ellin5301	
00258	Bacteria	Lentisphaerae	Unclassified			
1875	Bacteria	OP10	RB519			
94692	Bacteria	OP9_JS1	JS1	SB-15		
72334	Bacteria	OS-K	Sva0450			

55503	Bacteria	OS-K	Sva0450				
62756	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alcanivoracaceae	Unclassified		
86636	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales		Hyph
60198	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales		Porpi
61564	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales		Roseo
29778	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales		Uncl.
553	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales		Roseo
56274	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales		Roseo
50838	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Devosia		
87769	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales		Porpi
19298	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales		Roseo
73468	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Bradyrhizobiales		
6591	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales		Hyph Phyll
81898	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Unclassified		
66084	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Unclassified		
89732	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Stappia		Uncl.
70067	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Stappia		Uncl.
6732	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Stappia		Uncl.
41042	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales		Phyll
17249	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Unclassified		
35795	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales		Uncl.
26929	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Bradyrhizobiales		LO13
31187	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales		Uncl.
46201	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Bradyrhizobiales		
61583	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales		Hyph Phyll
68003	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales		Rhod
47757	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales		Roseo
47873	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Defluvicoccus		
81113	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	B91-12			
54878	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	BD1-1			
4953	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Chromatiaceae	Unclassified		
52378	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	DS063			
75924	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	HTCC2207			

88278	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	KCM-B-13	KCM-B-23	
10098	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	KCM-B-13	KCM-B-23	
90051	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	KCM-B-13	KCM-B-23	
41405	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Piscirickettsiaceae	<i>Oligobrachia mashikoi</i>	<i>Oligo</i>
28833	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Piscirickettsiaceae	endosymbiont	endos
39123	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Piscirickettsiaceae	Unclassified	
43731	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Piscirickettsiaceae	Unclassified	
54922	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	sulfur oxidizing symbionts	Unclassified	
70343	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	sulfur oxidizing symbionts	Unclassified	
84281	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	sulfur oxidizing symbionts	Unclassified	
336	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Sva0864		
35184	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Sva0864		
62494	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
60794	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
4546	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
15636	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
37684	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
43164	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
75343	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
35243	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
66826	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
53556	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
65067	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
4219	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
41943	Bacteria	Proteobacteria	AlphaBetaGammaproteobacteria	Unclassified		
97584	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Bdellovibrionales	Unclassified	
65198	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacteraceae	Unclassified	
75444	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacteraceae	Unclassified	
70445	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacteraceae	Unclassified	
61957	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacteraceae	Unclassified	
61608	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacteraceae	Unclassified	
63584	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacteraceae	Unclassified	

8181	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacteraceae	Unclassified
72668	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacteraceae	Unclassified
71956	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacteraceae	Unclassified
58759	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacteraceae	Unclassified
76404	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacteraceae	Unclassified
59122	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacteraceae	Unclassified
63497	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterium	Unclassified
6091	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterium	sulfate-reducing bacterium mXyS1
60111	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterium	Unclassified
23702	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterium	Unclassified
75008	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobulbaceae	Unclassified
56637	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales	Unclassified
20334	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales	Unclassified
035	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales	Unclassified
91519	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales	Unclassified
27728	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacteraceae	Unclassified
43076	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Unclassified	
21697	Bacteria	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Unclassified
77033	Bacteria	WCHB1-27	Unclassified		
28106	Bacteria	WS3	LCP-67	Unclassified	
81393	Bacteria	WS3	Sediment-1	PRR-12	
78719	Bacteria	WS3	Sediment-1	Unclassified	

por Maximum Likelihood; **- Filiação taxonômica segundo a sistemática de Hugenholtz

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)