

HENRIQUE FRAGOSO DOS SANTOS

IDENTIFICAÇÃO DE BIOINDICADORES DA PRESENÇA DE PETRÓLEO
E O IMPACTO DESTE CONTAMINANTE NA COMUNIDADE
BACTERIANA E DE MICROEUCARIOTOS EM MANGUEZAL



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientadores: Raquel Silva Peixoto e Alexandre Soares Rosado

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

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Henrique Fragoso

Identificação de bioindicadores da presença de petróleo e o impacto deste contaminante na comunidade bacteriana e de microeucariotos em manguezal-Henrique Fragoso dos Santos

Rio de Janeiro, 2010

xv, 94

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2010.

Orientadores: Raquel Silva Peixoto e Alexandre Soares Rosado

Referências bibliográficas: 188

1.Manguezal 2.Petróleo 3.Biomonitoramento 4.Diversidade de microeucariotos 5.Diversidade bacteriana 6.Pirossequenciamento I.Peixoto, Raquel Silva e Rosado, Alexandre Soares. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Mestrado em Ciências Biológicas. III. Identificação de bioindicadores de petróleo e o impacto deste contaminante na comunidade bacteriana e de microeucariotos em manguezal.

Henrique Fragoso dos Santos

IDENTIFICAÇÃO DE BIOINDICADORES DA PRESENÇA DE PETRÓLEO E O
IMPACTO DESTE CONTAMINANTE NA COMUNIDADE BACTERIANA E DE
MICROEUCARIOTOS EM MANGUEZAL

Rio de Janeiro, 25 de fevereiro de 2010.

(Alexandre Soares Rosado, Prof. Dr. IMPPG, UFRJ)

(Raquel Silva Peixoto, Prof^a. Dr^a. IMPPG, UFRJ)

(Ulysses Garcia Casado Lins, Prof. Dr. IMPPG, UFRJ)

(André Luis Souza dos Santos, Prof. Dr. IMPPG, UFRJ)

(Inácio Domingos da Silva Neto, Prof. Dr. Biologia, UFRJ)

(Juliano de Carvalho Cury, PhD. FIOCRUZ)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Prof^a Raquel Silva Peixoto e do Prof. Alexandre Soares Rosado

“A felicidade só é verdadeira quando é compartilhada”

Christopher J. McCandless ou Alexander Supertramp

AGRADECIMENTOS

A Deus por dar força e fazer acreditar na superação dos momentos difíceis.

Ao Alexandre Rosado, meu orientador, por possibilitar a realização deste trabalho, pelo exemplo profissional e de vida, por demonstrar que fazer ciência além de gratificante pode e deve ser muito divertido, pela confiança, paciência e amizade.

A minha orientadora Raquel Peixoto, pela imensa dedicação a este trabalho e a minha formação profissional, pela confiança e amizade, pela valorização de cada etapa concluída desta dissertação, pelo exemplo de força e dedicação à ciência. É um imenso prazer e honra ser seu primeiro aluno de pós-graduação. Muito Obrigado!

A minha namorada, Flávia Lima, muito obrigado pela imensa ajuda no desenvolvimento deste trabalho, onde muitas vezes, priorizou apoiar a realização dos experimentos desta dissertação ao desenvolvimento de sua tese de doutorado. Agradeço principalmente, aos infinitos momentos prazerosos proporcionados e por compartilhar o mesmo desejo de felicidade, amor e união.

A Edir Martins, pela sua grande habilidade em solucionar qualquer problema, a imensa ajuda nas coletas e no desenvolvimento deste trabalho, pelo exemplo de caráter e profissionalismo e principalmente pela amizade e pelas pescarias.

A Adriana Lopes e James Tiedje da Universidade de Michigan, por tornar possível a realização da técnica de pirosequenciamento. Agradeço ainda a Adriana, pelos inúmeros auxílios no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade.

Ao Juliano Cury, pela imensa colaboração no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade e por possibilitar a realização dos sequenciamentos e na análise de dados para montagem das bibliotecas de clones.

A Joana Oliveira e Alberto Dávilla da FIOCRUZ, por possibilitarem a realização das bibliotecas de clone. Agradeço ainda a Joana pela grande ajuda na experimentação.

A André Santos pela grande colaboração na revisão desta dissertação.

A toda galera do LEMM ainda não citada. Hugo, Caio, Erick e Ricardo pela ajuda nas coletas e nos experimentos; Lia e Débora, minha gratidão pelas inúmeras colaborações na elaboração dos resultados e no desenvolvimento deste trabalho; Simone, pela imensa ajuda dentro e fora do laboratório; Carlos B. S. & Fabiano P. B., pela experiência de vida e pelos muitos conselhos, os quais quase nunca devem ser seguidos; e a Fernanda, Luiza, Karen, Kátia, Flávio, Jorge, Suely e Pedro obrigado pela força. Agradeço a todos pela amizade e por tornar o laboratório um ambiente agradável.

A PETROBRAS pela bolsa concedida e por ceder o óleo utilizado neste trabalho.

Aos meus pais, Osvaldo e Fátima, muito obrigado por tornar todo este momento possível. Agradeço ao imenso amor e dedicação para minha formação pessoal e profissional. Vejo vocês como exemplo de vida e união.

Aos meus irmãos Anderson e Lucas, pelo companheirismo e amizade. Meus sinceros agradecimentos por em inúmeras oportunidades abrirem mão de diversas coisas para me apoiarem na realização deste trabalho.

Aos meus avós, Oswaldo, Marina, Fragoso e Luiza. Agradeço pelo amor e pelo carinho.

A minha tia Ângela Márcia, por toda a colaboração na correção desta tese e pelo imenso carinho.

A todos meus amigos e familiares. Principalmente aos moradores do ap. da Tijuca, Rafael, Caio P. O., Marcello e Anderson. Para esses eu não preciso escrever muita coisa.

Aos meus pais, pelo amor e carinho, pelo incentivo no desenvolvimento deste trabalho e por terem dado o melhor de si para minha formação pessoal e profissional. Minha eterna gratidão.

RESUMO

Henrique Fragoso dos Santos

IDENTIFICAÇÃO DE BIOINDICADORES DA PRESENÇA DE PETRÓLEO E O IMPACTO DESTES CONTAMINANTES NA COMUNIDADE BACTERIANA E DE MICROEUCARIOTOS EM MANGUEZAL

Orientadores: Raquel Silva Peixoto e Alexandre Soares Rosado

Os manguezais são ecossistemas costeiros que possuem diversas funções naturais de grande importância ecológica e econômica e que vêm sofrendo com a ação predatória humana, como derramamento de petróleo e seus derivados. Por estes motivos o presente trabalho buscou avaliar o impacto provocado por este contaminante na comunidade bacteriana e de microeucariotos, possibilitando assim, gerar conhecimentos que auxiliem na biorremediação e na identificação de possíveis alvos para o biomonitoramento da presença de petróleo neste ecossistema. Para tal, foram construídos microcosmos com sedimento de manguezal da Restinga de Marambaia, RJ, Brasil, os quais foram contaminados com diferentes concentrações de óleo. O impacto na comunidade bacteriana foi estudado pela técnica de pirosequenciamento que revelou um aumento no número de espécies e na diversidade da comunidade bacteriana, após a contaminação, com o surgimento de espécies não visualizadas inicialmente. O filo Proteobactéria e as classes Gammaproteobacteria e Deltaproteobacteria demonstraram predominância antes e após a contaminação, e os gêneros que apresentaram o maior aumento em sua abundância após a contaminação com petróleo foram *Marinobacterium* e *Marinobacter*. Foi detectado, ainda, um grande número de grupos taxonômicos de bactérias redutoras de sulfato antes e após a contaminação com petróleo, o que demonstra a grande importância da utilização deste aceptor de elétrons na técnica de biorremediação. Ao contrário do observado na comunidade bacteriana, os microeucariotos apresentaram diminuição de sua diversidade e riqueza de espécies após a contaminação, e o grupo taxonômico que revelou maior sensibilidade ao petróleo foi o Nematoda (nematódeos). Após a contaminação foi possível detectar um grande aumento na abundância do grupo Bacillariophyta (diatomáceas), predominantemente *Bacillariophyta* sp. e *Cafeteria minima*, o que leva a crer que esses dois gêneros podem ser possíveis alvos para biomonitorar a presença de petróleo em manguezais. Estudos mais aprofundados sobre os micro-organismos que demonstraram características favoráveis para biomonitoramento da presença de petróleo possibilitarão o desenvolvimento de técnicas que permitirão identificar a presença de hidrocarbonetos em ambientes impactados.

Palavras-chave: 1.Manguezal 2.Petróleo 3.Biomonitoramento 4.Diversidade de microeucariotos 5.Diversidade bacteriana 6.Pirosequenciamento.

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2010

ABSTRACT

Henrique Fragoso dos Santos

PETROLEUM PRESENCE BIOINDICATORS IDENTIFICATION AND IMPACT OF THIS CONTAMINANT IN BACTERIAL AND MICRO-EUKARYOTES COMMUNITY IN MANGROVE

Advisors: Raquel Silva Peixoto e Alexandre Soares Rosado

Mangroves are coastal ecosystems whose many natural functions have great ecological and economic relevance but have been suffering with human predation, such as oil spills and derivatives. The present study evaluated the impact caused by this contaminant on the bacterial community and micro-eukaryotes in order to generate knowledge that can help in bioremediation and identification of possible targets for biomonitoring the presence of oil in this ecosystem. To this end, microcosms were constructed with Restinga da Marambaia (RJ, Brazil) mangrove sediment contaminated with different percentages of oil. The impact on the bacterial community after contamination was studied with the use of the pyrosequencing technique, which revealed an increase in the number of species, diversity of bacterial community and the emergence of species not visualized before contamination. The phylum Proteobacteria and the classes Gammaproteobacteria and Deltaproteobacteria were predominant before and after contamination, and genera that showed the greatest increase in abundance after contamination with oil were *Marinobacterium* and *Marinobacter*. A large number of taxonomic groups of sulfate-reducing bacteria before and after contamination with oil were also detected which demonstrates the great importance of the use of this electron acceptor in the bioremediation technique. Unlike the bacterial community, the micro-eukaryotes presented lower diversity and species richness after contamination, and the phylogenetic group that showed greater sensitivity to petroleum was Nematoda (nematodes). After contamination it was possible to detect a large increase in the abundance of the group Bacillariophyta (diatoms) which was almost entirely dominated by *Bacillariophyta* sp. and *Cafeteria minima* which suggests that these two genera may be possible targets for biomonitoring the presence of oil in mangrove. Further study of micro-organisms that demonstrated favorable characteristics for biomonitoring of oil will enable the development of techniques that will identify the presence of hydrocarbons in impacted environments.

Keywords: 1.Mangrovel 2.Petroleum 3.Biomonitoring 4.Micro-eukaryots diversity 5.Bacterial diversity 6. Pyrosequencing.

Rio de Janeiro
February 2010

ÍNDICE:

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 MANGUEZAL	1
1.2 IMPACTOS DO PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS.....	3
1.3 TIPOS DE BIORREMEDIAÇÃO	5
1.4 PRINCIPAIS FATORES QUE AFETAM A DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO EM MANGUEZAL.....	6
1.4.1 Biodisponibilidade dos contaminantes	6
1.4.2 Salinidade	7
1.4.3 Oxigênio	8
1.4.4 Nutrientes.....	9
1.5 BIOMONITORAMENTO	10
1.5.1 Bioindicadores da presença de Metais Pesados	11
1.5.2 Bioindicadores da presença de Pesticidas	12
1.5.3 Bioindicadores na Agricultura	13
1.5.4 Bioindicadores da presença de Petróleo	13
1.5.5 Bioindicadores em manguezais.....	14
1.6 USO DE TÉCNICAS MOLECULARES EM MICROEUCARIOTOS	16
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVO GERAL.....	19
4. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	19
5. MATERIAIS E MÉTODOS	21
5.1 LOCAL DE COLETA	21
5.2 MICROCOSMOS	21
5.3 CONTAMINAÇÃO.....	22
5.4 TEMPOS DE COLETA	22
5.5 EXTRAÇÃO DE DNA	23
5.6 PCR-DGGE DO FRAGMENTO DE GENE QUE CODIFICA O 18S RRNA	23
5.7 CLONAGEM DOS AMPLICONS DE 18 S RRNA	24
5.8 EXTRAÇÃO DOS PLASMÍDEOS POR LISE ALCALINA (MINI-PREP)	25
5.9 SEQUENCIAMENTO	26

5.10 PIROSSEQUENCIAMENTO.....	27
5.11 ANÁLISES DOS DADOS.....	28
6. RESULTADOS:	29
6.1 DIVERSIDADE BACTERIANA DO SEDIMENTO DE MANGUEZAL DA RESTINGA DA MARAMBAIA REVELADA PELA TÉCNICA DE PIROSSEQUENCIAMENTO.....	28
6.2 O IMPACTO OCACIONADO PELO PETRÓLEO NA DIVERSIDADE BACTERIANA DA RESTINGA DA MARAMBAIA, REVELADO PELA TÉCNICA DE PIROSSEQUENCIAMENTO.	35
6.3 DIVERSIDADE DE MICROEUCARIOTOS NO MANGUEZAL DA RESTINGA DA MARAMBAIA.....	47
6.4 AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA CONTAMINAÇÃO POR PETRÓLEO EM MICROEUCARIOTOS.....	52
6.4.1 DGGE.....	52
6.4.2 Biblioteca de clones	57
6.4.3 Análise filogenética das bandas de DGGE.	66
5. DISCUSSÃO	71
7. CONCLUSÕES FINAIS	82
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS:

16S rDNA – gene que codifica o 16S rRNA

18S rDNA – gene que codifica o 18S r RNA

ACE - Estimador de riqueza baseado na Abundância

As – Arsênio

C – Carbono

Cd – Cádmio

Chao 1 - Estimador de riqueza baseado na Abundância

CO₂ - Dióxido de carbono

Cr – Cromo

Cu – Cobre

dNTP - Desoxirribonucleotídeo trifosfatado

DGGE – Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

Ek7F – Primer específico para gene que codifica a subunidade 18S rDNA

EK516R – Primer específico para gene que codifica a subunidade 18S rDNA

EPA - Agência de Proteção Ambiental Americana

ESC - Índice de cobertura

Fe – Ferro

FeS₂ - Pirita

H₂S – Gás sulfídrico

Hg – Mercúrio

HPA - Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

IRIS - Sistema Integrado de Informação de Risco

Mn - Manganês

N – Nitrogênio

N₂ - Gás nitrogênio

NaCl - Cloreto de sódio

NCBI - National Center for Biotechnology Information

Ni – Níquel

NO₃⁻ - Nitrato

NS - Número de sequências de cada amostra.

P – Fósforo

Pb – Chumbo

rDNA – DNA Ribossomal

RNA – Ácido ribonucléico

rRNA – RNA ribossomal

rrs - gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal

Se – Selênio

SO₄⁻² – Sulfato

T0 – Amostra coletada do microcosmo no tempo zero, sem contaminação com petróleo

T15 - Amostra coletada do microcosmo no 15º dia, sem contaminação com petróleo

T15 2% - Amostra coletada do microcosmo no 15º dia, com 2% de contaminação com petróleo

T15 5% - Amostra coletada do microcosmo no 15º dia, com 5% de contaminação com petróleo

T23 - Amostra coletada do microcosmo no 23º dia, sem contaminação com petróleo

T23 2% - Amostra coletada do microcosmo no 23º dia, com 2% de contaminação com petróleo

T23 5% - Amostra coletada do microcosmo no 23º dia, com 5% de contaminação com petróleo

T66 - Amostra coletada do microcosmo no 66º dia, sem contaminação com petróleo

T66 2% - Amostra coletada do microcosmo no 66º dia, com 2% de contaminação com petróleo

T66 5% - Amostra coletada do microcosmo no 66º dia, com 5% de contaminação com petróleo

T7 – Amostra coletada do microcosmo no 7º dia, sem contaminação com petróleo

T7 2% – Amostra coletada do microcosmo no 7º dia, com 2% de contaminação com petróleo

T7 5% – Amostra coletada do microcosmo no 7º dia, com 5% de contaminação com petróleo

UTO – Unidade Taxonômica Operacional

UV – Ultravioleta

Zn – Zinco

1. INTRODUÇÃO

1.1 Manguezal

Os manguezais são ecossistemas costeiros de transição entre os ambientes terrestres e marinhos, característicos de regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, existe cerca de 25.000 quilômetros quadrados de florestas de mangue, desde a foz do rio Oiapoque, no Estado do Amapá, até o município de Laguna em Santa Catarina, o que representa mais de 12% dos manguezais do mundo (LAMPARELLI *et al.*, 1998; BOSIRE *et al.*, 2008)

Este ecossistema desempenha diversas funções naturais de grande importância ecológica e econômica, tais como: proteção da linha da costa contra a ação erosiva das ondas e marés; retenção dos sedimentos carregados pelos rios, devido ao baixo hidrodinamismo dessas áreas, o que também possibilita a ocupação e a propagação da vegetação; ação depuradora, onde o ecossistema funciona como um filtro biológico em que bactérias aeróbicas e anaeróbicas reciclam a matéria orgânica e o sedimento pode promover a fixação e a inertização de partículas contaminantes; renovação da biomassa costeira, por possuir águas calmas, rasas e ricas em alimentos, funcionando ainda como área de alimentação, abrigo, nidificação e repouso de aves (FIELD, 1995; PEREIRA & ALVES, 1999).

Os manguezais possuem ainda uma fauna e flora bastante específica (KRAUSS *et al.*, 2008). A primeira é bem diversificada e com representantes dos seguintes grupos: anelídeos, moluscos, crustáceos, aracnídeos, insetos, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (PEREIRA & ALVES, 1999; KRAUSS *et al.*, 2008). Já as principais espécies de plantas, popularmente conhecidas como mangues, encontradas no litoral brasileiro são essencialmente quatro: *Rhizophora mangle* (mangue vermelho), *Laguncularia racemosa* (mangue branco), *Avicennia shaueriana* (mangue preto, canoé) e *Conocarpus erectus* (mangue de botão). Estas espécies apresentam estruturas de adaptação ao ambiente, tais como raízes escora, que são responsáveis pela sustentação das raízes das árvores no sedimento e glândulas excretoras de sais que conferem tolerância às elevadas concentrações de sais (ROSSI & MATTOS, 1992).

Esse ecossistema alberga uma grande riqueza e diversidade de micro-organismos, os quais são responsáveis por importantes papéis na produtividade,

conservação e reabilitação deste ecossistema. Os micro-organismos estão diretamente envolvidos na transformação de nutrientes, fotossíntese, fixação de nitrogênio, metanogênese, solubilização de fosfato, redução de sulfato e produção de antibióticos e enzimas (HOLGUIN & BASHAN, 2001; DAS, LYLA & KHAN, 2006).

Embora as florestas de mangue sejam ricas em matéria orgânica, em geral, há uma deficiência de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo (VAZQUEZ *et al.*, 2000; HOLGUIN, VAZQUEZ & BASHAN, 2001). Apesar disto, os manguezais são altamente produtivos. Este paradoxo pode ser explicado por um sistema de reciclagem de nutriente muito eficiente, em que a escassez de nutrientes essenciais é mantida e novos nutrientes são regenerados pela decomposição da vegetação morta (HOLGUIN, VAZQUEZ & BASHAN, 2001). As bactérias são responsáveis pela maior parte do fluxo de carbono no sedimento de manguezal, o qual atua como um sumidouro de carbono (HOLGUIN & BASHAN, 2001). Toda a matéria orgânica dos manguezais que não é exportada pela ação das marés, entra no sedimento e é degradada ou quimicamente modificada pelos micro-organismos (KRISTENSEN & ALONGI, 2008).

A degradação aeróbia de materiais lábeis perto da superfície de sedimentos de manguezal é geralmente tão rápida que o O₂ raramente penetra mais de 2 mm no sedimento (KRISTENSEN *et al.*, 2008). O sedimento permanece em grande parte anóxico, exceto por uma rede de raízes estreitas e tocas de caranguejos que permitem a entrada do oxigênio (KRISTENSEN *et al.*, 2006). Em condições anóxicas, grandes moléculas orgânicas são primeiramente divididas em frações menores por fermentação microbiana. Essas pequenas moléculas são então oxidadas completamente a CO₂ por uma grande variedade de micro-organismos anaeróbios (KRISTENSEN *et al.*, 2008). A respiração aeróbica e redução anaeróbica de sulfato são normalmente considerados os processos mais importantes de respiração em sedimentos de mangue (KRISTENSEN & ALONGI, 2006; KRISTENSEN *et al.*, 2008). Além das funções naturais, os manguezais representam ainda grandes bancos genéticos para a pesquisa e desenvolvimento de produtos biotecnológicos de grande interesse econômico, como, por exemplo, para o uso na recuperação e monitoramento de áreas contaminadas com óleo (DUKE *et al.*, 2007).

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 (LI *et al.*, 2007).

1.2 Impactos do petróleo e seus derivados

O petróleo corresponde a uma mistura de diversos compostos como hidrocarbonetos alicíclicos, alifáticos e aromáticos; compostos sulfurosos (ex: sulfetos, polissulfetos, benzotiofenos); compostos nitrogenados (ex: piridinas, quinolinas, indóis); compostos oxigenados (ex: ácidos carboxílicos, fenóis, ésteres); resinas e asfaltenos (ATLAS & BARTA, 1993; HUANG *et al.*, 2004).

Os hidrocarbonetos são quantitativamente os mais importantes constituintes do petróleo. Os hidrocarbonetos alicíclicos (cicloalcanos) têm alguns ou todos os átomos arranjados em uma estrutura em anel e podem ser saturados ou insaturados. Os hidrocarbonetos alifáticos são compostos de cadeia aberta sendo subdivididos em alifáticos saturados (hidrocarbonetos mais estáveis) e alifáticos insaturados (hidrocarbonetos menos estáveis). Os hidrocarbonetos aromáticos (arenos) contêm ao menos um anel de seis carbonos com três duplas ligações alternadas na sua estrutura molecular e são chamados de hidrocarbonetos monocíclicos, enquanto os que possuem mais de um desse tipo de anel são chamados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (BOEHM & PAGE, 2007). Dentre estes, os que acarretam um grande dano ao meio ambiente são os HPAs como naftaleno, antraceno, e fenantreno (HOLLIGER & ZEHNDER, 1996).

Os HPAs são componentes naturais do petróleo bruto, mas também são liberados como resultado da combustão de combustíveis à base de petróleo (BOEHM & PAGE, 2007). Estes compostos têm baixas pressões, portanto são rapidamente absorvidos pelas partículas em suspensão e pelos organismos vivos (NIELSEN *et al.*, 1997). O Sistema Integrado de Informação de Risco (IRIS) da Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA), contém mais de 540 avaliações individuais de produtos químicos com potenciais efeitos sobre a saúde humana (U.S. EPA, 2002). A EPA identificou 16 HPAs como poluentes prioritários, sendo alguns

destes considerados carcinogênicos a humanos. Sua toxicidade e presença generalizada no ambiente os incluem no topo da lista dos poluentes mais agressivos (TORRES *et al.*, 2008).

Existem evidências suficientes de que a poluição por hidrocarbonetos provoca sérios efeitos adversos sobre o ecossistema aquático, tanto em organismos produtores como nos consumidores primários, secundários, terciários até os níveis mais elevados. SMITH (1971) relatou a mortalidade e eliminação de estrelas do mar (*Pisaster* spp.) e ouriços do mar (*Strongylocentrotus* spp.) como resultado da poluição por óleo diesel com apenas 0,1% de emulsão. A presença de fenol no petróleo afeta o sistema nervoso central e endócrino dos peixes e provoca secreção e erosão na membrana da mucosa. RUSSEL & KOTIN (1956) relataram carcinomas e papilomas em peixes capturados perto de uma refinaria de petróleo. Entre os mamíferos marinhos, as focas sofrem com severa irritação ocular que pode levar a cegueira (SMITH *et al.*, 1971; ISLAN *et al.*, 2004). O principal efeito do óleo sobre as aves marinhas é a penetração em sua plumagem, o que elimina o isolamento térmico e reduz a flutuabilidade das aves, incapacitando-as de nadar e voar (ISLAN *et al.*, 2004).

Como o aporte anual de hidrocarbonetos do petróleo para os oceanos é de aproximadamente $2,35 \times 10^6$ toneladas (GESAMP, 1993) e considerando-se que a maior parte desta contaminação se dá no ambiente costeiro, pode-se avaliar o sério problema ambiental que isto pode representar para os manguezais. Derramamentos de óleo e seus derivados em florestas de mangue podem provocar tanto efeitos agudos, que se manifestam em curto prazo quanto crônicos, que irão provocar impactos detectáveis em períodos de tempo mais longos. Muitos manguezais que sofrem derramamento de óleo por um curto período de tempo conseguem resistir e se recuperar. Porém, quando os derrames ocorrem a médio e longo prazo, ou seja, quando a contaminação ocorre continuamente, este tipo de ecossistema pode ser substituído por sistemas menos complexos (SEMADS, 2001).

Para tentar minimizar esses problemas, é de extrema importância o conhecimento da diversidade microbiológica dos manguezais, pois os microorganismos possuem uma grande versatilidade metabólica que pode ser otimizada e/ou aplicada para a transformação dos contaminantes em produtos finais menos tóxicos, os quais são integrados nos ciclos biogeoquímicos naturais

(biorremediação) (ALEXANDER, 1994) e ainda podem ser utilizados como ferramentas para o biomonitoramento de impactos nesses ambientes.

1.3 Tipos de biorremediação

A técnica de biorremediação pode ser conduzida por três vias: (i) através do aumento da população microbiana (bioaugmentação), com a adição direta de micro-organismos à região contaminada; (ii) através da aceleração da reprodução microbiana e de suas atividades metabólicas (bioestimulação) ou (iii) através da utilização de plantas para auxiliar no processo de degradação de hidrocarbonetos (fitorremediação). Mais de uma dessas técnicas podem ser ainda aplicadas concomitantemente.

A bioaugmentação é a estratégia na qual os micro-organismos potencialmente degradadores de hidrocarbonetos de petróleo, previamente selecionados, são introduzidos no ambiente (ATLAS, 1981), podendo ser utilizados micro-organismos indígenas, assim como provenientes de outros sítios, ou ainda estirpes modificadas geneticamente, de acordo com as leis vigentes de cada país. A utilização de micro-organismos da biota natural seria, a princípio, mais indicada em relação aos provenientes de outros sítios ou aos micro-organismos modificados geneticamente, pois não necessitaria de um monitoramento mais incisivo (KORDA *et al.*, 1997). A bioaugmentação é freqüentemente utilizada para aumentar a taxa de biodegradação de compostos orgânicos (VOGEL, 1996), no entanto, estudos mostram que, em alguns casos o bioaumento não melhorou ou até mesmo diminuiu os processos de degradação (LAUNEN *et al.*, 2002; SAPONARO *et al.*, 2002).

Outro processo, a bioestimulação é uma estratégia de biorremediação que visa estimular a capacidade de micro-organismos nativos do local contaminado em biodegradar poluentes. Essa estimulação pode ocorrer através da correção de pH, balanceamento de nutrientes em relação à carga de carbono do poluente orgânico, aeração do solo, adição de aceptores de elétrons e correção da umidade (BURNS, CODI & DUKE, 2000; RAMSAY *et al.*, 2000; MENDELSSOHN & LIN, 2003).

A fitorremediação por sua vez, é um processo biotecnológico que utiliza os processos naturais dos vegetais para aumentar a degradação e a remoção de contaminantes em solos e/ou água subterrânea contaminada (SALT, SMITH & RASKIN, 1998).

1.4 Principais fatores que afetam a degradação de petróleo em Manguezal

1.4.1 Biodisponibilidade dos contaminantes

A biodisponibilidade é a tendência dos componentes individuais do petróleo de serem degradados pelos micro-organismos. Em relação aos micro-organismos, a transferência dos hidrocarbonetos para dentro da célula microbiana e a limitação energética para a manutenção da degradação, são limitantes para a biodisponibilidade do contaminante (YANG, 2009). A baixa biodisponibilidade de HPA, devido à sua natureza altamente hidrofóbica e forte tendência de adsorção aos sedimentos, é um dos principais problemas que afetam a biodegradação desses compostos em manguezais (KE *et al.*, 2009). A aplicação de agentes de mobilização é uma forma eficaz de aumentar a dessorção e solubilização de contaminantes orgânicos hidrofóbicos nos sedimentos, e como resultado acelerar o processo de biodegradação (JAHAN, AHMED & MAIER 1997; KE *et al.*, 2009). Reagentes selecionados para esta finalidade incluem surfactantes químicos (THIBAUT, ANDERSON & RANKENBERGER, 1996), solventes orgânicos e matéria orgânica dissolvida (REBHUN, SMEDT & RWETABULA, 1996; CONTE, 2001; 2005).

No processo de biorremediação, uma alternativa que aumenta consideravelmente a biodisponibilidade do óleo, e assim, melhora a taxa de biodegradação, é a utilização de solventes orgânicos ou biosurfactantes (ALEXANDER, 1994; LAHA, EDWARDS & LUTHY 1995; BORDOLOI & KONWAR, 2009). BORDOLOI & KONWAR (2009) testaram a ação de biosurfactantes produzidos por diferentes estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de solos contaminados em diferentes campos de petróleo e observaram que o consumo de petróleo bruto e seus componentes aumentaram significativamente em todas as culturas de bactérias testadas. O biosurfactante produzido por *Candida glabrata* isolada de sedimento de manguezal demonstrou uma atividade emulsificante de 75% em óleo de semente de algodão e a capacidade de emulsificação permaneceu praticamente inalterada dentro de uma gama de pH (2-12), temperatura (4-80°C) e em faixas de concentrações de NaCl de até 10% (SARUBBO & DE CAMPOS-TAKAKI, 2006).

1.4.2 Salinidade

A variação da salinidade é um fator predominante nos manguezais, sendo dependente da variação das marés. Na maré cheia, as águas salgadas invadem a área e o solo fica predominantemente salino, já nas marés vazantes, as águas doces inundam as margens dos rios cobertas pelo mangue e "invadem" o estuário, predominando, então a baixa salinidade no substrato. A salinidade varia sazonalmente e depende da altura e amplitude das marés, chuvas e variações no volume de água trazida pelos rios (OLGUÍN, HERNANDEZ & SÁNCHEZ-GALVÁN, 2007).

CHEN e colaboradores (2008) investigaram os efeitos de vários fatores sobre a biodegradação do fenantreno por *Sphingomonas* sp., isolada de sedimentos de manguezal. Os fatores mais significativos observados por esses autores foram salinidade e quantidade do inóculo, enquanto os efeitos das concentrações de fenantreno, da adição de nutrientes e das temperaturas eram insignificantes.

Alguns trabalhos mostram que a degradação de óleo por micro-organismos indígenas pode ser comparável, ou até mesmo superior ao observado em estudos utilizando bioaumento (DOTT *et al.*, 1989; LEAHY & COLWELL, 1990; SAPONARO *et al.*, 2002), provavelmente porque a condição do ambiente não era adequada para a inoculação das bactérias (LAUNEN *et al.*, 2002). Ou seja, as estirpes inoculadas podem, por exemplo, não ter se estabelecido no ambiente, ou ao menos não de forma competitiva, ou ainda ter se estabelecido, mas sem, no entanto, utilizar vias de degradação de hidrocarbonetos, devido a disponibilidade de outras fontes de carbono ou por outros mecanismos de inibição das vias de degradação, como por exemplo a alta salinidade. Assim, esses autores sugerem que os fatores ambientais, como no caso a salinidade, poderiam ser mais importantes do que a adição de micro-organismos degradadores.

O efeito da salinidade sobre a biodegradação de HPA em sedimentos estuarinos foi examinado no que diz respeito aos seus efeitos sobre os números de células e distribuição dos micro-organismos (TREVORS, KUIKMAN & VAN ELSAS, 1994). No entanto, SHIARIS (1989) demonstrou uma correlação positiva entre salinidade e a taxa de mineralização de fenantreno e naftaleno em sedimentos estuarinos. Segundo WARD & BROCK (1978), a taxa de metabolização de hidrocarbonetos foi menor quando a salinidade aumentou (3,3 para 28,4 ppt),

demonstrando que a salinidade elevada reduz as taxas metabólicas. Essas variações podem ser verificadas em diferentes tipos de sedimento. Em um campo de petróleo hipersalino na Tunísia, foi isolado uma estirpe halotolerante, *Halomonas* sp. C2SS100, capaz de degradar hidrocarbonetos em altas concentrações de NaCl, de forma eficiente (MNIF; CHAMKHA & SAYADI, 2009). No estudo de CHEN e colaboradores (2008a), o ótimo de salinidade para a biodegradação de fenantreno foi de cerca de 10-15 ppt, semelhante ao relatado por TAM e colaboradores (2002).

1.4.3 Oxigênio

O oxigênio é geralmente utilizado como aceptor final de elétrons no metabolismo microbiano, e a sua limitação é uma das principais razões para redução da biodegradação do petróleo no manguezal. A importância do oxigênio vem da participação das oxigenases e do oxigênio molecular nas principais vias da degradação de hidrocarbonetos. Processos aeróbicos de produção possuem rendimento energético consideravelmente maior por unidade de substrato e tendem a ocorrer muito mais rapidamente (KUZNETSOV & ULSTRUO, 1988). Conforme descrito em ATLAS (1981) a massa de oxigênio necessária para remediar a carga de hidrocarbonetos é de cerca de 0,3 g para cada grama de óleo a ser oxidado.

Tanto na respiração aeróbia quanto na anaeróbia, os organismos obtêm energia por transferência de elétrons, de um doador de elétrons para um aceptor de elétrons (KUZNETSOV & ULSTRUO, 1988). Ao contrário de bactérias aeróbias que utilizam um aceptor de elétron único (O_2), as bactérias anaeróbias dependem de diferentes aceptores de elétrons para sobreviver. Os aceptores de elétrons mais comuns no ambiente natural são: nitratos, manganês [Mn (IV)], ferro [Fe (III)] e sulfato (LEVETT, 1990). A quantificação das concentrações destes aceptores de elétrons é muito importante na avaliação da atividade de bactérias anaeróbias na biodegradação anaeróbia de HPA (LI *et al.*, 2009).

Nos manguezais, em função do alagamento diário pelas marés, a taxa de difusão do oxigênio no sedimento é reduzida, não suprimindo a demanda microbiana para oxidação da matéria orgânica (BARCELONA *et al.*, 1989). A decomposição da matéria orgânica passa então a ocorrer através de micro-organismos anaeróbios receptores de elétrons alternativos ao O_2 , seguindo a seguinte seqüência termodinâmica: NO_3^- , Mn^{4+} , Fe^{3+} , SO_4^{-2} , CO_2 (metanogênese), N_2 e H^+ (SCHULZ,

2000). A combinação de elevados teores de matéria orgânica e enxofre em condições de anaerobiose, as fontes de Fe reativo (via aportes de sedimentos orgânicos) e as fontes de SO_4^{2-} prontamente disponíveis, fazem dos sedimentos de manguezais um ambiente propício à ocorrência de redução bacteriana do sulfato a sulfeto e a conseqüente precipitação de Fe na forma de pirita (FeS_2) (HARBISON *et al.*, 1986).

A estimulação de processos anaeróbicos *in situ* pode representar uma alternativa para remediação de áreas contaminadas por compostos orgânicos e inorgânicos, especialmente em maiores profundidades. Estes últimos podem ser transformados em produtos menos tóxicos ou em compostos imóveis, dificultando sua disseminação (COATES & ANDERSON, 2000).

LI e colaboradores (2009) demonstraram que na biodegradação anaeróbica de HPA em sedimento de manguezal, o aceptor de elétrons dominante foi o sulfato seguido por Fe (III). Já o Mn (IV) possui concentrações muito baixas e os nitratos quase não existem em profundidades superiores a 6 cm. Neste estudo, uma mistura de fluoreno, fenantreno, fluoranteno e pireno foi biodegradada pelos micro-organismos anaeróbios indígenas presentes no sedimento profundo (10-15 cm) de um manguezal em Hong Kong, China. Desse sedimento, foram isoladas seis cepas de bactérias anaeróbias degradadoras de HPAs: duas de *Sphingomonas*, uma de *Microbacterium*, uma de *Rhodococcus* e duas de espécies desconhecidas, com algum potencial intrínseco de degradar diferentes HPAs em baixa concentração de oxigênio (2% O_2) e condições anóxicas (0% O_2) (LI *et al.*, 2009).

1.4.4 Nutrientes

O estado nutricional do ecossistema influencia diretamente a atividade microbiana e a biodegradação. Uma grande limitação para a degradação natural de hidrocarbonetos na maioria dos ecossistemas é o desequilíbrio C:N:P, causado pelo alto teor de C dos poluentes. Embora constituam fontes de carbono para os micro-organismos, os contaminantes orgânicos podem não fornecer nutrientes, como o nitrogênio e o fósforo, nas proporções necessárias para a manutenção de suas funções metabólicas. Isso leva ao consumo rápido do nitrogênio e fósforo disponíveis para as populações microbianas hidrocarbonoclásticas presentes no

ecossistema, tornando mais lento ou mesmo cessando a degradação (TAKETANI *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2009).

Os nutrientes inorgânicos mais importantes na biorremediação são os nitratos e fosfatos, no entanto, os manguezais possuem uma deficiência desses nutrientes (VAZQUEZ, 2000; HOLGUIN, VAZQUEZ & BASHAN, 2001). Estudos realizados no manguezal do Rio New Calabar, Nigéria, demonstraram que a adição de nutrientes limitantes da biorremediação (nitrogênio, fósforo e potássio) na forma de fertilizante, resultou no aumento significativo da degradação dos hidrocarbonetos de petróleo. Para avaliar a presença do contaminante em um ecossistema são de extrema importância que sejam desenvolvidos estudos de biomonitoramento, permitindo a prevenção de impactos ecológicos e auxiliando na recuperação ambiental (ODOKUMA & DICKSON, 2003).

1.5 Biomonitoramento

Biomonitoramento pode ser definido como o uso sistemático das respostas de organismos vivos (bioindicadores) para avaliar as mudanças ocorridas no ambiente, geralmente causadas por ações antropogênicas (BUSS, BAPTISTA & NESSIMIAN, 2003).

Os bioindicadores são espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas cuja presença, abundância e condições são indicativos biológicos de uma determinada condição ambiental (HYNE & MAHER, 2000). Os organismos indicadores mais utilizados são aqueles capazes de diferenciar entre oscilações naturais e estresses antrópicos, podendo ser: espécies sentinelas, introduzidas para indicar determinada condição ambiental; espécies detectoras, pois ocorrem naturalmente e respondem ao stress de forma mensurável; espécies exploradoras, que reagem positivamente ao distúrbio ou agente estressor; espécies acumuladoras, pois acumulam agentes de estresse permitindo avaliar a bioacumulação; e ainda as espécies usadas na experimentação (HAKANSON & BLECKNER, 2008).

Segundo TORRES e colaboradores (2008), organismos indicadores têm sido amplamente utilizados, pois fornecem sinais rápidos sobre problemas ambientais mesmo antes de o homem perceber sua ocorrência e amplitude, permitindo a identificação das causas e efeitos entre os agentes de estresse e as respostas

biológicas e, ainda, possibilitando a avaliação da efetividade das ações tomadas para contornar os problemas causados por ações antropogênicas.

A primeira abordagem científica visando à determinação de indicadores biológicos da qualidade das águas, com bases científicas, foi realizada com bactérias, fungos e protozoários na Alemanha por KOLKWITZ & MARSSON (1909). Como praticamente qualquer grupo pode ser utilizado em programas de monitoramento, a partir desse experimento pioneiro foram desenvolvidas também metodologias de avaliação para macrófitas aquáticas (HASLAM, SINKER & WOLSELEY, 1982), peixes e macroinvertebrados (CAIRNS & VAN DER SCHALIE, 1982; REYNAUD & DESCHAUX, 2005).

A utilização da comunidade de peixes com essa finalidade tem sido extensamente utilizada (CAIRNS & VAN DER SCHALIE, 1982; REYNAUD & DESCHAUX, 2005). Espécies como *Leuciscus cephalus*, são utilizadas, por exemplo, para o biomonitoramento da presença de petróleo em bacias hidrográficas na Itália, onde os níveis de HPAs são avaliados nos tecidos dos peixes, permitindo detectar a presença deste contaminante nos rios (FRENZILLI *et al.*, 2008).

Diversos organismos de diferentes níveis tróficos também são utilizados com o objetivo de monitorar contaminantes distintos, como metais pesados, pesticidas e hidrocarbonetos (TORRES *et al.*, 2008).

1.5.1 Bioindicadores da presença de metais pesados

Destacam-se como principais fontes poluidoras de metais pesados: a indústria de metais não ferrosos, que emite Cd, Pb, Ni, As, Cu, Se e Zn (LIU *et al.*, 2003; BLAKE *et al.*, 2007; LEWTAS, 2007); a combustão do carvão, principal fonte de Hg, Cr e Se (ZHUANG *et al.*, 2004; KEEGAN *et al.*, 2006; GUIJIAN *et al.*, 2007) e a combustão do petróleo, fonte mais importante de Ni e vanádio (V) (U.S. EPA, 2002; DUNDAR, 2006; TORRES *et al.*, 2008). Por isso, é de extrema importância o biomonitoramento desses metais.

Alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos com esse intuito. Um organismo bastante estudado é o *Fontinalis antipyretica*, que é um musgo aquático utilizado para o biomonitoramento das contaminações por metais pesados em águas continentais (KELLY, GIRTON & WHITTON, 1987; MERSCH & REICHARD, 1998). Outros exemplos encontrados na literatura é a biovigilância da presença de

mercúrio, através da utilização de *Halimione portulacoides*, um pequeno arbusto verde-acinzentado que permite uma grande mobilidade do mercúrio dentro de sua rizosfera, amplamente distribuído em sistemas estuarinos da Eurásia temperada e partes da África (VÁLEGA *et al.*, 2007). A presença de Ag pode ser biomonitorada pela presença de *Lobophora variegata*, uma alga marrom comum em águas tropicais (METIAN & WARNAU, 2008).

Apesar da grande utilização de macro-organismos em programas de biovigilância, os micro-organismos também começam a ser cada vez mais utilizados como biodetectores no acompanhamento desses xenobiontes, como por exemplo, a utilização da *Scenedesmus* sp., microalga utilizada para monitorar Cu^{2+} e Zn^{2+} (TRIPATHI *et al.*, 2006) e *Chlorella vulgaris*, microalga clorofílica estudada para o monitoramento de Cu^{2+} (MALLICK, 2004).

1.5.2 Bioindicadores da presença de pesticidas

Além dos metais pesados, outro grupo importante de poluentes ambientais é o dos pesticidas. Os pesticidas mais seguros não devem afetar as espécies não-alvo e persistir no ambiente (WARREN *et al.*, 2003). Porém, na prática, a maioria dos pesticidas não obedece a esses critérios. Além disso, a utilização excessiva de muitos desses pesticidas aumenta a probabilidade de impactos negativos sobre organismos não-alvo, como as plantas terrestres, mamíferos, micro-organismos do solo e biota aquática (TREMOLADA *et al.*, 2004).

Para minimizar e monitorar esses impactos, alguns estudos utilizando bioindicadores vêm sendo realizados. CAI e colaboradores (2007) avaliaram a toxicidade dos diclofop-metil (DM) e seus dois principais metabólicos, em três espécies de microalgas de água doce, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus*. Os resultados revelaram uma relação positiva entre a presença do pesticida e o crescimento das três espécies de algas. O efeito do oxyfluorfen, outro pesticida, foi investigado na alga *Scenedesmus obliquus*, revelando alterações no seu teor de clorofila e nas atividades de enzimas fotossintéticas e antioxidantes, o que passou a possibilitar a utilização desses parâmetros no biomonitoramento de pesticidas. Permitindo assim, o emprego da alga *S. obliquus* como um indicador para a avaliação do risco ambiental de água poluída por oxyfluorfen (GEOFFROY *et al.*, 2003).

Outro estudo interessante foi conduzido para avaliar a utilização do mel de abelha como bioindicador da contaminação de solos por pesticidas. Este estudo demonstrou que em áreas agrícolas onde há apicultura, a ocorrência e a distribuição de resíduos de pesticidas nas plantações podem ser detectadas a partir da análise de amostras de mel coletadas aleatoriamente. O estudo demonstrou também que, muitas vezes, produtos químicos utilizados pelos apicultores no interior das colméias, a fim de controlar doenças, são os principais poluentes do mel produzido (BALAYIANNIS & BALAYIANNIS, 2008).

1.5.3 Bioindicadores na agricultura

Os bioindicadores não são utilizados apenas na monitoração de xenobióticos. A agricultura utiliza esta ferramenta para auxiliar estudos sobre a saúde do solo. Na Índia, as minhocas são utilizadas como indicadores de qualidade de terras cultiváveis por ingerirem o solo contaminado, o que permite identificar a presença do contaminante em seus tecidos (SUTHAR, SINGH & DHAWAN, 2008). Na indústria australiana, nematódeos são estudados para determinar as alterações nas propriedades do solo, permitindo que os produtores de banana melhorem as práticas de gestão do solo (PATTISON *et al.*, 2008).

1.5.4 Bioindicadores da presença de Petróleo

A poluição marinha por petróleo tem recebido cada vez mais atenção desde meados do século XIX, pois à imensa intensificação no uso deste produto, levou a um aumento nos acidentes com petroleiros (OWEN, 1999), a liberação de poluentes por refinarias costeiras (TOLOSA *et al.*, 2005; WAKE, 2005) e ao contínuo derrame de óleo por navios (CARPENTER & MACGILL, 2001).

Podemos citar como exemplos de acidentes em ambientes marinhos, o petroleiro Amoco Cadiz de propriedade da Amoco que após um acidente ocorrido em 16 de março de 1978 a 5 Km da costa da Bretanha, França, partiu-se em dois e gerou um dos maiores desastres ambientais da história. Outro exemplo foi o petroleiro Aegean Sea da Repsol, que sofreu um acidente na costa da Espanha, derramando mais de 70.000 toneladas de petróleo no oceano (GOMEZ & DAUVINA, 2000). Os efeitos dos derrames, em ambas as áreas, levaram ao desaparecimento dos anfípodos (pequenos crustáceos, predominantemente de ambientes marinhos),

especialmente os pertencentes ao gênero *Ampelisca*, gerando uma colonização muito baixa dessas espécies nos quatro anos subseqüentes ao derrame de óleo. Por outro lado poliquetas, por exemplo, mantiveram-se dominantes antes e após o derrame, levando GOMEZ & DAUVINA (2000) a propor a utilização desses anfípodos como bioindicadores do impacto da poluição por hidrocarbonetos naquela região.

Outros trabalhos vêm elucidando a importância do uso de indicadores biológicos da presença de petróleo. ARMYNOT, DEBENAY & SOULARD (2003) demonstraram que a densidade e riqueza de espécies de foraminíferos bentônicos em um sedimento contaminado por diferentes metais pesados e HPAs, de 5 portos da França, diminuíram com o aumento da concentração de metais pesados e HPAs e, portanto, podem ser utilizados como indicadores de poluição. Além disso, as zonas mais poluídas são dominadas pelas espécies pioneiras tolerantes, como a *Haynesina germanica*, que pode ser utilizada como bioindicador, principalmente nas áreas mais críticas.

Com o mesmo objetivo de monitoramento de áreas contaminadas por petróleo, outros organismos também são utilizados com sucesso em vários países, como peixes na Ásia e América (UENO *et al.*, 2005; CARRASCO-LETELIER *et al.*, 2006), algas na Polônia, França e China (AKSMANN & TUKAJ, 2004; LEI *et al.*, 2007) e mexilhões em manguezais no Sul do Brasil (TORRES *et al.*, 2002).

1.5.5 Bioindicadores em manguezais

Existem poucos trabalhos sugerindo o uso de bioindicadores de contaminação por hidrocarbonetos ou outro contaminante em manguezais. Um exemplo foi o estudo realizado por um grupo de pesquisadores do Rio de Janeiro, que verificou a eficiência do *Ucides cordatus*, um caranguejo, como indicador da contaminação por petróleo em sedimento de manguezal da Baía de Guanabara. O estudo demonstrou que os caranguejos coletados nas áreas de Suruí e Canal da Peteca possuíam elevadas concentrações de HPAs em seus tecidos, o que também foi constatado na análise dos sedimentos dessas regiões. Estes resultados sugerem o *U. cordatus* como um bom bioindicador da presença de petróleo nesses locais (NUDI *et al.*, 2007). Ainda no Brasil, mais especificamente em Pernambuco, ostras

da espécie *Crassostrea rhizophorae* são utilizadas para monitorar a presença de mercúrio em manguezais do Canal de Santa Cruz, localizado a 40 km de Recife (MEYER, HAGEN & MEDEIROS, 1998).

Na Espanha, caranguejos da espécie *Carcinus maenas* e mexilhões da espécie *Ruditapes philippinarum*, são utilizados como bioindicadores da presença de petróleo de uma forma bastante interessante. Eles são colocados em gaiolas, divididas em dois compartimentos diferentes, um para os caranguejos (n = 20) e um para os mexilhões (n = 40). As gaiolas são, então, colocadas no sedimento durante a maré baixa e após alguns dias, esses animais são levados ao laboratório para análises químicas e histopatológicas, com o objetivo de detectar os níveis de poluentes e avaliar assim as condições ambientais da área estudada (MORALES-CASELLES *et al.*, 2008).

Não apenas caranguejos e moluscos são utilizados como bioindicadores da presença de xenobiontes em manguezais. A planta da espécie *Avicennia marina* é um alvo para diagnosticar a presença de Cu, Pb e Zn nestes ecossistemas a partir da quantificação desses poluentes em seus tecidos (MACFARLANE & BURCHETT *et al.*, 2001).

Na China, um grupo de pesquisadores avalia a utilização de ciliados, para acompanhar um interessante sistema de tratamento de esgoto que utiliza plantas e sedimento de manguezal (CHEN *et al.*, 2008b; YANG *et al.*, 2008), porém não existem trabalhos sugerindo a utilização de algum bioindicador microbiano para detectar especificamente a contaminação de manguezais por hidrocarbonetos de petróleo.

A utilização de organismos para o biomonitoramento da presença de petróleo no ambiente é uma excelente ferramenta para auxiliar a prevenção e a remediação de desastres ecológicos. Entre os organismos utilizados como bioindicadores, podemos destacar a utilização dos microeucariotos como um grupo potencialmente eficiente para demonstrar a presença de contaminantes no ambiente, já que estes apresentam as principais características necessárias para compor um bom bioindicador, destacando-se, dentre elas, sua abundância, diversidade genética e o tempo reduzido de geração, o que possibilita uma resposta rápida às mudanças ambientais (GRIEBLER *et al.*, 2002). E para o estudo e monitoramento da diversidade desses micro-organismos e do impacto de um determinado xenobionte

sobre essas populações e/ou comunidades é essencial o uso de técnicas moleculares.

1.6 Uso de técnicas moleculares em microeucariotos

Os microeucariotos são, provavelmente, os eucariotos mais abundantes da Terra, encontrados em todos os lagos e oceanos em densidades que variam entre 10^2 - 10^4 células/ml (LI *et al.*, 1994; CARON *et al.*, 1999). Esses micro-organismos estão presentes na população microbiana do plâncton e são conhecidos como microplânctons, dos quais podemos destacar as diatomáceas, os dinoflagelados, coccolitoforídeos e um grande número de protozoários.

Os microeucariotos são de vital importância para os ecossistemas marinhos, pois representam a base da teia alimentar pelágica nos oceanos e mudanças em sua composição e estrutura podem ocasionar profundas modificações em todos os níveis tróficos. Eles apresentam um caráter muito dinâmico, com elevadas taxas de reprodução e perda, respondendo rapidamente às alterações físicas e químicas do meio aquático e estabelecendo complexas relações intra e interespecíficas na competição e utilização do espaço e dos recursos (VALIELA *et al.*, 1995; YONEDA *et al.*, 1999). Variações no regime meteorológico, características geomorfológicas regionais e os impactos antropogênicos nas áreas costeiras, estabelecem as características taxonômicas e a dinâmica espaço-temporal de suas comunidades (BRANDINI *et al.*, 1997; YONEDA *et al.*, 1999).

Porém, a caracterização desses organismos através de uma simples observação com microscopia óptica, e técnicas de cultivo, que não permitem o crescimento de todos os organismos, é muitas vezes ineficiente (REUSS & POULSEN, 2002; ANSOTEGUI *et al.*, 2002). Na última década, a utilização de técnicas moleculares na ecologia microbiana aumentou muito o conhecimento na identificação dos micro-organismos de diversos ambientes, mais particularmente, dos procariotos. Apesar da eficiência das técnicas de ecologia molecular, esses métodos não vinham sendo tão amplamente utilizados para eucariotos como eram para procariotos. Vários estudos recentes baseados na amplificação e sequenciamento do fragmento de gene que codifica a subunidade 18S do RNA ribossomal revelaram uma grande diversidade de microeucariotos em todos os ambientes amostrados (DÍEZ, PEDRÓS-ALIÓ & MASSANA, 2001; LÓPEZ-GARCÍA

et al., 2001; MOON-VAN DER STAAY, DE WACHTER & VAULOT, 2001). A verdadeira dimensão desta diversidade é desconhecida e, por isso, sua distribuição, seus padrões, sua dinâmica espacial e temporal, e seu papel ecológico também seguem bastante obscuros. As amostras dessa diversidade parecem ser apenas a ponta do iceberg, e descobertas futuras sobre a dimensão desta, é a finalidade das pesquisas básicas e aplicadas que têm como objetivo o estudo desses micro-organismos.

A análise molecular de microeucariotos vem descrevendo uma vasta gama de filotipos que pertencem a filos anteriormente descritos. Além disso, novos grupos compostos por novas sequências vêm sendo relatados em estudos independentes. Um exemplo é o grupo formado por plânctons de alto mar (LÓPEZ-GARCÍA *et al.*, 2001), sedimentos hidrotermais (EDGCOMB *et al.*, 2002), amostras de marés anóxicas (DAWSON & PACE, 2002) e sedimentos fluviais (BERNEY, FAHRNI & PAWLOWSKI, 2004). Alguns dos grupos, que vêm sendo descobertos com o uso das técnicas moleculares, aparecem como bons candidatos para novos grupos filogenéticos (BERNEY, FAHRNI & PAWLOWSKI, 2004), embora, ainda seja necessária a validação por abordagens complementares, incluindo a hibridização *in situ* (FISH) e, em última análise, caracterização morfológica e estrutural.

MOON-VAN DER STAAY e colaboradores (2001) identificaram uma ampla variedade de linhagens de microeucariotos através da utilização de técnicas moleculares, principalmente de grupos fotossintetizantes. Esses autores analisaram ainda a diversidade de microeucariotos em águas superficiais do Mediterrâneo, Atlântico Norte e Antártica, demonstrando que uma grande porcentagem dos clones obtidos correspondiam a novas linhagens. Outro estudo utilizando métodos moleculares realizado em águas profundas da Antártica por LÓPEZ-GARCÍA e colaboradores (2004) sob condições consideradas inóspitas, mostrou a presença de muitas novas linhagens não fotossintéticas, incluindo dois novos grupos distintos.

A amplificação e o sequenciamento dos fragmentos do gene que codifica a subunidade 18S do RNA ribossomal, com o objetivo de gerar bibliotecas de clones, e o uso da técnica de DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante) são essenciais para o estudo da diversidade de microeucariotos.

2. JUSTIFICATIVA

Como mencionado neste trabalho, os manguezais vêm sofrendo diversos tipos de impacto de origem antropogênica, sendo a contaminação desses ambientes com petróleo, um dos principais problemas (GESAMP *et al.*, 1993; GARRITY *et al.*, 1994). Apesar da Restinga da Marambaia ser um ambiente sem histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo, ela está localizada na Baía de Sepetiba, onde se encontra também o Porto de Itaguaí. Este porto está em expansão visando a sua adequação para o recebimento de navios cada vez maiores e mais rápidos (FEEMA, 2010), o que torna esse ambiente altamente suscetível a um desastre ecológico provocado por derramamento de óleo. Por estes motivos é de extrema importância que sejam desenvolvidos estudos sobre impacto provocado pelo petróleo na comunidade bacteriana deste ambiente, possibilitando assim, gerar conhecimentos que auxiliem na biorremediação e no biomonitoramento.

Além da diversidade microbiana muito pouco se sabe também sobre a diversidade de microeucariotos em sedimentos de manguezais e o impacto do petróleo sobre esses micro-organismos. A utilização de técnicas moleculares possibilitará a identificação de grupos de microeucariotos eficientes para o biomonitoramento da presença de petróleo, pois diversos trabalhos sugerem a utilização destes micro-organismos como bioindicadores de outros tipos de alterações ambientais, não apenas devido a sua presença, mas também a sua abundância, tempo de geração e diversidade genética, não tendo sido ainda testados os efeitos do petróleo sobre esse grupo de micro-organismos. A detecção de microeucariotos bioindicadores da presença de petróleo poderá constituir mais uma ferramenta eficiente a ser utilizada no monitoramento de áreas contaminadas, contribuindo assim na otimização de métodos para avaliar a recuperação desses ambientes.

3. OBJETIVO GERAL

O principal objetivo deste trabalho é avaliar o impacto da contaminação por petróleo nas comunidades bacterianas e de microeucariotos de sedimento de manguezal da Restinga da Marambaia, possibilitando identificar, através do uso de métodos moleculares, grupos de micro-organismos que indiquem a presença de petróleo em sedimento de manguezal e ainda gerar conhecimento a respeito das alterações provocadas nessas comunidades microbianas.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a diversidade bacteriana presentes no sedimento do manguezal da Restinga da Marambaia, através da técnica pirosequenciamento, avaliando o impacto provocado pela contaminação de petróleo sobre a comunidade bacteriana do manguezal, da Restinga da Marambaia.
- Utilizar a técnica de PCR/DGGE para monitorar o impacto causado pela contaminação com diferentes concentrações de petróleo (1%, 2% e 5%) na estrutura da comunidade de microeucariotos em microcosmos contendo sedimento do manguezal da restinga da Marambaia;
- Identificar as bandas da técnica de DGGE que representam os grupos de microeucariotos que foram afetados positiva ou negativamente pela presença de óleo.
- Gerar bibliotecas de clones com a utilização dos primers Ek7F e EK516R específicos para eucariotos, para descrever a diversidade desses micro-organismos presentes no sedimento do manguezal da Restinga da Marambaia antes e após a contaminação com diferentes concentrações de petróleo em microcosmos;

- Conhecer a diversidade de microeucariotos da Restinga da Marambaia e detectar os grupos de microeucariotos sensíveis e os grupos favorecidos pela presença de petróleo no sedimento desse manguezal para sugerir possíveis bioindicadores da presença de petróleo que poderão ser utilizados no biomonitoramento em áreas de recuperação ambiental, para o monitoramento de vazamentos de petróleo ou, ainda, para serem utilizados como ferramenta auxiliar para a descoberta de novas reservas de petróleo.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Local de coleta

As amostras de sedimento de manguezal para a montagem dos microcosmos foram coletadas na Restinga da Marambaia (figura 1), localizada no estado do Rio de Janeiro, tendo início no município de Rio de Janeiro, estendendo-se aos municípios de Itaguaí e Mangaratiba, através de seu cordão arenoso. Sua área encontra-se entre os paralelos 23° 01' S e 23° 06' S e os meridianos 43° 33' W e 44° 01' W. (MATTOS *et al.* 2005), ocupa uma área de 4.961,31 ha, estendendo-se por 40 km de sedimentos marinhos (MENEZES & ARAUJO, 2004).

O clima da região enquadra-se segundo a classificação de Köppen como macroclima do tipo AW- clima tropical chuvoso, onde a temperatura média do mês mais frio é superior a 18°C e a do mês mais quente superior a 22°C. A taxa média anual referente à precipitação é de 1239,7mm (MATTOS *et al.* 2005).



Figura 1: Restinga da Marambaia, Rio de Janeiro, Brasil (fontes: <http://maps.google.com.br>; G. Gurgel e Erick Aniszewski).

5.2 Microcosmos

Para este trabalho os microcosmos foram montados em unidades de PVC de 10 cm × 8 cm, gerando um total de 59 unidades, que receberam 600 gramas de sedimento cada (figura 2). Houve reposição de água destilada a cada dois dias.



Figura 2: Montagem dos microcosmos.

5.3 Contaminação

A contaminação foi realizada com diferentes porcentagens (1%, 2% e 5%) de óleo cru (v/p), doado pela PETROBRAS, sendo o mais utilizado por esta companhia na Baía de Guanabara. O sedimento foi homogeneizado, antes e após a contaminação (figura 3).



Figura 3: Contaminação do sedimento.

5.4 Tempos de coleta

As amostras foram coletadas dos microcosmos, em diferentes tempos (dias): T-0 (antes da contaminação com petróleo), T-7, T-15, T-23, T-66.

5.5 Extração de DNA

A extração do DNA do solo foi realizada através do método de extração direta com o kit FastDNA Spin for Soil (BIO101, Vista, Califórnia). Em microtubos contendo pérolas de vidro finamente moída, foram adicionados 0,5 g de solo, 978 µl de tampão fosfato e 122 µl de tampão MT. Estes tubos foram agitados horizontalmente por 30 s a 4 m/s^{-1} , em um FP120 FastPrep Cell Disruptor (BIO101, Vista, Califórnia). Em seguida, foram centrifugados por 1 min a 13000g e os sobrenadantes transferidos para tubos limpos. A essa solução foi adicionado 250 µl de tampão PPS, agitando-se os tubos 10 vezes por inversão. Os tubos foram centrifugados por 10 min a 13000g e os sobrenadantes coletados foram transferidos para microtubos limpos. Ao sobrenadante foi adicionado 1 ml de matriz de ligação, agitando-se os tubos durante 2 min. por inversão. Em seguida os tubos foram incubados por 3 min., a matriz de ligação transferida para um filtro acoplado a um microtubo (Spin Filter, BIO101), e os tubos centrifugados por 2 min a 13000g. A matriz de ligação retida no filtro foi lavada com 500 µl de uma solução (SEWS pH 6,6-6,8) e o filtro centrifugado 2 vezes por 2 min a 13000g. Após 5 min. de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 50 µl de água ultra pura ao filtro e centrifugado por 2 min a 13000g.

A qualidade e a pureza do DNA obtido foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v). Amostras de DNA (5 µl) foram misturadas com 5 µl de corante para eletroforese (50% de glicerol, 20 mM de EDTA pH 7,5, 0,05% de azul de bromofenol, 0,05% de xilenocianol) e aplicadas nos géis. Os géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 90V em tampão TBE 1x (89 mM de Trisbase, 2,5mM de EDTA, 89 mM de H_3BO_3) pelo período de uma hora e, em seguida, foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz U.V.

5.6 PCR-DGGE do fragmento de gene que codifica o 18S rRNA

Para amplificação de fragmentos específicos do gene que codifica a subunidade 18S do ribossomo de microeucariotos foi utilizado o seguinte conjunto de iniciadores: Ek7F-GC e EK516R (DÍEZ, 2001; MOON-VAN DER STAAY, WACHTER & VAULOT *et al.*, 2001; WILMS, 2006). A amplificação foi realizada em solução contendo: 2,5 µl de tampão para PCR 10 X; 0,2 mM dNTP; 2,0 mM MgCl_2 ; 0,75 U de Taq DNA polimerase recombinante (Promega); 10 ng de DNA total; 5

pmol de cada iniciador; água Milli-Q esterilizada para um volume final de 25 µl. A amplificação foi realizada em um termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf), nas seguintes condições: desnaturação inicial durante 130 seg a 94°C; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, pareamento a 56°C por 45 seg e extensão a 72°C durante 130 seg; extensão final a 72°C durante 7 min.

Todos os produtos de PCR foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v). Amostras de DNA (5 µl) foram misturadas com 3 µl de corante para eletroforese e aplicadas nos géis. Os géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 90V em tampão TBE 1x pelo período de uma hora e, em seguida, foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz U.V.

Os amplicons foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE). Os géis de DGGE foram preparados com solução de poliacrilamida (6%) em tampão Tris-acetato (pH 8,3). Estabelecido um gradiente de 30% a 65% de desnaturantes químicos (formamida e ureia). O tempo de corrida foi de 16 h a 175 V. Os géis foram corados com solução de SYBR GREEN (Molecular Probes), diluída na razão de (1:10.000, v/v) em tampão TAE 1x, segundo especificação do fabricante, por aproximadamente 40 min, no escuro. Em seguida, os géis foram observados sob luz U.V. e fotografados em um sistema de captura de imagem STORM (Pharmacia, Amersham). Para as análises dos géis de DGGE foram montados dendrogramas baseados nos perfis de bandas observados utilizando-se o coeficiente de similaridade de Pearson e o método de agrupamento UPGMA, através da utilização do software Bionumerics v 6.0 (Applied Maths) (NÜBELL *et al.*, 1999).

5.7 Clonagem dos Amplicons de rDNA

Para a clonagem foram utilizados os amplicons gerados na reação de PCR (6 reações de 25 µl foram corridos em gel de agarose 1,2%, a 100V por 1 h). O fragmento de gel contendo as bandas formadas pelos amplicons foi retirada e tratada com Kit QIAquick PCR Purificatin Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante, como se segue: o fragmento de gel foi colocado em um tubo de polietileno de 1,5ml, adicionado de buffer QG. A seguir a amostra foi incubada a 50°C por 10 min até a dissolução do gel. A amostra foi então aplicada à coluna QIAquick e centrifugada a 13.000 rpm por 1 min. A coluna foi então lavada com 0,75 ml de

buffer PE através de centrifugação por um minuto. As amostras foram centrifugadas novamente por 1 min a 13.000 rpm para a secagem da coluna. O filtro foi retirado e colocado em um novo tubo de polietileno. Para a eluição do DNA, foram adicionados 30 µl de água Mili-Q à membrana QIAquick com posterior centrifugação a 13.000 rpm por 1 min.

Os amplicons purificados do gel foram utilizados na ligação com o plasmídeo pGem T-easy vector de acordo com as instruções do fabricante, como se segue: em um tubo de polietileno de 1,0 ml foram adicionados 5 µl do 2x Rapid Ligation Buffer, 1 µl do vetor pGEM-Teasy Vetor (50 ng/ml), 3 µl do produto de PCR purificado e 1 µl da DNA Ligase T4. A ligação foi incubada a 4°C “overnight”. Para a transformação foram utilizadas as células competentes DH5α (*E. coli*). A cada tubo contendo 100 µl das células foram adicionados 5 µl da ligação. A amostra foi mantida em gelo por trinta minutos, sendo então incubada por um minuto a 42°C. Em seguida foi mantida por 30 min no gelo, sendo adicionado 1 ml de meio de cultura líquido LB (lactose e bacto-peptona) e mantidas em agitação a 200 rpm no shaker por uma hora a 37°C. As células transformadas foram crescidas a 37°C por 24 horas em placas contendo cerca de 20 ml de LB sólido com a adição de 10 µl de IPTG (100 mM), 16 µl de X-Gal (50 mg/ml) e 40 µl de ampicilina (50 mg/ml). As células brancas contendo o inserto de interesse foram utilizadas na extração dos plasmídeos.

5.8 Extração dos Plasmídeos por Lise Alcalina (Mini-prep)

As colônias contendo os insertos foram repicadas para placas “deep well” de 96 poços contendo 1 ml de meio LB líquido com ampicilina (50 µg/ml). As placas foram mantidas agitando a 200 rpm a 37°C por 22 h. Em seguida foram centrifugadas por 6 min a 4000 rpm e 20°C. O sobrenadante foi descartado removendo-se o excesso, mantendo-se a placa invertida sobre papel absorvente por cerca de 2 min. 240 µl de GET (23 ml de glicose anidra 20% filtrada, 10 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0, 13 ml de Tris-HCl pH 7,4 e 500 ml de água deionizada), foram adicionados em cada poço, recobrimo-se com adesivo e agitando-se em vortex por 2 min. Em seguida o material foi centrifugado por 9 min a 4000 rpm e 20°C. O sobrenadante foi descartado e o excesso foi removido mantendo-se a placa invertida em papel absorvente por cerca de 2 min. Foram então adicionados 83 µl de

GET+RNase (10 mg/ml) a cada poço, recobrando-se com adesivo e agitando-se em vortex por 2 min. O volume foi transferido para placa de fundo em “U” de polipropileno, onde foram adicionados 80 µl de solução alcalina (1 ml de NaOH 4 N, 2 ml de SDS 10% e 20 ml de água deionizada) em cada poço que foi recoberto com adesivo e homogeneizado invertendo-se 30 vezes, sendo logo após incubado por 10 min à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 80 µl solução de acetato de potássio 3 M (60 ml de KOAc; 11,5 ml de ácido acético glacial; 28,5 ml de água Milli-Q) em cada poço, sendo as placas recobertas com adesivo e homogeneizadas 30 vezes por inversão, incubando-se por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida foi retirado o adesivo e a placa foi deixada em estufa a 90°C por 30 min. Todo o volume foi então filtrado em placa de filtro Millipore de 0,22 µm, com placas de fundo V afixadas abaixo. A centrifugação de filtração foi feita por 6 min a 4000 rpm a 20°C, sendo o sobrenadante descartado, adicionando-se em seguida 200 µl de etanol 70% gelado. Depois dessa etapa as placas foram centrifugadas sem adesivo por 5 min a 4000 rpm a 20°C, sendo o sobrenadante descartado e a placa incubada aberta à temperatura ambiente para a eliminação do etanol. O DNA foi ressuspendido em 40 µl de água deionizada autoclavada durante cerca de 12 h. Após este período foi então armazenado em freezer a -20°C. A quantificação do plasmídeo extraído foi realizada em gel de agarose 1% por eletroforese a 100 V durante 1 h.

5.9 Sequenciamento

Os insertos foram sequenciados no sequenciador automático ABI-3730 da plataforma de sequenciamento do IOC-FIOCRUZ. A reação de sequenciamento foi feita utilizando-se o Kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Para isto foram utilizados 3 µl do plasmídeo extraído como descrito anteriormente, primer M13 (3,2 pmoles) e água deionizada para um volume final de 7,5 µl. Para a reação de pré-mix foi utilizado um tubo de polietileno contendo 175 µl do tampão de sequenciamento 5x (Applied Biosystems) e 115 µl de Big dye (Applied Biosystems) por placa. O Mix foi armazenado em gelo protegido da luz. Em seguida, os tubos de polietileno contendo o Mix foram homogeneizados e centrifugados brevemente. Após esta etapa, foram acrescentados 2,5 µl do Mix a cada poço. Em seguida, foi realizada uma breve centrifugação e a amostra foi levada para o termociclador com

o ciclo de 40 repetições a 94°C por 10 min, 50°C por 5 min e 60°C por 4 min. Após uma centrifugação breve, foram adicionados 30 µl de isopropanol 75%. Em seguida a placa foi agitada em vórtex rapidamente e foi mantida em repouso por 15 min ao abrigo da luz. Logo depois, a placa foi centrifugada por 45 min a 4.000 rpm e 20 °C. O sobrenadante foi descartado, vertendo-se a placa sobre folhas de papel toalha absorvente. Em seguida, foram adicionados 5 µl de etanol 75% e a placa foi centrifugada por 15 min a 4.000 rpm e 20°C. O sobrenadante foi descartado novamente vertendo-se a placa sobre folhas de papel toalha absorvente. A seguir, a placa foi centrifugada invertida a 6.000 rpm e colocada em um bloco aquecido a 60 °C por 10 min sem ser exposta a luz. Para a reação de desnaturação foram adicionados 10 µl de formamida, sendo em seguida feita uma breve centrifugação. Em seguida a placa foi aquecida a 95°C por 3 min sem ser exposta a luz. A placa foi colocada em gelo a 4°C por 15 min e uma nova centrifugação breve foi realizada. Por fim, a placa foi levada para a eletroforese no sequenciador.

5.10 Pirosequenciamento

As reações de pirosequenciamento foram realizadas no “Center for Microbial Ecology”, “Michigan State University”, USA, em colaboração com o Dr. James M. Tiedje. Para tal foram utilizados iniciadores que eram adjacentes a uma região hipervariada do *rrs* (gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal). Aos oligonucleotídeos desenhados foram acrescentados os adaptadores A e B necessários para o pirosequenciamento no *454 Life Science* (Roche) possibilitando especificar o fim da amplificação do fragmento do *rrs* para a construção da biblioteca. Foram geradas bibliotecas de amplicons por PCR de cada uma das amostras. As reações de 100 µl continham uma mistura de tampão da enzima Taq-polimerase 1x, 2,5 mM de MgCl₂, 200 µmol de cada dNTP, 20 µmol de cada iniciador, 1% de formamida, 5µg de BSA, 2,5 U Taq polimerase e água Milli-Q estéril. Em cada reação, foram aplicados cerca de 3-10 ng de DNA ambiental. A reação ocorreu em um termociclador com uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 min, seguidos de 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 45 seg a 57°C e 1 min a 72°C, e uma extensão final a 72°C por 2 min. Os produtos de PCR foram purificados usando um Kit de purificação (Qiagen) de acordo com as especificações do fabricante. Apenas produtos de PCR

contendo mais de 200 ng de DNA foram utilizados para o seqüenciamento no *454 Life Science*. Os fragmentos da biblioteca de amplicons foram ligados a esferas em condições que possibilitem a ligação de apenas um fragmento em cada esfera. As esferas foram emulsificadas em um mistura de PCR em óleo. Após a emulsificação, as fitas de DNA foram desnaturadas, e as esferas carreando apenas uma única fita simples de DNA foram colocadas em poços de uma microplaca (*Pico Titer-Plate – 454 Life Science*) para o piroseqüenciamento no *454 Life Science* (SOGIN *et al.*, 2006; ROESCH *et al.*, 2007).

5.11 Análises dos dados

Para a estimativa da riqueza de espécies bacterianas no manguezal da Restinga da Marambiaia antes e após a contaminação por petróleo foram utilizados os seguintes estimadores de riqueza: *Chao1* e *ACE*. Estes estimadores aqui empregados são algoritmos não paramétricos que estimam o número de espécies ainda por serem coletadas baseadas numa quantificação de raridade (TOTI, COYLE & MILLER, 2000).

O Estimador *ACE* é baseado no conceito de abundância, e utiliza para as estimativas de riqueza espécies com dez ou menos indivíduos por amostra. (LEE & CHAO, 1994). O estimador *Chao1* é também baseado em abundância, entretanto utiliza a relação entre o número de *Singletons* e *Doubletons*, que são, respectivamente, o número de espécies representadas por somente um e dois indivíduos para as estimativas de riqueza (COLWELL, 1997).

Para uma estimativa da diversidade de espécie foi utilizado o índice de Shannon. Este índice mede o grau de incerteza em prever a que espécie pertencerá um indivíduo escolhido, ao acaso, de uma amostra com S espécies e N indivíduos. Quanto menor o valor do índice de Shannon, menor o grau de incerteza e, portanto, a diversidade da amostra é baixa. A diversidade tende a ser mais alta quanto maior o valor do índice.

6. RESULTADOS

6.1 Diversidade bacteriana do sedimento de manguezal da Restinga da Marambaia revelada pela técnica de pirosequenciamento

A diversidade bacteriana do sedimento de manguezal da Restinga da Marambaia foi estudada através de análises filogenéticas das sequências obtidas pela técnica de pirosequenciamento. Foram analisadas duas amostras correspondentes ao tempo zero, sem contaminação por petróleo. As duas réplicas somadas geraram 4132 sequências, onde 2288 correspondem a réplica I e 1844 a réplica II, gerando 910 e 719 UTOs (Unidade Taxonômica Operacional).

A estimativa de riqueza de espécies medida pelos estimadores ACE e Chao 1 foram respectivamente de 2113 e 2002 na réplica I e 1695 e 1582 na réplica II. A diversidade bacteriana neste ecossistema foi medida pelo índice de Shannon, que demonstrou valores de 6,22 na réplica I e 5,95 na réplica II (tabela 1).

Tabela 1: Estimativa de riqueza de OTUs, índice de diversidade e estimativa de cobertura das amostras de pirosequenciamento do 16 rRNA.

Biblioteca	NS ^a	OTUs ^b	Estimativa de riqueza de OTUs		Shannon ^e	ESC ^f
			ACE ^c	Chao1 ^d		
T0 I	2288	910	2113 (1954; 2295)	2002 (1772; 2300)	6.22 (6.16; 6.27)	0.75
T0 II	1844	719	1695 (1497; 1944)	1582 (1387; 1846)	5.95 (5.89; 6.01)	0.76

a Número de sequências de cada amostra.

b Calculado com DOTUR com 3% distancia.

c, d média (mínimo; máximo)

e Índice de diversidade de Shannon calculado com DOTUR (distância de 3%)

f Sequências únicas e n é o número total de sequências

A distribuição filogenética dessas sequências foi bastante heterogênea com representantes de 22 filios diferentes predominando o filo Proteobacteria, com 1160 sequências na réplica I e 948 na réplica II, o que representa 52% nas duas amostras (figura 4). Na primeira e na segunda amostra, 26% e 22% não foram identificadas.

Em ambas as réplicas a distribuição dos filios foi bastante semelhante, com uma grande predominância de Proteobacteria seguida a distância pelos demais filios que somados correspondem apenas 22% e 27% de toda a diversidade bacteriana. Entre estes filios podemos destacar o Firmicutes, que representa de 5% a 7% das sequências, o Acidobacteria e Deferribacteres que corresponde a 5% e 4%, respectivamente nas duas réplicas e ainda os filios, Chloroflexi, Actinobacteria, Verrumicrobia e Bacteroidetes que variaram entre 3% e 1% cada (figura 4).

Os demais filós encontrados foram incorporados ao grupo denominado de outros, por representarem menos de 1% das sequências estudadas, facilitando a visualização da abundância de filós no sedimento de manguezal da Restinga da Marambaia. A soma destes filós ocupa uma porcentagem de apenas 2% na réplica I e 1% na réplica II e estão citados na tabela 2, levando em consideração o número de sequências em cada amostragem.

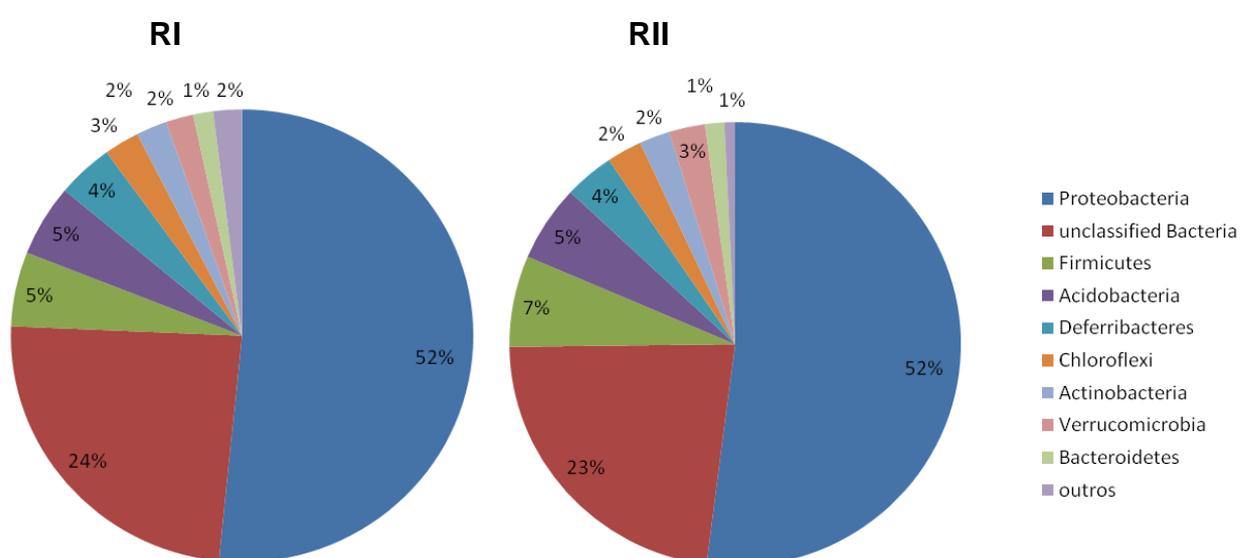


Figura 4: Diagrama circular referente à abundância dos filós bacterianos observados através da técnica de pirosequenciamento, no sedimento de manguezal da Restinga da Marambaia no tempo zero, sem contaminação com petróleo. RI - gráfico referente à Réplica I; RII - gráfico referente à Réplica II.

Tabela 2: Número de sequências dos filos bacterianos de menor abundância observada através da técnica de pirosequenciamento, no sedimento de manguezal da Restinga da Marambaia no tempo zero, sem contaminação com petróleo, de um total de 2288 sequências na Réplica I (RI) e 1844 sequências na Réplica II (RII).

FILOS	NS ^a RI	NS ^a RII
Planctomycetes	19	9
Spirochaetes	14	1
Cyanobacteria	3	5
Chlamydiae	5	4
OD1	8	8
Fusobacteria	3	5
WS3	2	
Nitrospira	2	1
TM7	2	5

A maioria das sequências nas amostras referentes ao tempo zero (sem contaminação), estudadas pela técnica de pirosequenciamento, foi relacionada às classes de Gammaproteobacteria e Deltaproteobacteria. Essas duas classes somadas representam 80% e 76% de todo o filo Proteobacteria nas amostragens I e II, respectivamente. Na primeira, a divisão foi de 36% e 44%, já na segunda amostragem foi de 47% e 24% para Gamaproteobacteria e Deltaproteobacteria respectivamente (Figura 5). A porcentagem de Gammaproteobacteria em relação a todas as sequências das réplicas I e II é de 19,95% e de Deltaproteobacteria é de 19,46%, ou seja, as classes Gammaproteobacteria e Deltaproteobacteria representam cerca de 40% de toda diversidade encontrada no sedimento de manguezal da restinga da Marambaia sem contaminação por petróleo.

Ainda dentro do filo Proteobacteria podemos destacar a presença das seguintes classes: Alphaproteobacteria, que representa 11% e 15%, Epsilonproteobacteria que ocupa apenas 2% e 3% do filo e ainda a classe Betaproteobacteria que corresponde a uma porcentagem muito pequena, pois está

representada por apenas 4 sequências na réplica I e 2 sequências na réplica II, respectivamente. A porcentagem de Proteobacteria não classificada foi de 11% e 15% respectivamente, para as réplicas I e II.

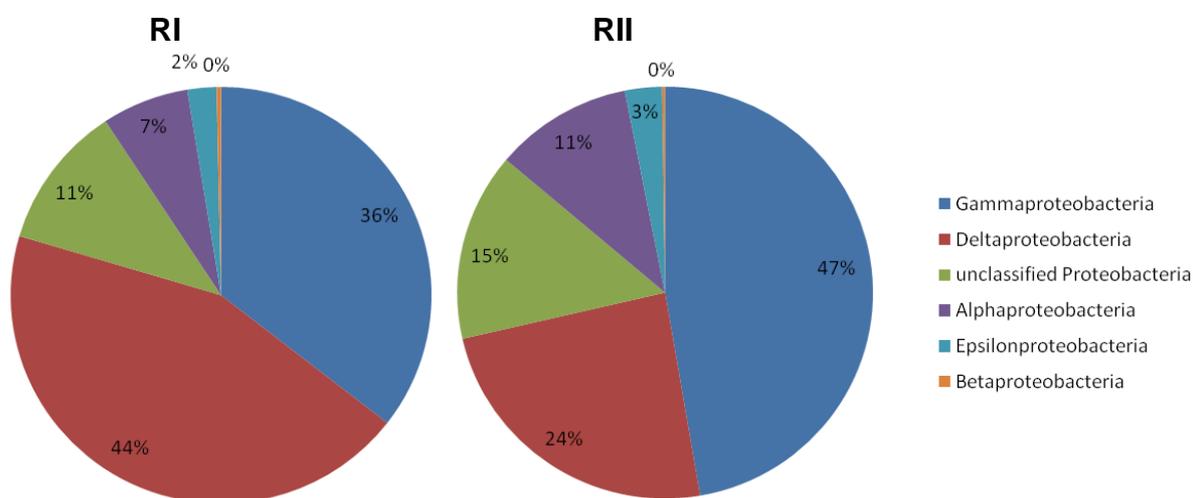


Figura 5: Diagrama circular referente à abundância de classes do filo Proteobacteria observados através da técnica de pirosequenciamento, no sedimento de manguezal da Restinga da Marambaia no tempo zero, sem contaminação com petróleo. RI - gráfico referente à Réplica I; RII - gráfico referente à Réplica II.

Dentro da classe Gammaproteobacteria houve uma predominância da ordem Cromatiales (Figura 6), com 199 sequências na réplica I e 195 na réplica II, correspondendo a 48% e 47% respectivamente, de toda a classe de Gamaproteobacteria e a 9,5% do total de sequências das duas réplicas somadas. Nas amostras estudadas a ordem Cromatiales é composta exclusivamente pelas famílias Chromatiaceae e Ectothiorhodospiraceae.

Ainda na classe Gammaproteobacteria, podemos destacar a presença de outras oito diferentes ordens que ocupam uma porcentagem bastante inferior à ordem Cromatiales e que somadas abrangem uma porcentagem de apenas 7% na réplica I e 8% na réplica II. Entre estas ordens de menor expressão pertencentes à classe Gammaproteobacteria, destacam-se as ordens Alteromonadales

representando 1,9% e 2,2% nas réplicas I e II, respectivamente, a Leigionellales correspondendo a 1,9% e 1,7% e ainda a ordem Oceanospirillales com 1,9% e 0,7%. A porcentagem de Gamaproteobacteria não classificada foi de 45% em ambas as réplicas.

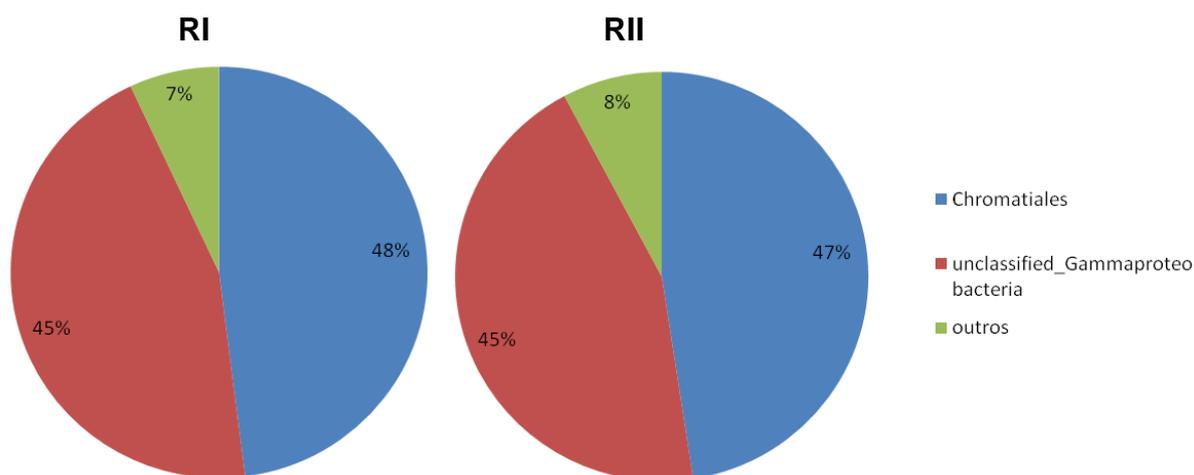


Figura 6: Diagrama circular referente à abundância da classe Gamaproteobacteria observada através da técnica de pirosequenciamento, no sedimento de manguezal da Restinga da Marambaia no tempo zero, sem contaminação com petróleo. RI - gráfico referente à Réplica I; RII - gráfico referente à Réplica II.

A distribuição em ordens pertencentes à classe Deltaproteobacteria foi mais homogênea do que a da classe Gammaproteobacteria e apresentou uma porcentagem de não classificados significativamente inferior com 12% e 9% nas réplicas I e II, respectivamente (figura 7). Nessa classe ocorreu uma predominância bastante elevada da ordem Desulfobacterales, com 75% e 76% nas duas amostragens, sendo esta ordem a que apresentou o maior número de sequências da comunidade bacteriana estudada neste trabalho, com 383 e 288 sequências nas duas diferentes amostras, o que significa aproximadamente 16,25% do total de sequências analisadas. Dentro desta ordem, verificou-se a presença de duas famílias, Desulfobacteraceae e Desulfobulbaceae, com uma predominância de cerca de 75% da primeira.

A segunda ordem a apresentar uma porcentagem considerável, porém bastante inferior à Desulfobacterales, foi a ordem Desulfuromonales com 12% na réplica I e 9% na réplica II, seguida pela Myxococcales com 5% e 9% respectivamente. Outras ordens encontradas foram a Syntrophobacterales com um total de 12 sequências nas duas réplicas e a Desulfovibrionales somando apenas 4 sequências.

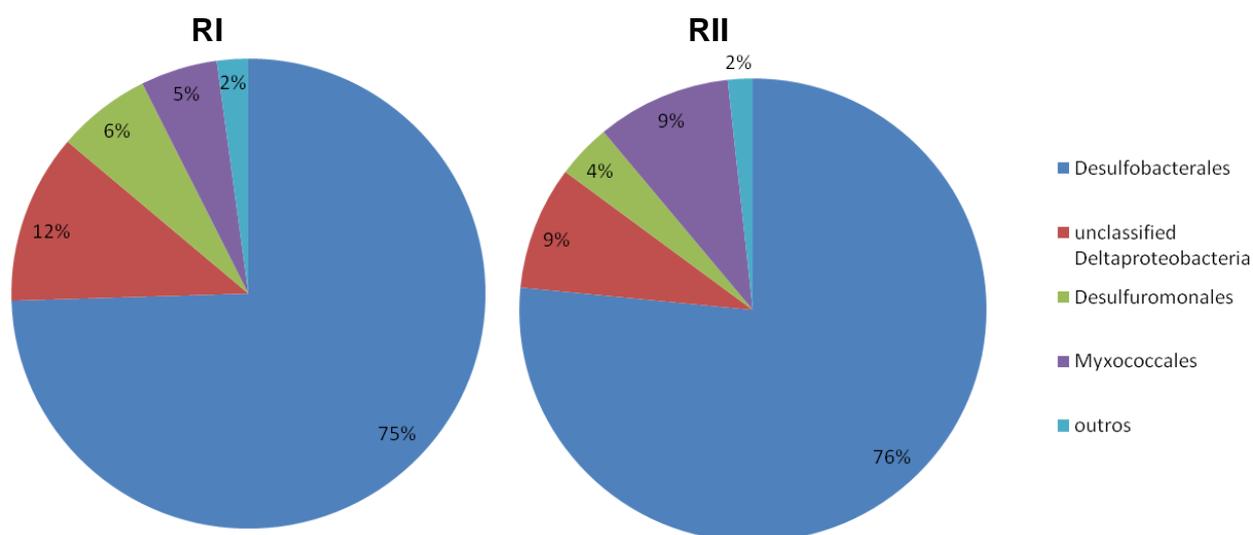


Figura 7: Diagrama circular referente à abundância de ordens da classe Deltaproteobacteria observada através da técnica de pirosequenciamento, no sedimento de manguezal da Restinga da Marambaia no tempo zero, sem contaminação com petróleo. RI - gráfico referente à Réplica I; RII - gráfico referente à Réplica II.

Ao contrário do observado nas classes Gammaproteobacteria e Delatproteobacteria, a classe Alphaproteobacteria não apresentou dominância de uma ordem específica. Esta classe é compreendida por seis diferentes ordens com predominância de três (Rhodobacterales, Rhodospirillales e Rhizobiales) que somadas correspondem a mais de 60% de todas as sequências pertencentes a esta classe. Estão presentes ainda as ordens Sphingomonadales, Rickettsiales e Parvularculales.

O filo Firmicutes representado por 96 e 121 sequências é composto exclusivamente pela classe Clostridia representada quase que exclusivamente pela família Clostridiales. Não muito diferente deste, o filo Acidobacteria possui 100% das sequências relacionadas à família Acidobacteriaceae, o que significa 110 e 101 sequências nas réplicas I e II respectivamente. No entanto, a família Acidobacteriaceae está dividida em cerca de 9 gêneros (Gp1, Gp9, Gp10, Gp16, Gp17, Gp18, Gp21, Gp22 e Gp23).

Apesar dos filios Firmicutes e Acidobacteria não possuírem uma representatividade relativamente alta, quando comparados à Proteobacteria, as famílias Clostridiales e, principalmente, a Acidobacteriaceae possuem uma porcentagem significativa em relação às demais famílias. Por exemplo, Acidobacteriaceae representa cerca de 5% das diversas famílias estudadas, valor com certa relevância, pois uma das famílias que possui a maior porcentagem é a Desulfobacteraceae pertencente à ordem Desulfobacterales com aproximadamente 12%.

O filo Deferribacteres é representado por apenas 4% da diversidade bacteriana e possui 100% das suas sequências relacionadas ao gênero *Caldithrix*, o que corresponde a 158 sequências quando somadas as réplicas I e II. Esse valor é considerável, pois mesmo este filo não possuindo uma representação muito elevada, o gênero *Caldithrix* é possuidor do maior número de sequências quando comparado com os demais gêneros, seguido do gênero GP23 da família Acidobacteriaceae com 69 sequências e do gênero *Desulfobulbus* com 44 sequências, pertencente à família Desulfobacteraceae, a mais abundante nas duas amostragens, com 456 sequências. Em outras palavras, o filo Deferribacteres, mesmo sendo detentor de apenas uma pequena porcentagem da diversidade bacteriana, possui o gênero com maior abundância, justamente por ser um filo totalmente homogêneo sem nenhum representante de outra família, ordem ou classe.

6.2 O impacto ocasionado pelo petróleo na diversidade bacteriana da Restinga da Marambaia, revelado pela técnica de pirosequenciamento

O impacto da presença de petróleo sobre a diversidade bacteriana do sedimento de manguezal da Restinga da Marambaia foi medida pelo índice de Shannon, pelos estimadores de riqueza de espécie ACE e Chao 1 e através da

análise filogenética das sequências obtidas pela técnica de pirosequenciamento, a partir das amostras dos microcosmos com diferentes porcentagens de petróleo e tempos distintos de contato com o contaminante. Foram analisadas 5 amostragens diferentes em duplicata, somando um total de oito amostras, o que gerou cerca de 32.000 sequências.

A riqueza e a diversidade de espécies sofreram algumas alterações após a adição das diferentes porcentagens de petróleo e ao longo do tempo (tabela 3). As amostras referentes ao 23º dia de contaminação com 2% (v/p) de óleo apresentaram um aumento considerável da diversidade microbiana através do uso de todos os estimadores utilizados neste trabalho, quando comparado com as duas amostragens sem petróleo (T0 - RI e RII), principalmente em relação ao grupo controle do dia 23 (T23). O estimador ACE demonstrou um aumento de aproximadamente 1900 sequências (média da duplicata das réplicas do tempo zero), para cerca de 2800 nas amostras T23 2% (23 dias com 2% de óleo), esse aumento é ainda maior quando comparamos as amostras com óleo, com o grupo controle sem óleo (T23), que apresentaram uma riqueza de aproximadamente 1000 sequências. Resultado similar foi visualizado pelo estimador Chao1 (figura 8). Pelo índice de Shannon, foi visualizado uma diminuição na diversidade um pouco menor no grupo controle, de aproximadamente 6,08 na média das réplicas do tempo zero para cerca de 5,68 (média da duplicata), e um aumento na diversidade após a adição do óleo, atingindo o ápice nas amostras do tempo 23 com 2% de óleo (figuras 9).

Todos os indicadores demonstraram que o aumento não foi tão expressivo quando a porcentagem de óleo adicionada ao sedimento de manguezal foi maior, cerca de 5% (v/p), e ainda, após um período maior da presença de hidrocarbonetos petrogênicos no sedimento de manguezal observou-se uma tendência de diminuição nos indicadores de riqueza de espécies e diversidade (figuras 7, 8 e 9). Este valor parece se aproximar das amostras não contaminadas com óleo, porém com uma abundância ainda um pouco superior. As estimativas de diversidade e de riqueza de espécies nas amostras T23 (controle sem óleo referente ao dia 23) foram menores do que o tempo zero sem óleo em relação os demais tempos com diferentes porcentagens de contaminante.

Tabela 3: Estimativa de riqueza de OTUs, índice de diversidade e estimativa de cobertura das amostras de pirosequenciamento do 16 rRNA.

Biblioteca	NS ^a	OTUs ^b	Estimadores da Riqueza de OTUs		Shannon ^e	ESC ^f
			ACE ^c	Chao1 ^d		
T0 I	2288	910	2113 (1954; 2295)	2002 (1772; 2300)	6.22 (6.16; 6.27)	0.75
T0 II	1844	719	1695 (1497; 1944)	1582 (1387; 1846)	5.95 (5.89; 6.01)	0.76
T23 I	721	410	1015 (857; 1230)	960 (803; 1181)	5.70 (5.62; 5.78)	0.61
T23II	736	403	1050 (881; 1277)	987 (816; 1229)	5.66 (5.81; 5.74)	0.63
T23 2% I	4287	1435	2965 (2855; 3084)	2831 (2586; 3128)	6.57 (6.53; 6.61)	0.81
T23 2% II	4342	1405	2632 (2535; 2737)	2532 (2331; 2776)	6.54 (6.49; 6.58)	0.83
T23 5% I	3242	1067	2026 (1914; 2152)	1819 (1669; 2005)	6.26 (6.21; 6.31)	0.82
T23 5% II	2994	1057	2359 (2228; 2504)	2372 (2105; 2708)	6.22 (6.17; 6.28)	0.79
T61 2% I	2513	916	1841 (1735; 1960)	1827 (1630; 2078)	6.25 (6.20; 6.30)	0.79
T61 2% II	2477	849	1738 (1649; 1837)	1701 (1511; 1947)	5.99 (5.93; 6.05)	0.80

a, Número de seqüências de cada amostra.

b, Calculado com DOTUR com 3% distancia.

c, d média (mínimo; máximo)

e, Índice de diversidade de Shannon calculado com DOTUR (distância de 3%)

f, Seqüências únicas e n é o número total de seqüências

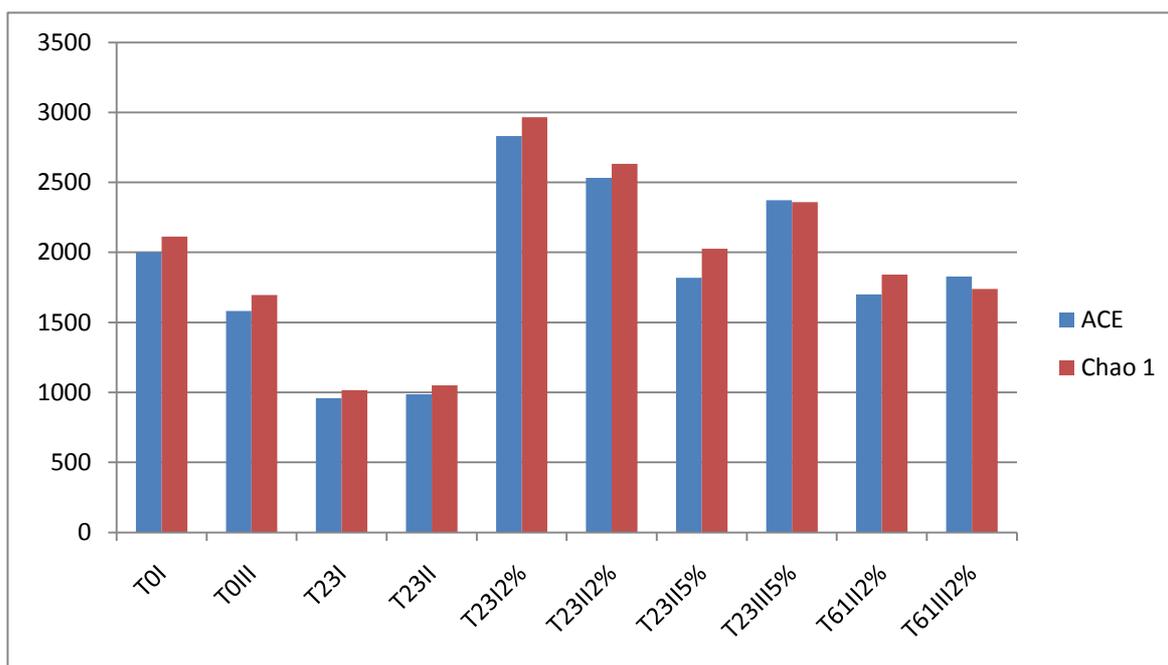


Figura 8: Riqueza de OTUs estimada por ACE e Chao 1. T0 – Tempo antes da contaminação; T23 – 23º dia sem contaminação; T23 2% - 23º dia após a contaminação com 2% (v/p) de petróleo; T23 5% - 23º dia após a contaminação com 5% (v/p) de petróleo; T61 2% - 66º dia após a contaminação com 2% (v/p) de petróleo.

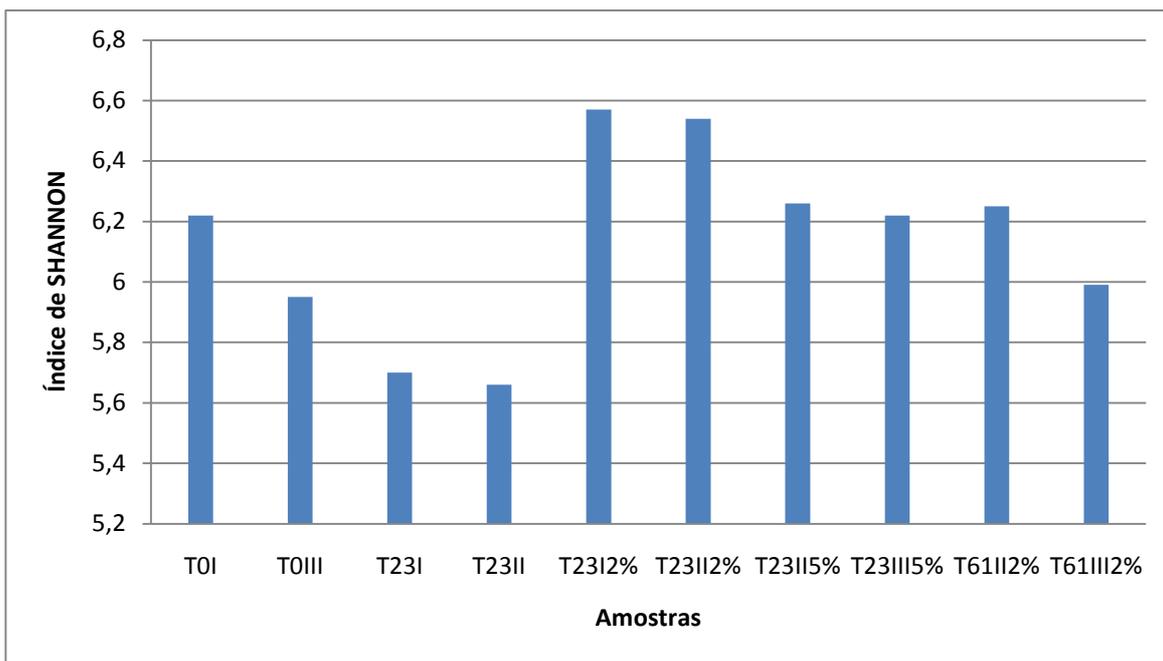


Figura 9: Diversidade bacteriana medida pelo índice de *Shannon*. T0 – Tempo antes da contaminação; T23 – 23º dia sem contaminação; T23 2% - 23º dia após a contaminação com 2% (v/p) de petróleo; T23 5% - 23º dia após a contaminação com 5% (v/p) de petróleo; T61 2% - 66º dia após a contaminação com 2% (v/p) de petróleo.

Para a avaliação do impacto da presença de hidrocarboneto de petróleo na diversidade bacteriana do manguezal da Restinga da Marambaia, foram analisadas as alterações quanto à porcentagem de cada filo, classe, ordem, família ou gênero. Buscando, ainda, facilitar a comparação entre cada amostra, não se levou em consideração as sequências rotuladas como não classificadas.

A avaliação do impacto da contaminação por hidrocarbonetos de petróleo em relação aos filios presentes neste ecossistema, não apresentou variações consideráveis na predominância desses filios. Os filios que apresentavam maior abundância antes da contaminação com óleo mantiveram-se dominantes, sendo estes: Proteobacteria, Firmicutes, Acidobacteria, Deferribacteres, Chloroflexi, Actinobacteria, Verrucomicrobia e Bacteroidetes (figura 10). No entanto, foi observado um aumento considerável no número de representantes de praticamente todos os filios após a contaminação e principalmente em relação às amostragens controles,

sendo visualizado um acréscimo nos estimadores de riqueza de espécies ACE e Chao 1 e no índice de Shannon. Este aumento não foi tão elevado nas amostras com maior quantidade de óleo e tempo de contato com o petróleo.

Ainda em relação aos filós foram visualizadas pequenas alterações quanto à porcentagem de alguns. Após o contato com óleo, verificou-se uma diminuição na porcentagem de Proteobacteria que com o passar do tempo tende a voltar a se igualar às amostras sem a presença do contaminante. O oposto do ocorrido com Proteobacteria foi verificado no filo Firmicutes que aumentou a sua porcentagem de aproximadamente 6% para cerca de 13% nas amostras com 23 dias e 2% (v/p) de petróleo. Porém, este valor diminuiu nas amostras com maior porcentagem de óleo e foi baixo nos modelos com maior tempo de contaminação. O filo Bacteroidetes apresentou alterações semelhantes ao filo Firmicutes com um acréscimo de sua porcentagem após o 23º dia de contaminação e diminuição após dois meses de contato com petróleo.

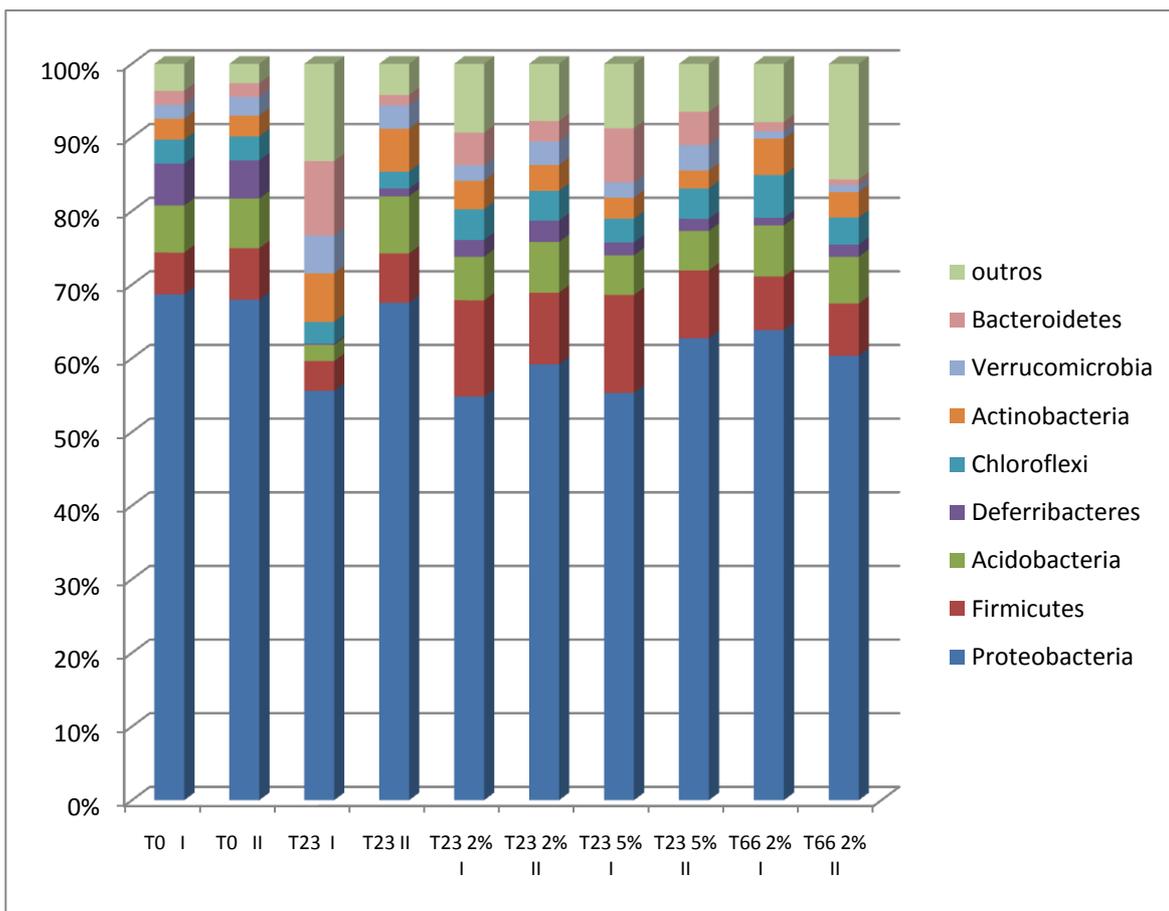


Figura 10: Gráfico com os resultados da análise de pirosequenciamento referente a porcentagem de cada filo antes e após a contaminação. T0 - antes da contaminação; T23 2% - 23º dia após a contaminação com 2% (v/p); T23 5% - 23º dia após a contaminação com 5% (v/p); T66 2% - 66º dia após a contaminação com 2% (v/p).

Os demais filos não apresentaram grandes alterações em suas porcentagens dentro da estrutura da comunidade bacteriana do sedimento de manguezal da Restinga da Marambaia após a contaminação por hidrocarbonetos de petróleo.

Entre os filos com menor representatividade dentro da comunidade bacteriana estudada neste trabalho, o efeito da contaminação foi semelhante ao dos filos com maior abundância, sendo observado um aumento no número de sequências após a contaminação (tabela 4). Ainda dentro deste grupo podemos verificar o surgimento de sequências relacionadas aos filos *Deinococcus-Thermus* e *WS3*, que foram visualizadas somente após a contaminação por petróleo.

Tabela 4: Impacto no número de sequências obtidas através de pirosequenciamento dos filios de menor abundância no sedimento de manguezal da Restinga da Marambaia, após a contaminação por petróleo. T0 – Tempo antes da contaminação; T23 2% - 23º dia após a contaminação com 2% (v/p) de petróleo; T23 5% - 23º dia após a contaminação com 5% (v/p) de petróleo; T66 2% - 66º dia após a contaminação com 2% (v/p) de petróleo.

FILOS	T0 I	T0 II	T23 2% I	T23 2% II	T23 5% I	T23 5% II	T66 2% I	T66 2% II
Planctomycetes	19	9	50	42	56	44	37	38
Spirochaetes	14	1	83	25	13	8	10	12
Cyanobacteria	3	5	35	63	65	47	36	200
Chlamydiae	5	4	43	37	25	5	50	42
OD1	8	8	35	15	15	7	4	3
Fusobacteria	3	5	21	6	4	8	3	1
WS3	2	-	13	23	21	7	3	1
Deinococcus-Thermus	-	-	4	11	11	13	2	4
BRC1	3	1	3	6	-	-	1	1
Nitrospira	2	1	4	3	2	2	8	
TM7	2	-	1	2	-	2	-	1
Gemmatimonadetes	1	-	2	1	3	9	-	-

O filo Proteobacteria além de sofrer alterações em sua porcentagem quando comparado a outros filios, ainda apresentou internamente, variações relevantes quando se avaliou o impacto do petróleo sobre as classes, ordens, famílias e gêneros deste filo. A adição de hidrocarbonetos de petróleo proporcionou um aumento na porcentagem da classe Alphaproteobacteria após a adição de óleo (figura 11). Foi observado um aumento ainda maior na abundância da classe Alphaproteobacteria após 2 meses da presença de hidrocarbonetos de petróleo verificando-se um aumento de 10% para cerca de 20% da comunidade de Proteobacterias.

Em relação às ordens do filo Alphaproteobacteria, foi possível ainda observar maiores proporções dos grupos Rhodobacterales, Rhizobiales e Rhodospirillales, não havendo redução da abundância desses grupos ao longo dos tempos de coleta. Observou-se ainda um pequeno acréscimo na diversidade de gêneros da ordem Rhodobacterales, com a detecção de novos gêneros que não estavam presentes antes da contaminação. O gênero que sofreu o maior aumento na sua abundância após a contaminação foi o *Loktanella*.

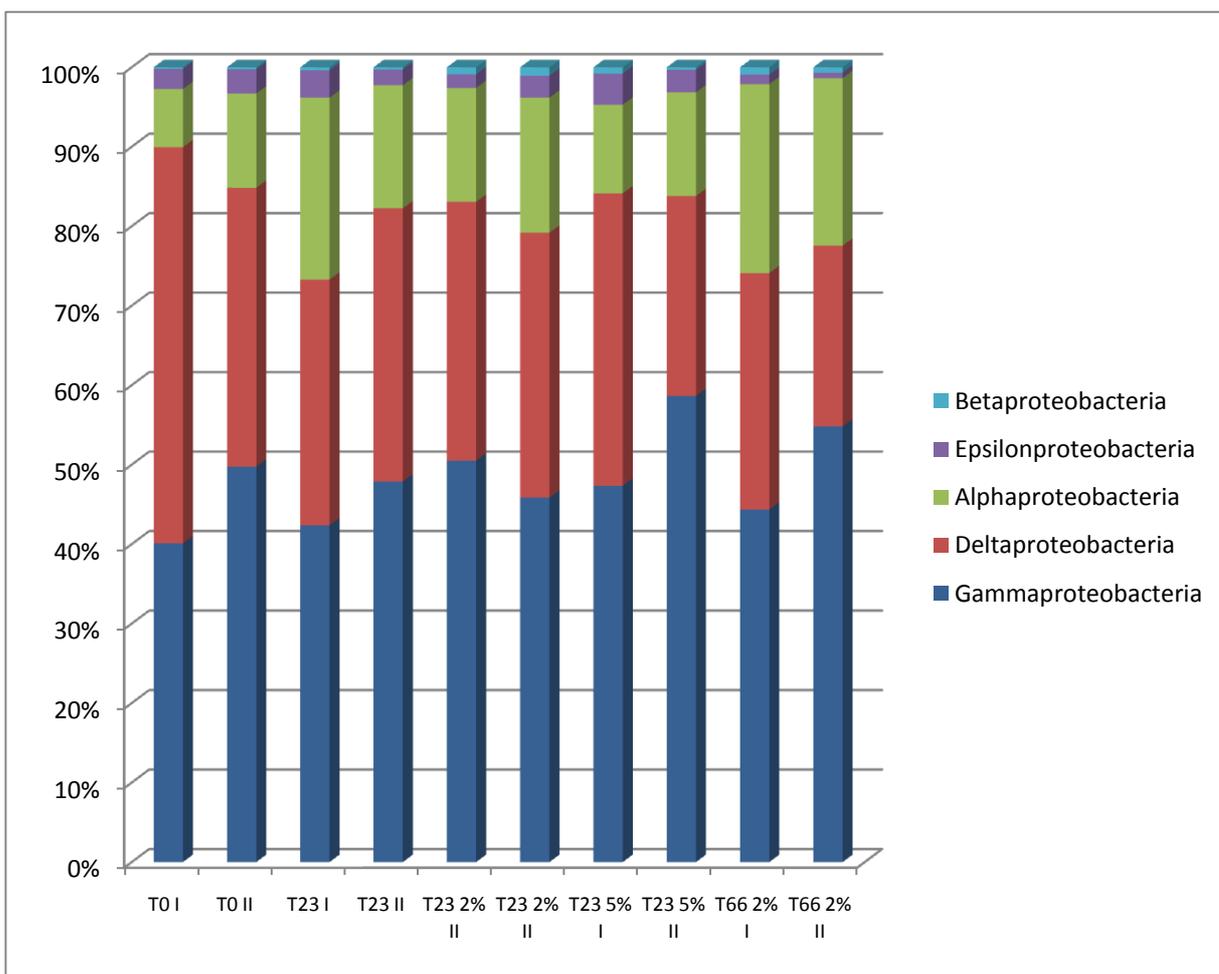


Figura 11: Gráfico referente à distribuição das classes do filo Proteobacteria antes e após a contaminação com petróleo, observada através das análises de pirosequenciamento. T0 - antes da contaminação; T23 2% - 23º dia após a contaminação com 2% (v/p); T23 5% - 23º dia após a contaminação com 5% (v/p); T66 2% - 66º dia após a contaminação com 2% (v/p).

A classe Gammaproteobacteria foi a que apresentou maior número de sequências tanto antes, quanto após a contaminação por petróleo (figura 11). Dentro

desta classe foram observadas variações significativas nos percentuais das ordens, famílias e gêneros, sendo esta, a classe que mais demonstrou alterações na sua estrutura e composição. A ordem Chromatiales, predominante antes da contaminação por petróleo com cerca de 85% de todas as sequências da classe, apresentou alterações significativas em sua abundância nas amostragens com diferentes concentrações de petróleo, dividindo a sua predominância com a ordem Alteromonadales (figura 12). Após 66 dias da presença de óleo a ordem Chromatiales voltou a dominar, mas com uma porcentagem menor, de aproximadamente 60%.

Ainda em Gammaproteobacteria, fica evidente um aumento das ordens Oceanospirillales, Legionellales e principalmente Alteromonadales. A ordem Alteromonadales, antes da contaminação, representava aproximadamente apenas 4% de todas as sequências referentes à sua classe, e passou a representar cerca de 40% nas amostragens referentes ao 23º dia após a contaminação com petróleo (figura 12).

Como a ordem Alteromonadales apresentou resultados altamente positivos após a adição de petróleo, foram analisadas ainda quais famílias desta ordem responderam de maneira mais significativa à presença do contaminante. Dentre as oito famílias detectadas, a *Incertae sedis 7* foi a que apresentou maior aumento na abundância após a contaminação com petróleo. A média do número de sequências das duas réplicas de cada amostragem subiu de 4 sem a presença do contaminante, para aproximadamente 150 e 220 após 23 dias de contaminação nas amostras com 2% e 5% (v/p) de óleo, respectivamente. No entanto, após 66 dias de experimento, houve uma queda considerável no número de representantes dessa família, mas mantendo ainda um número relativamente elevado quando comparado às amostras do tempo zero.

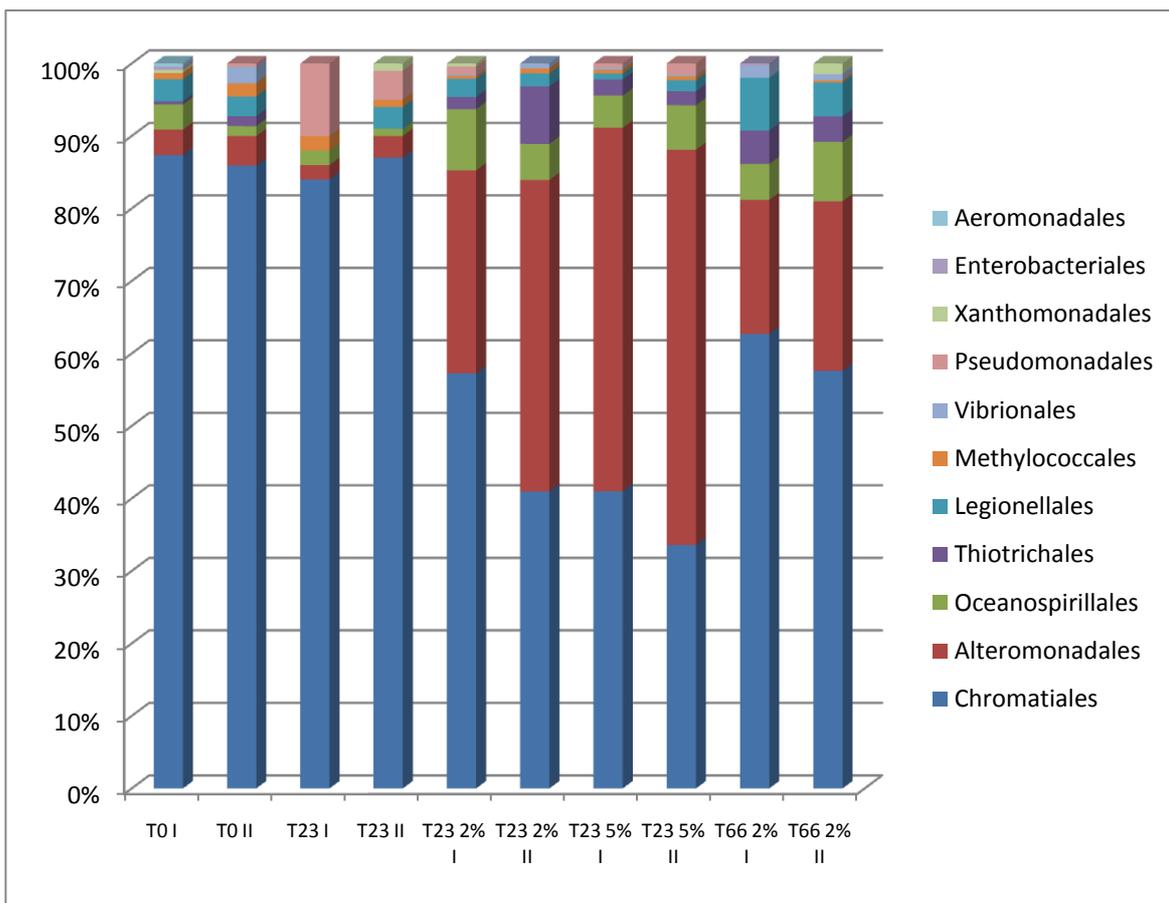


Figura 12: Gráfico referente à distribuição das ordens de Gammaproteobacteria antes e após a contaminação com petróleo, observada através das análises de pirosequenciamento. T0 - antes da contaminação; T23 2% - 23º dia após a contaminação com 2% (v/p); T23 5% - 23º dia após a contaminação com 5% (v/p); T66 2% - 66º dia após a contaminação com 2% (v/p).

Buscando aprofundar ainda mais o conhecimento das alterações ocorridas dentro da ordem Alteromonadales, foi apurado quais gêneros estariam acompanhando o aumento no número de sequências desta ordem e da família Incertae sedis 7. Entre os dezessete gêneros encontrados pertencentes a esta ordem, apenas dois deste total apresentaram aumento expressivo após a adição de petróleo, sendo estes os gêneros: *Marinobacterium* e principalmente *Marinobacter*, ambos da família Incertae sedis 7 (figura 13). Foram detectados no máximo duas sequências desse gênero tanto no tempo zero quanto no controle (23 dias sem

óleo). Após a contaminação foram detectadas 26 e 28 sequências do gênero *Marinobacterium* nas réplicas I e II do tempo 23 com 2% (v/p) de óleo, respectivamente, aumento este que foi bastante similar nas amostras de mesmo tempo e porcentagem maior de contaminante. O número de sequências do gênero *Marinobacter* subiu para uma média de aproximadamente 120 sequências nas amostragens referentes ao 23º dia com 2% de óleo e para cerca de 200 sequências nas amostras de mesmo dia com 5% de contaminante (figura 13).

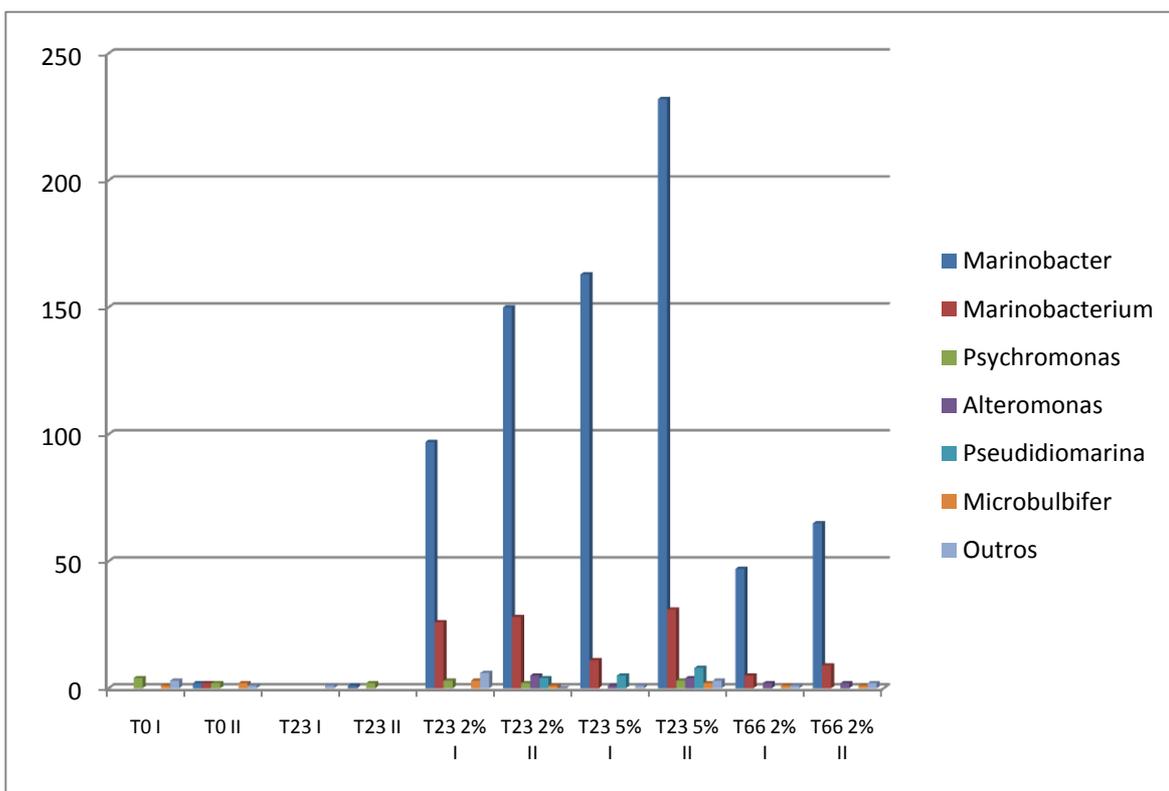


Figura 13: Gráfico referente ao número de sequências dos gêneros da classe Alteromonadales antes e após a contaminação com petróleo, observada através das análises de pirosequenciamento. T0 - antes da contaminação; T23 2%-23º dia após a contaminação com 2% (v/p); T23 5%-23º dia após a contaminação com 5% (v/p); T66 2%-66º dia após a contaminação com 2% (v/p).

O aumento do percentual de representantes do gênero *Marinobacter* torna-se ainda mais relevante se compararmos a sua abundância após a contaminação com o gênero de maior prevalência antes da adição de petróleo, *Caldithrix*, abrangedor

de aproximadamente 3,8% de todas as sequências no tempo zero. O gênero *Marinobacter* alcançou um valor de 6,3% nas réplicas com 5% de óleo, o que representa quase o dobro do percentual observado pelo gênero dominante antes da presença de hidrocarbonetos petrogênicos. Ou seja, este gênero se tornou o mais abundante após a adição de petróleo, com percentuais duas vezes superiores ao observado pelo gênero que dominava as amostras não contaminadas. E ainda, como citado anteriormente, *Marinobacter* era representado nas amostras sem óleo por nenhuma ou apenas por duas sequências nas réplicas I e II, respectivamente.

Semelhante ao observado em diversos grupos microbianos neste estudo, os gêneros *Marinobacter* e *Marinobacterium* demonstraram uma diminuição no número de sequências após 66 dias de experimento. No entanto, o número de sequências referentes à *Marinobacter* ainda se manteve elevado (47 na réplica I e 65 na réplica II).

Ainda no filo Proteobacteria não foi possível detectar alterações nas porcentagens das ordens da classe Deltaproteobacteria. Antes e após a contaminação foi observada a prevalência de Desulfobacterales, que seguiu o mesmo padrão da classe, como visualizado na figura 11.

O filo Verrucomicrobia não sofreu alterações na predominância de suas classes e ordens, no entanto, ao se analisar o impacto nas famílias deste filo, observou-se um grande aumento da família Opitutaceae frente às demais, sendo esta a família de maior abundância neste filo após a presença do óleo, superando as Subdivisão 3, Verrumicrobiaceae e Subdivisão 5 .

O impacto da contaminação por petróleo seguiu um perfil um pouco diferente no filo Bacteroidetes quando comparado com Verrucomicrobia. Neste filo as alterações foram visualizadas nas classes, onde Flavobacteria apresentou aumento na abundância frente às demais, sendo ligeiramente mais abundante nas amostras com maior porcentagem de óleo.

O filo Firmicutes não sofreu alterações na predominância de suas classes sendo praticamente todo representado pela classe Clostridia. O filo Acidobacteria seguiu o mesmo padrão, não tendo sido detectado alterações em sua estrutura, apresentando-se 100% homogêneo mesmo após a presença de óleo, composto em sua totalidade pela família Acidobacteriaceae. Situação semelhante foi visualizada nos filios Deferribacteres e Chloroflexi, que também não apresentaram alterações em

sua composição, sendo o Deferribacteres composto 100% pelo mesmo gênero, *Caldithrix*, antes e após a contaminação e o Chloroflexi, composto por um número de gêneros um pouco maior.

6.3 Diversidade de microeucariotos no manguezal da Restinga da Marambaia

A diversidade de microeucariotos do sedimento de manguezal foi estudada através da análise filogenética das seqüências obtidas por PCR baseadas no gene que codifica o 18S rRNA. Para verificar se o número de clones gerados estava refletindo a diversidade das amostras, foi calculado o índice de cobertura de acordo com CHELIUS & TRIPLETT (2001). A biblioteca referente ao tempo zero (sem contaminação), que objetiva desvendar a diversidade de microeucariotos do manguezal da Restinga da Marambaia, cobriu 80% da diversidade total (tabela 5).

Ao contrário do domínio Bacteria, o domínio Eukarya não possui afiliações filogenéticas bem definidas. Com base nisso, a tabela 6 demonstra as possíveis afiliações filogenéticas dessas seqüências e as respectivas seqüências mais similares encontradas no NCBI, onde foram visualizadas 38 afiliações diferentes em um total de 121 seqüências. A estimativa de riqueza de espécies medida pelos estimadores ACE e Chao 1 foram respectivamente de 97 e 69, e a diversidade de microeucariotos neste ecossistema foi medida pelo índice de Shannon, demonstrando um valor de 3,19 (tabela 5).

Tabela 5: Estimativa de riqueza de OTUs, índice de diversidade e estimativa de cobertura das amostras de pirosequenciamento.

Biblioteca	NS ^a	OTUs ^b	Estimadores de Riqueza de OTUs		Shannon ^e	ESC ^f
			ACE ^c	Chao1 ^d		
0	125	46	97 (68; 164)	69 (55; 107)	3.19 (2.96; 3.42)	0.80

a Número de seqüências de cada amostra.

b Calculado com DOTUR com 3% distancia.

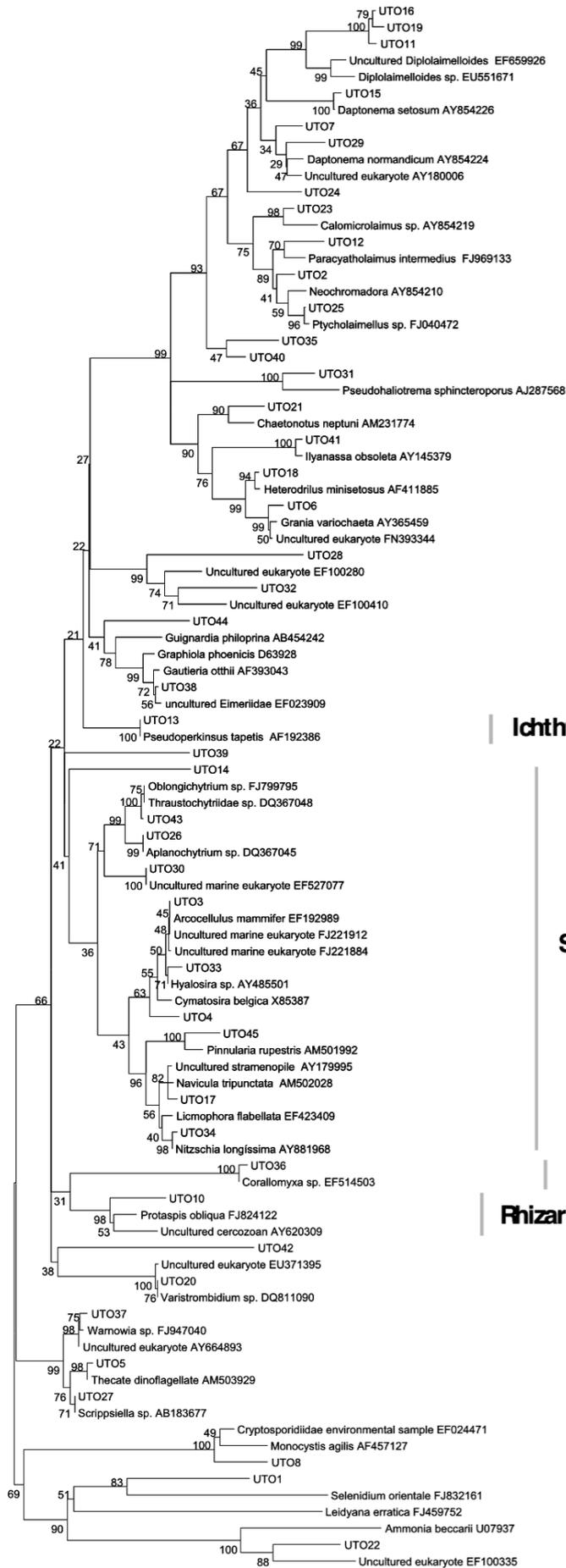
c, d média (mínimo; máximo)

e Índice de diversidade de Shannon calculado com DOTUR (distância de 3%)

f Seqüências únicas e n é o número total de seqüências

Tabela 6: Afiliações filogenéticas das sequências de 18S rDNA de microeucariotos encontrados em sedimento do manguezal da Restinga da Marambaia.

Afiliação filogenética	Espécie ou cepa (n° de acesso)	Sim. (%)	Espécie ou cepa (n° de acesso)	Sim. (%)	Nº. de clones
Fungi/Metazoa					
<i>Ichthyophonida</i>	<i>Pseudoperkinsus tapetis</i> (AF192386)	99	<i>Pseudoperkinsus tapetis</i> (AF192386)	99	1
Fungi					
<i>Dikarya</i>	<i>Melanops tulasnei</i> (FJ824761)	83	Uncultured eukaryote	85	2
<i>Metazoa</i>					
<i>Nematoda</i>	<i>Paracyatholaimus intermedius</i> (FJ969133)	97	<i>Paracyatholaimus intermedius</i> (FJ969133)	97	2
	<i>Monhysteridae environmental sample</i> (GO921338.1)	94-95	<i>Monhysteridae environmental sample</i> (GO921338.1)	94-95	14
	<i>Daptonema normandicum</i> (AY854224)	91-92	Uncultured eukaryote (AY180006)	92-93	4
	<i>Calomicrolaimus sp.</i> (AY854219.1)		Uncultured eukaryote(GU072521.1)		1
	<i>Ptycholaimellus sp.</i> (FJ040472)	99	<i>Ptycholaimellus sp.</i> (FJ040472)	99	3
	<i>Neochromadora</i> (AY854210)	92-97	<i>Neochromadora</i> (AY854210)	92-97	31
<i>Annelida</i>	<i>Grania variochaeta</i> (AY365459)	91	Uncultured eukaryote (FN393344.1)	92	9
	<i>Heterodrilus minisetosus</i> (AF411885)	98	<i>Heterodrilus minisetosus</i> (AF411885)	98	2
	<i>Daptonema setosum</i> (AY854226)	98	<i>Daptonema setosum</i> (AY854226)	98	1
<i>Platyhelminthes</i>	<i>Pseudohaliotrema sphincteroporos</i> (AJ287568)	92	<i>Pseudohaliotrema sphincteroporos</i> (AJ287568)	92	1
<i>Gastrotricha</i>	<i>Chaetonotus neptuni</i> (AM231774)	94	<i>Chaetonotus neptuni</i> (AM231774)	94	1
<i>Mollusca</i>	<i>Ilyanassa obsoleta</i> (AY145379)	97	<i>Ilyanassa obsoleta</i> (AY145379)	97	1
Stramenopiles					
<i>Bacillariophyta</i>	<i>Licmophora flabellata</i> (EF423409)	89	Uncultured marine eukaryote (EF527077)	99	1
	<i>cf. Minutocellus sp.</i> (AY485520)	88-97	<i>cf. Minutocellus sp.</i> (AY485520)	88-100	21
	<i>Navicula tripunctata</i> (AM502028)	96	Uncultured stramenopile (AY179995)	98	2
	<i>Aplanochytrium sp.</i> (DQ367045)	100	<i>Aplanochytrium sp.</i> (DQ367045)	100	1
	<i>Nitzschia longissima</i> (AY881968)	99	<i>Nitzschia longissima</i> (AY881968)	99	1
	<i>Pinnularia rupestris</i> (AM501992)	93	<i>Pinnularia rupestris</i> (AM501992)	93	1
<i>Labyrinthulida</i>	<i>Oblongichytrium sp.</i> (FJ799795)	81	<i>Oblongichytrium sp.</i> (FJ799795)	81	2
	<i>Thraustochytriidae sp.</i> (DQ367048)	98	<i>Thraustochytriidae sp.</i> (DQ367048)	98	1
Alveolata					
<i>Dinophyceae</i>	<i>Thecate dinoflagellate</i> (AM503929)	99	<i>Thecate dinoflagellate</i> (AM503929)	99	1
	<i>Scrippsiella sp.</i> (AB183677)	100	<i>Scrippsiella sp.</i> (AB183677)	100	2
	<i>Warnowia sp.</i> (FJ947040)	97	Uncultured eukaryote (AY664893)	98	2
<i>Ciliophora</i>	<i>Varistrombidium sp.</i> (DQ811090)	97	Uncultured eukaryote (EU371395)	98	1
<i>Apicomplexa</i>	<i>Eimeriidae</i> (EF023909)	98	<i>Eimeriidae</i> (EF023909)	98	1
	<i>Selenidium orientale</i> (FJ832161)	80	<i>Selenidium orientale</i> (FJ832161)	80	2
	<i>Cryptosporidiidae environmental sample</i> (EF024471)	91	<i>Cryptosporidiidae environmental sample</i> (EF024471)	91	2
Rhizaria					
<i>Cercozoa</i>	<i>Protaspis obliqua</i> (FJ824122)	87	Uncultured cercozoan (AY620309)	88	2
<i>Foraminifera</i>	<i>Ammonia beccarii</i> (ABU07937)	85	Uncultured eukaryote (EF100335)	87	3
Amoebozoa					
<i>Centramoebida</i>	<i>Corallomyxa sp.</i> (EF514503)	97	<i>Corallomyxa sp.</i> (EF514503)	97	1
Viridiplantae					
<i>Chlorophyta</i>	<i>Nannochloris sp.</i> (AB183585)	99	<i>Nannochloris sp.</i> (AB183585)	99	1



Metazoa

Fungi

Ichthyosporia

Stramenopiles

Amoebozoa

Rhizaria

Alveolata

Rhizaria

0.02

Figura 14: Árvore filogenética baseada na comparação de sequências do 18S rDNA de clones e sequências de microeucariotos provenientes do GenBank, da amostra de sedimento de manguezal da Restinga da Marambaia sem contaminação com petróleo. A árvore foi construída baseada no método de neighbor-joining. As análises de *bootstrap* foram realizadas com 100 repetições e somente são mostrados os valores maiores que 50%.

A distribuição filogenética dessas sequências não foi heterogênea, como demonstrada na árvore filogenética revelada na figura 13, com uma predominância de 70% de Fungi/Metazoa, seguida do grupo Stramenopila com 25%, Alveolata com 9%, Rhizaria com 4% e Viridiplantae, Amoebozoa e Ichthyosporea com 1%. (figura 15). O grupo Fungi/Metazoa é dominado pelo grupo Metazoa, representado por cerca de 83% das sequências afiliadas a este grupo taxonômico, o que representa 56% do total de sequências desta amostra. Dentro do grupo Metazoa (Metazoários) a distribuição foi um pouco mais homogênea com uma dominância relativamente grande do filo Nematoda (nematelmintos) de 79%, seguida pelo filo Anelida (anelídeos) com 17%, o filo Mollusca (moluscos) com 4% e por Platyhelminthes (platelmintos) e Gastrotricha com 1% (figura 16).

A figura 17 demonstra a divisão em porcentagem da dominância dos diversos grupos filogenéticos relatados neste trabalho, revelando uma dominância dos filios Nematoda (nematelmintos) e Bacillariophyta (diatomáceas) com 45% e 24%, respectivamente. Outros grupos que demonstraram uma alta porcentagem foram Annelida (anelídeos) e Dinophyceae com 10%.

As espécies que demonstraram maior abundância foram referentes aos gêneros *Monhysteridae*, *Minutocellus* e, principalmente, *Neochromadora*, com 14, 21 e 31 sequências respectivamente, o que corresponde a aproximadamente 55% de toda a diversidade das amostras de sedimento de manguezal da restinga da Marambaia.

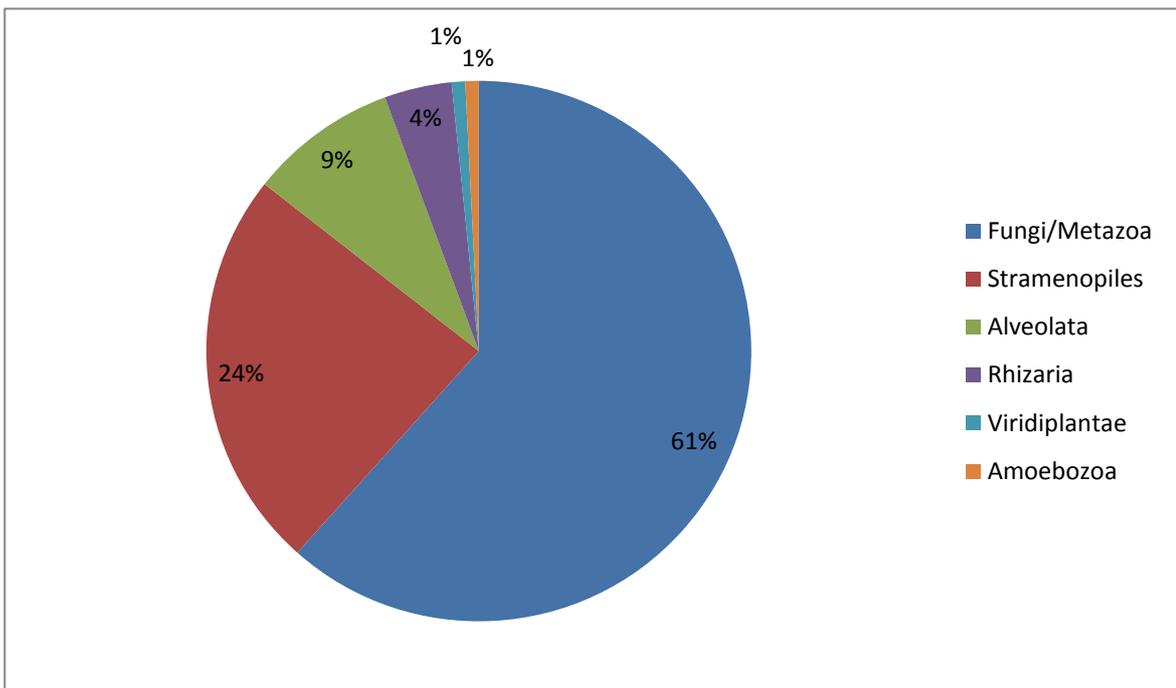


Figura 15: Diagrama circular referente à abundância de sequências de 18S rDNA de microeucariotos no sedimento de manguezal da Restinga da Marambaia, obtidas através da construção de biblioteca de clones.

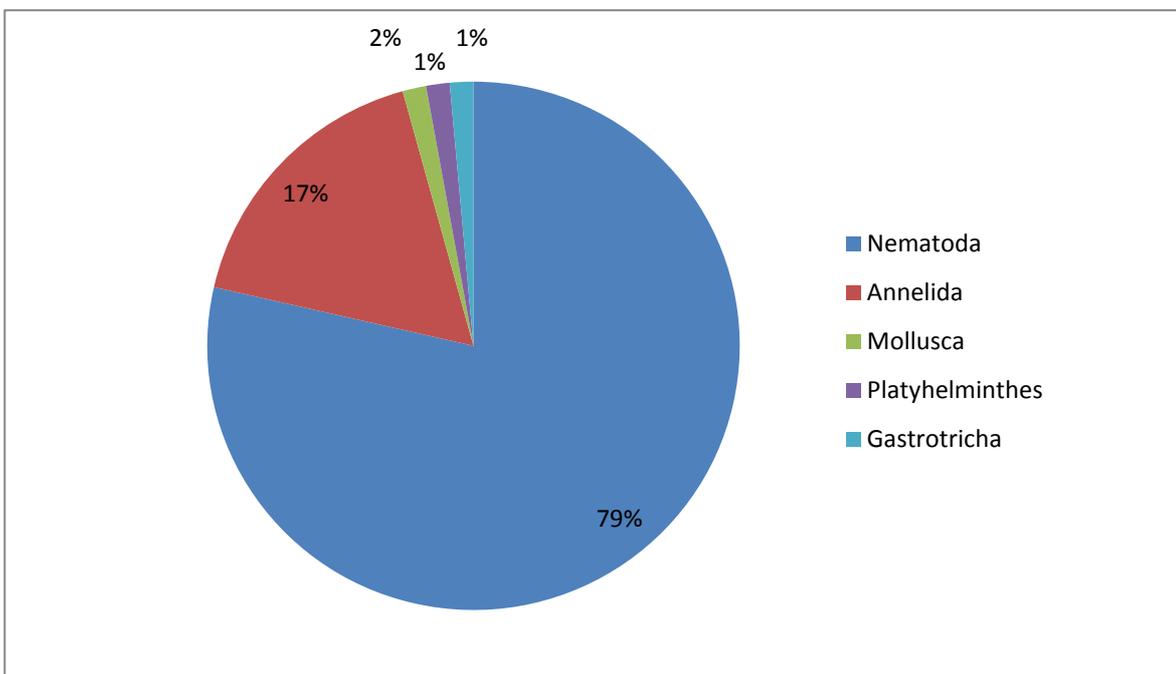


Figura 16: Diagrama circular referente à abundância de sequências de 18S rDNA de microeucariotos no grupo taxonômico Metazoa no sedimento de manguezal da Restinga da Marambaia, obtidas através da construção de biblioteca de clones.

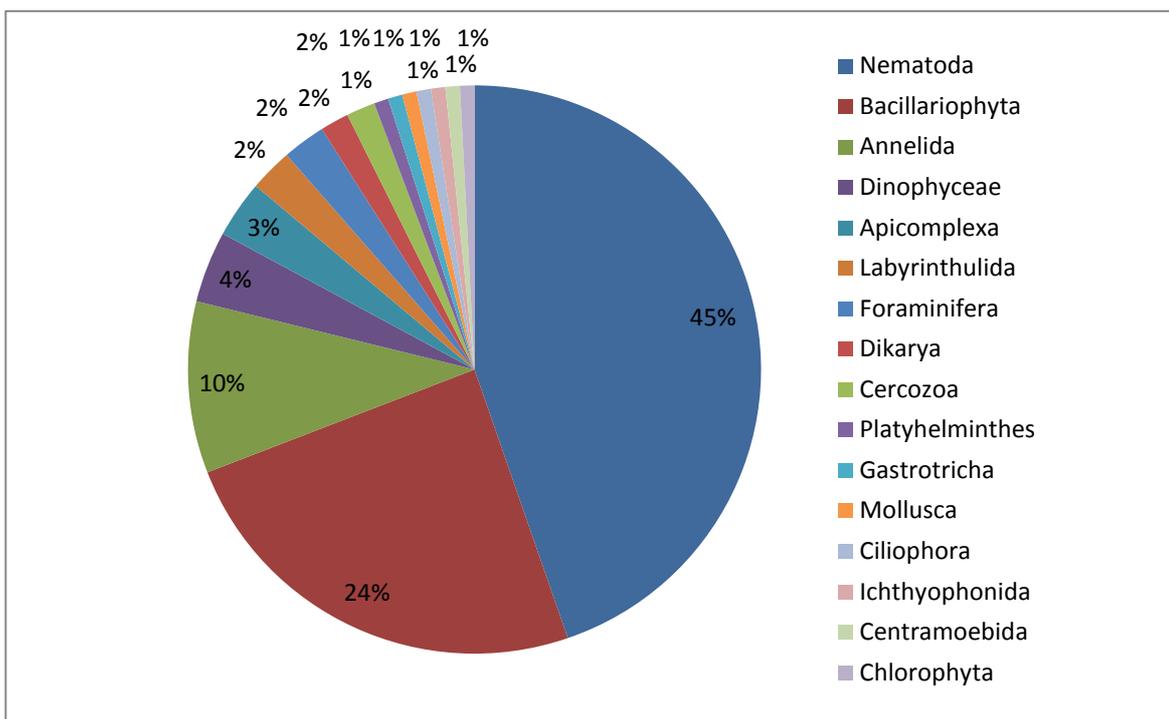


Figura 17: Diagrama circular referente à abundância de seqüências de 18S rDNA de microeucariotos no sedimento de manguezal da Restinga da Marambaia, obtidas através da construção de biblioteca de clones.

6.4 Avaliação do impacto da contaminação por petróleo em microeucariotos

6.4.1 DGGE

Para a análise do impacto ocasionado pelo petróleo, especificamente na comunidade de microeucariotos em manguezal, foram realizadas diversas corridas eletroforéticas em gradiente desnaturante linear variando de 40% a 65% e utilizados conjuntos de iniciadores específicos para eucariotos, Ek7F e EK516R (DÍEZ *et al.*, 2001). Todas as amostras foram estudadas em triplicatas variando com relação ao tempo de contaminação e a porcentagem de óleo adicionada ao sedimento de manguezal. As imagens foram digitalizadas e analisadas através do programa GelCompar utilizando o coeficiente de Dice e o método de aglomeração de Person.

A figura 18 representa o 7º dia após a adição de diferentes porcentagens de petróleo (1%, 2% e 5%), demonstrando o grande impacto ocorrido após apenas uma semana de contaminação. As amostras se dividiram em dois grandes grupos: o primeiro, relativamente homogêneo, com três representantes com 5% de

contaminação e um com 1%; já o segundo grupo é mais heterogêneo e estão presentes todas as outras amostras. Os dois clusters apresentaram apenas 19,3% de similaridade.

As réplicas com maior porcentagem de contaminante, 5% de óleo, destacaram-se das demais, apresentando uma similaridade de apenas 19,3% em relação às outras amostras. O perfil de bandas referente aos microeucariotos das demais percentualidades de petróleo, 1% e 2%, apresentou uma maior semelhança com relação ao controle do que as amostras com 5%, porém esta similaridade também é baixa: duas amostras com 1% e duas com 2% de óleo se agruparam dentro do segundo cluster e apresentaram uma similaridade de 69,9% em relação às réplicas sem a presença de óleo. Uma réplica com 1% de petróleo foi agrupada com as demais amostras com porcentagens semelhantes.

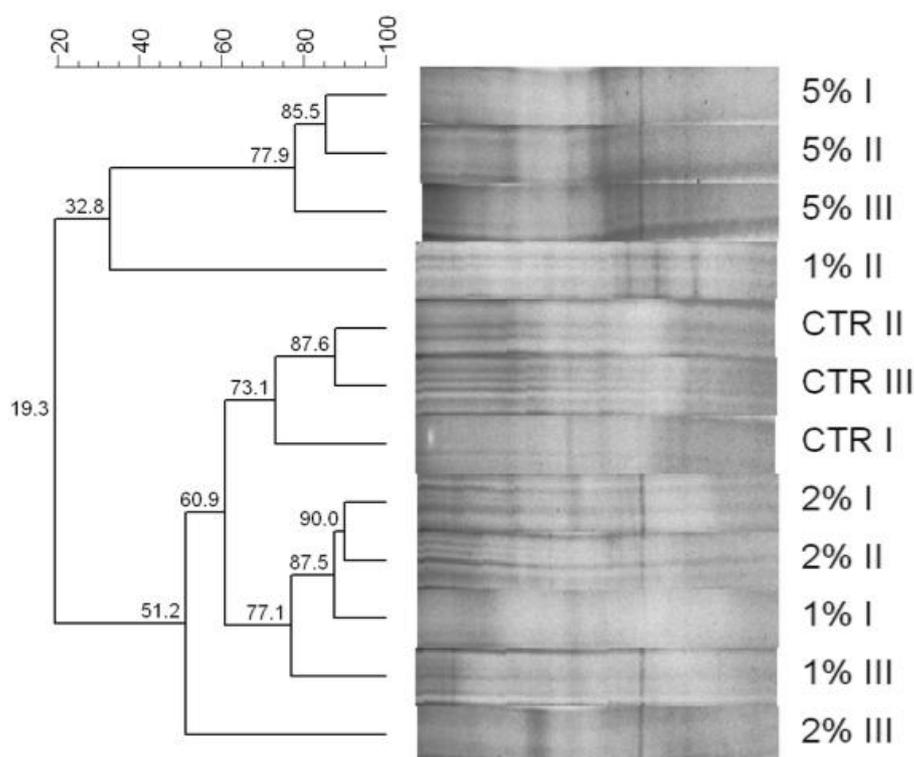


Figura 18: Dendrograma do agrupamento das amostras de manguezal da Restinga da Marambaia com base na separação de amplicons 18S rDNA de microeucariotos através DGGE, após 7 dias de contaminação com petróleo. CTR – Controle sem óleo; 1% - amostras com 1% (v/p) de óleo; 2% - amostras com 2% (v/p) de óleo; 5% - amostras com 5% (v/p) de óleo.

A imagem digitalizada e analisada do DGGE referente ao 23º dia pós-contaminação está representada na figura 19 e mostra uma distância menor entre as amostras com e sem óleo do que a observada após apenas uma semana de contaminação. A proximidade entre as amostras com a presença de petróleo frente às sem o contaminante, exceto a réplica II com 1% de óleo, aumentou de 60,9% para 84,8% de similaridade.

A amostra referente à réplica I com 5% de contaminante destacou-se das demais com uma similaridade de apenas 74,7%. As demais amostras agruparam-se em dois grupos heterogêneos com 78,4% de similaridade. O primeiro é representado pelas amostras do grupo controle e as réplicas com apenas 1 % de óleo, e o segundo é composto pelas amostras com maior porcentagem contaminante, 2% e 5% de óleo. No grupo referente ao controle e as amostras com 1% de óleo, houve uma separação entre esses dois modelos, com uma similaridade de 84,8%. A réplica II com 1%, não se agrupou com as demais de mesma porcentagem, fato similar ao ocorrido no tempo de 7 dias após a contaminação.

No grupo referente às amostras com maior porcentagem de óleo, também foi observado a formação de dois subgrupos com 86,8% de similaridade, sendo um grupo composto pelas amostras referentes às réplicas com 2% de petróleo e outro com as amostras com 5%. O grupo referente à contaminação de 2% mostrou-se mais próximo ao controle, sem óleo, do que as amostras com 5% de contaminante.

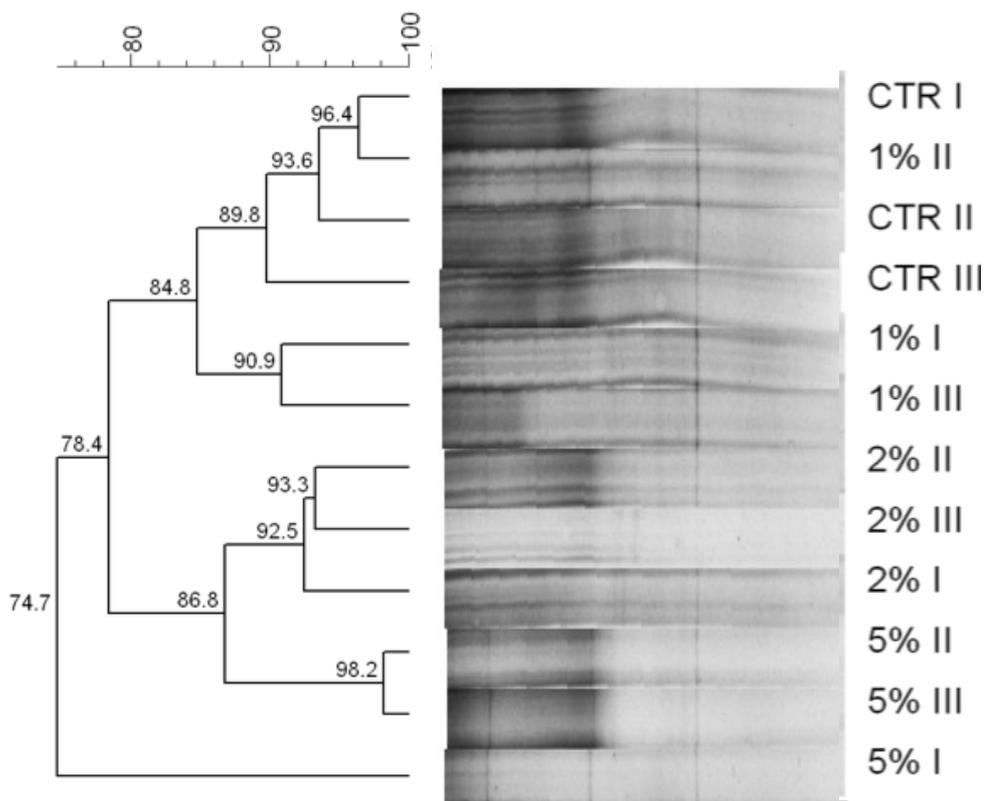


Figura 19: Dendrograma do agrupamento das amostras de manguezal da Restinga da Marambaia com base na separação de amplicons 18S rDNA de microeucariotos através DGGE, após 23 dias de contaminação com petróleo. CTR – Controle sem óleo; 1% - amostras com 1% (v/p) de óleo; 2% - amostras com 2% (v/p) de óleo; 5% - amostras com 5% (v/p) de óleo.

A figura 20 referente ao DGGE dos amplicons de microeucariotos das amostras coletadas após 44 dias de contaminação com hidrocarbonetos de petróleo mostra algumas semelhanças e particularidades frente aos demais tempos. Curiosamente, neste tempo de amostragem as réplicas com maior porcentagem de óleo, exceto a réplica III, demonstraram uma maior proximidade com o controle, sendo a similaridade de 78,8%. A similaridade das amostras com e sem óleo neste período de contaminação foi superior a do 7º dia de contaminação, porém menor do que a do 23º dia, sendo mais próxima do segundo. Todas as réplicas da mesma amostragem, com exceção das réplicas III com 2% e 5% de óleo, se agruparam em grupos distintos. As amostras com 1% de óleo e as com 2% demonstraram uma similaridade de 75,6%.

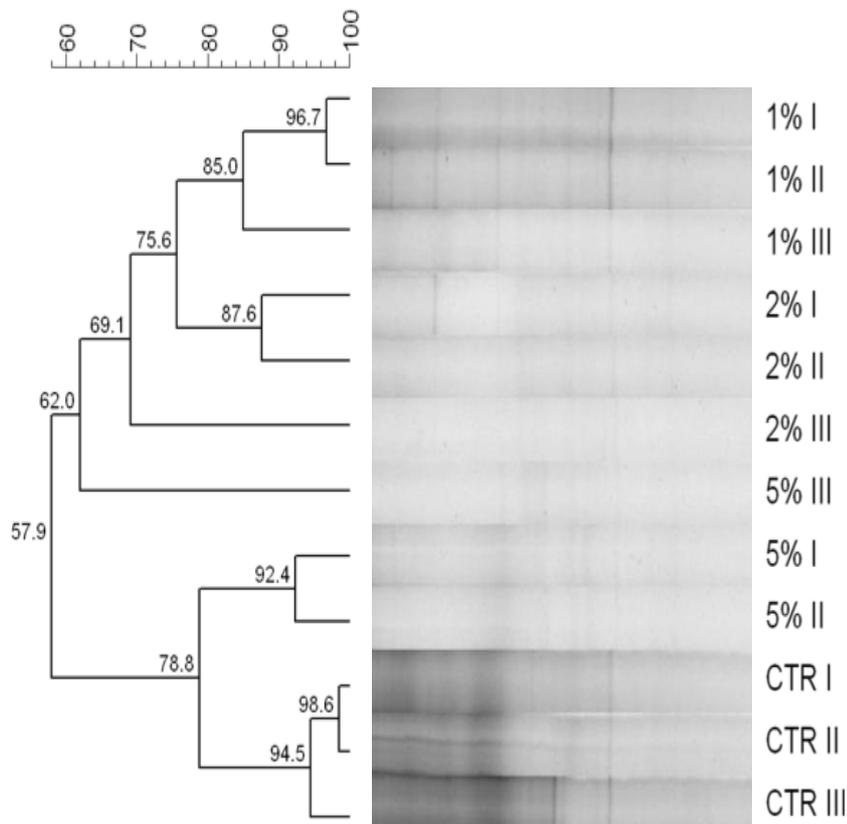


Figura 20: Dendrograma do agrupamento das amostras de manguezal da Restinga da Marambaia com base na separação de amplicons 18S rDNA de microeucariotos através DGGE, após 44 dias de contaminação com petróleo. CTR – Controle sem óleo; 1% - amostras com 1% (v/p) de óleo; 2% - amostras com 2% (v/p) de óleo; 5% - amostras com 5% (v/p) de óleo.

A análise do gel de DGGE referente ao 66º dia após a contaminação revelou uma aproximação maior das amostragens com menor porcentagem de óleo frente às amostras sem a presença deste contaminante. As réplicas referentes a 1% de contaminação apresentaram uma similaridade, consideravelmente alta, com o grupo controle, de aproximadamente 90%. No entanto, as amostras com maior porcentagem de contaminação, 5% de óleo, possuem ainda uma similaridade relativamente baixa, de apenas 48,5%, mesmo após 66 dias do contato com hidrocarbonetos de petróleo. Porém, esta similaridade aumentou significativamente quando comparada às amostras com 7 dias de contaminação.

O dendrograma das amostras referentes ao tempo de 66 dias apresentou uma divisão em dois grandes grupos: um grupo homogêneo formado pelos perfis

obtidos nas amostras com 5% de óleo e outro com as demais amostras, semelhante ao visualizado após uma semana de contaminação (figura 21), porém, como citado anteriormente, as semelhanças entre as amostras sem a presença de óleo e as demais aumentaram.

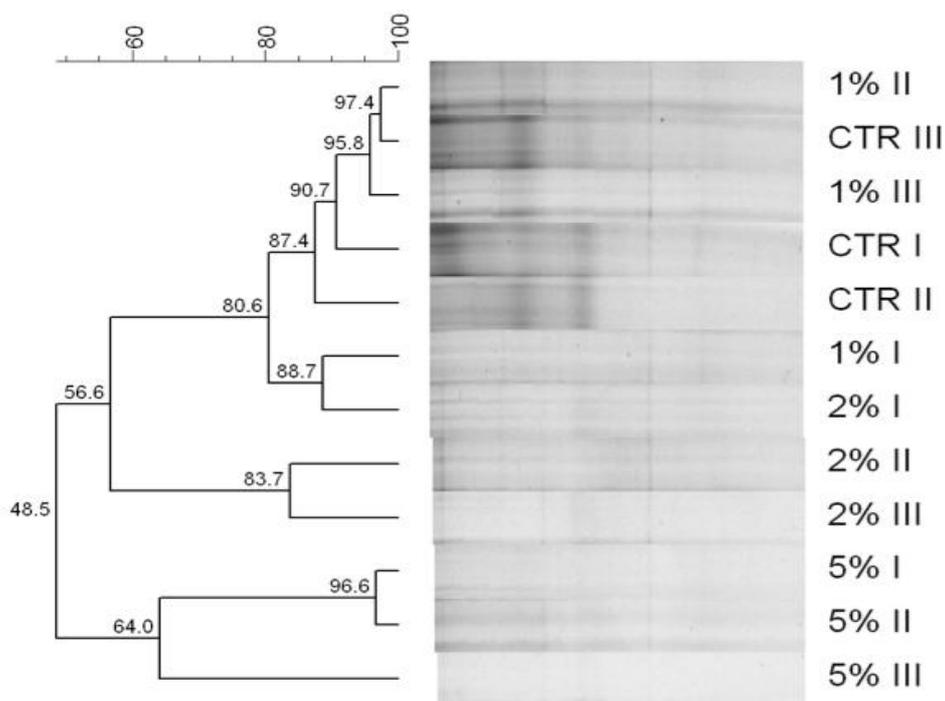


Figura 21: Dendrograma do agrupamento das amostras de manguezal da Restinga da Marambaia com base na separação de amplicons 18S rDNA de microeucariotos através DGGE, após 66 dias de contaminação com petróleo. CTR – Controle sem óleo; 1% - amostras com 1% (v/p) de óleo; 2% - amostras com 2% (v/p) de óleo; 5% - amostras com 5% (v/p) de óleo.

6.4.2 Biblioteca de clones

Para a avaliação do impacto da contaminação por petróleo na comunidade de microeucariotos do sedimento de manguezal foram realizadas análises filogenética das seqüências obtidas por PCR baseadas no gene que codifica o 18S rRNA. Para tal três bibliotecas de clones foram construídas com os produtos de PCR extraídos das amostras T0 (tempo zero sem contaminação), T23 2% (23º dia de contaminação com 2% de óleo), T66 2% (66º dia de contaminação com 2% de óleo). O índice de

cobertura das três bibliotecas obtidas neste estudo cobriu de 80 a 87% da diversidade total (tabela 7).

O impacto na diversidade de microeucariotos foi medida pelo índice de Shannon, que demonstrou uma diminuição da diversidade nas amostras com a presença de óleo, sendo a redução mais elevada no tempo de 23 dias. O índice de Shannon no T0 era de 3,19, caindo para 2,05 no T23 2% apresentando novo aumento com passar do tempo, chegando a 2,89 na amostra T66 2% (tabela 7). A estimativa de riqueza de espécies medida pelos estimadores ACE e Chao 1, parece tender a seguir ao visualizado no índice de diversidade de Shannon, quando comparada as amostras T0 e T23 2%, porém com a análise desses indicadores os valores de T66 2% se aproximando mais dos obtidos nas amostras T23 2% (figuras 22 e 23).

Table 7: Estimativa de riqueza de OTUs, índice de diversidade e estimativa de cobertura das amostras de pirosequenciamento do 18S rRNA.

Biblioteca	NS ^a	OTUs ^b	Estimadores de Riqueza de OTUs		Shannon ^e	ESC ^f
			ACE ^c	Chao1 ^d		
0	125	46	97 (68; 164)	69 (55; 107)	3.19 (2.96; 3.42)	0.80
23	91	20	47 (28; 116)	37 (25; 84)	2.05 (1.77; 2.32)	0.87
60	87	32	51 (39; 86)	42 (35; 64)	2.89 (2.62; 3.16)	0.83

a Número de seqüências de cada amostra.

b Calculado com DOTUR com 3% distancia.

c, d média (mínimo; máximo)

e Índice de diversidade de Shannon calculado com DOTUR (distância de 3%)

f Seqüências únicas e n é o número total de seqüências

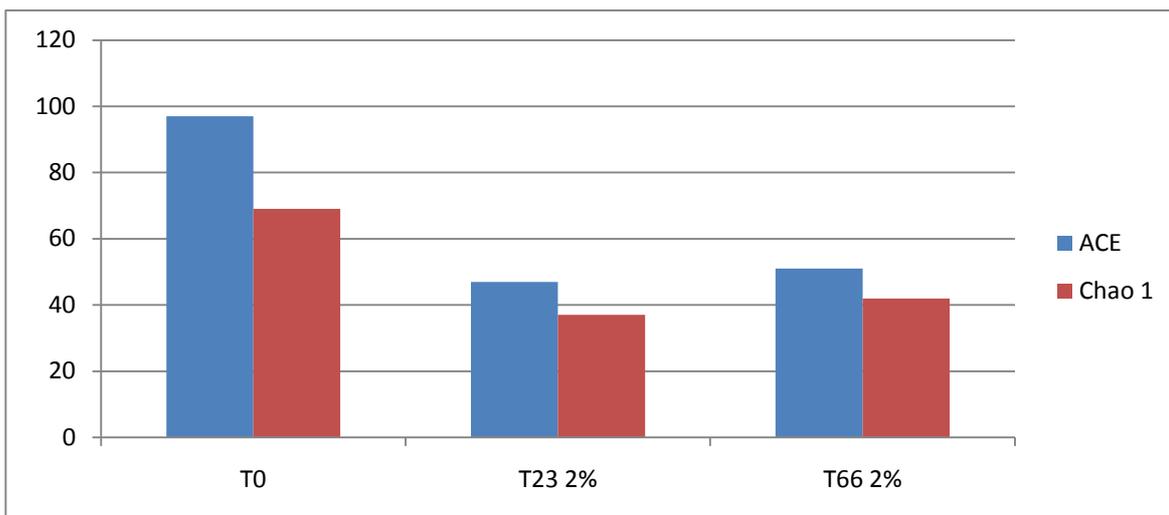


Figura 22: Riqueza de UTOs de microeucariotos estimada por ACE e Chao 1. T0 – Tempo antes da contaminação; T23 – 23º dia sem contaminação; T23 2% - 23º dia após a contaminação com 2% (v/p) de petróleo; T23 5% - 23º dia após a contaminação com 5% (v/p) de petróleo; T66 2% - 66º dia após a contaminação com 2% (v/p) de petróleo.

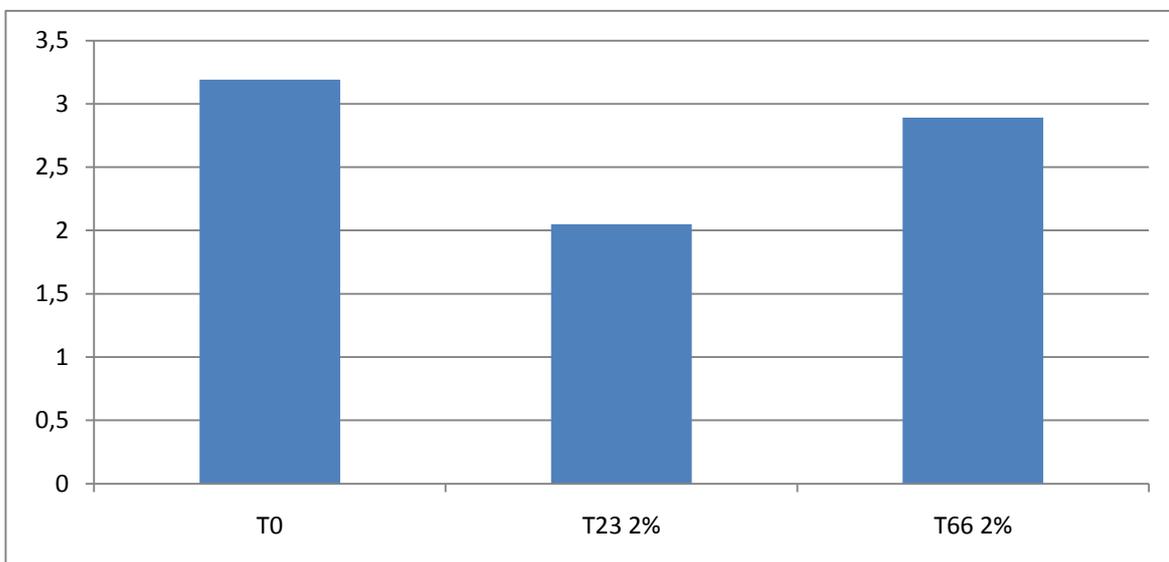


Figura 23: Diversidade de microeucariotos medida pelo índice de Shannon. T0 – Tempo antes da contaminação; T23 – 23º dia sem contaminação; T23 2% - 23º dia após a contaminação com 2% (v/p) de petróleo; T23 5% - 23º dia após a contaminação com 5% (v/p) de petróleo; T66 2% - 66º dia após a contaminação com 2% (v/p) de petróleo.

A tabela 8 mostra a possível afiliação filogenética das sequências e as respectivas sequências mais similares encontradas no NCBI das três amostras estudadas, possibilitando assim descrever quais indivíduos e grupos filogenéticos são mais sensíveis ou estimulados pela presença de hidrocarbonetos de petróleo. Como dito anteriormente, as afiliações filogenéticas dentro do domínio Eukarya não são bem definidas. Baseando-se nisso, a figura 24 demonstra o impacto da contaminação por petróleo nos maiores grupos taxonômicos, de acordo com o descrito no NCBI. O grupo Fungi/Metazoa que dominava a comunidade de microeucariotos com uma abundância de 70% antes da contaminação, mostrou-se sensível a contaminação, representando apenas 16% da comunidade estudada nas amostras após 23 dias de contaminação e para apenas 11% após 66 dias de exposição ao óleo (2%). Ainda na figura 24 é visualizado um aumento bastante expressivo do grupo Stramenopila, principalmente na amostra com menor tempo de contato com óleo (T23 2%), passando a ser o grupo de maior porcentagem após a contaminação, aumentando de 25% no T0, para 71% na amostra T23 2% e 61% na T66 2%.

Buscando visualizar de maneira mais aprofundada o impacto do petróleo, a figura 25 revela as alterações ocorridas no que seria os filos referentes às sequências das três amostras estudadas. O gráfico gerado demonstra uma variação na predominância desses grupos filogenéticos, revelando uma grande sensibilidade do grupo Nematoda (nematódeos) ao petróleo, ao contrário do grupo Bacillariophyta (diatomáceas) que demonstrou uma grande abundância tanto antes como após a contaminação, sendo um pouco maior nas amostras com óleo, principalmente após 66 dias de contaminação a 2%. Curiosamente, o grupo Bicosoecida, apareceu em grande número apenas na amostra contaminada com 2% de óleo, 23 dias após a contaminação.

A figura 25 e a tabela 8 revelam os micro-organismos desses grupos filogenéticos que aumentaram após a contaminação. *Bacillariophyta* sp., pertencente aos grupos taxonômicos Bacillariophyta e Stramenopila, foi o representante de ambos os grupos que dominavam as amostras após a contaminação, pois houve um elevado aumento no número de sequências desse gênero após a adição do óleo, passando de zero na amostra T0 para 33 e 37 nas amostras T23 2% e T66 2%, respectivamente, o que corresponde a 32,4% e 43,5% do total das sequências

obtidas nas amostras contaminadas. O micro-organismo do grupo Bisoecida que apresentou dominância na comunidade é a espécie *Cafeteria minima*, também pertencente ao grupo Stramenopila. Esta espécie demonstrou uma resposta curiosa à contaminação, com um aumento que atingiu 37,3% da diversidade de microeucariotos na amostra T23 2% e apenas 2,35% na amostra T66 5%, revelando uma redução de sua abundância com o passar do tempo de exposição do óleo no sedimento de manguezal.

As espécies que demonstraram a maior sensibilidade após a adição do óleo são referentes aos gêneros *Minutocellus* e *Neochromadora* que possuíam uma abundância de 17,2% e 25,4% respectivamente na amostra referente ao tempo zero, caindo para 1% e zero, após a adição de óleo (figura 25).

O agrupamento das afiliações filogenética das sequências e as respectivas sequências mais similares encontradas no NCBI, das três amostras estudadas são demonstradas na árvore filogenética representada na figura 26, onde pode ser observada uma grande predominância de amostras do tempo zero agrupadas no grupo Fungi/Metazoa. Nas amostras referentes ao grupo Stramenopila é visualizado um agrupamento de *Bacillariophyta* sp. com apenas as UTOs das amostras contaminadas (T23 e T66). A espécie de referência *Cafeteria minima* se agrupou com as suas respectivas sequências das amostras dos tempos 23 e 66, e curiosamente não se agrupou com as demais sequências do grupo Stramenopila. O grupo Amebozoa está representado por apenas uma UTO referente ao T0 e os demais grupos: Rhizaria, Viridiplantae e Alveolata apresentaram sequências das três amostras estudadas.

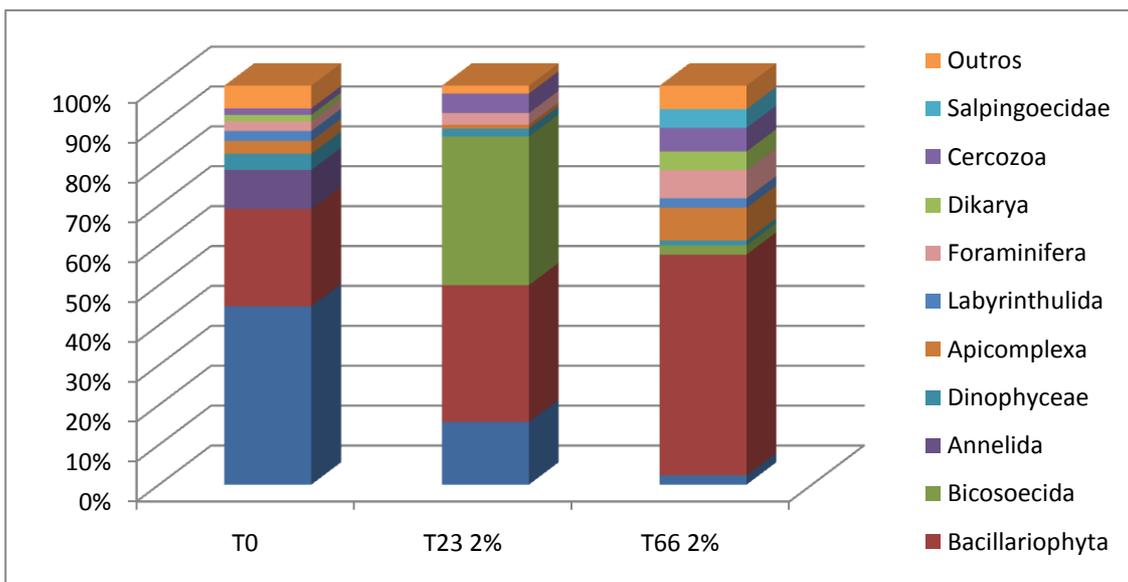


Figura 24: Porcentagem dos grupos filogenéticos de microeucariotos que aparecem por segundo no NCBI antes e após a contaminação. T0 - antes da contaminação; T23 2% - 23º dia após a contaminação com 2% (v/p); T66 2% - 66º dia após a contaminação com 2% (v/p).

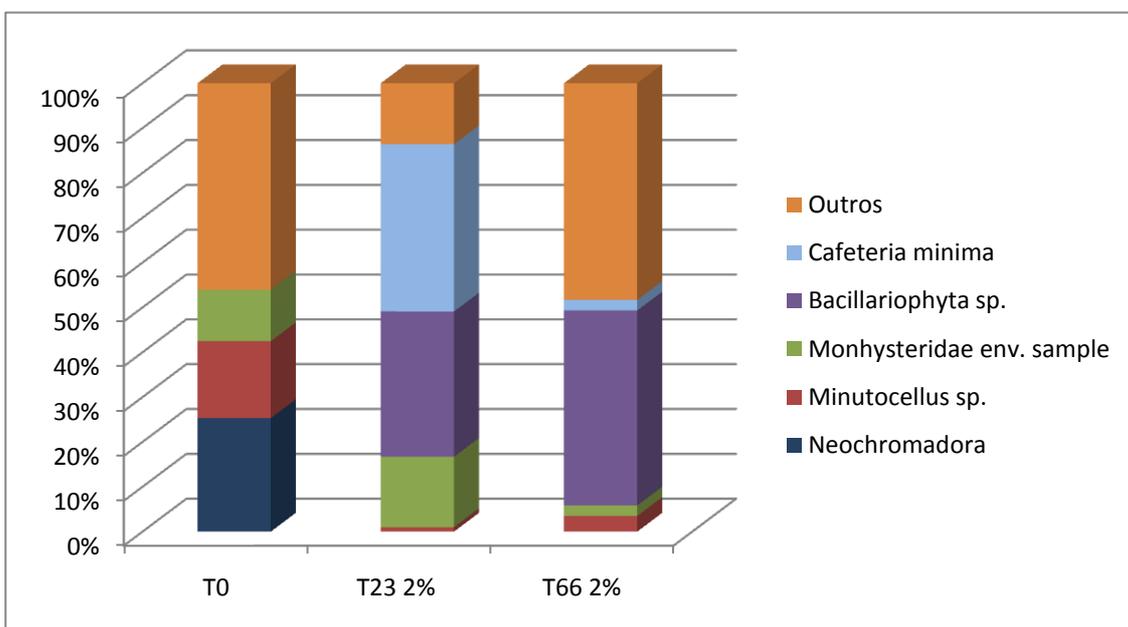


Figura 25: Porcentagem das respectivas sequências mais silmiliares de microeucariotos encontradas no NCBI antes e após a contaminação. T0 - antes da contaminação; T23 2% - 23º dia após a contaminação com 2% (v/p); T66 2% - 66º dia após a contaminação com 2% (v/p).

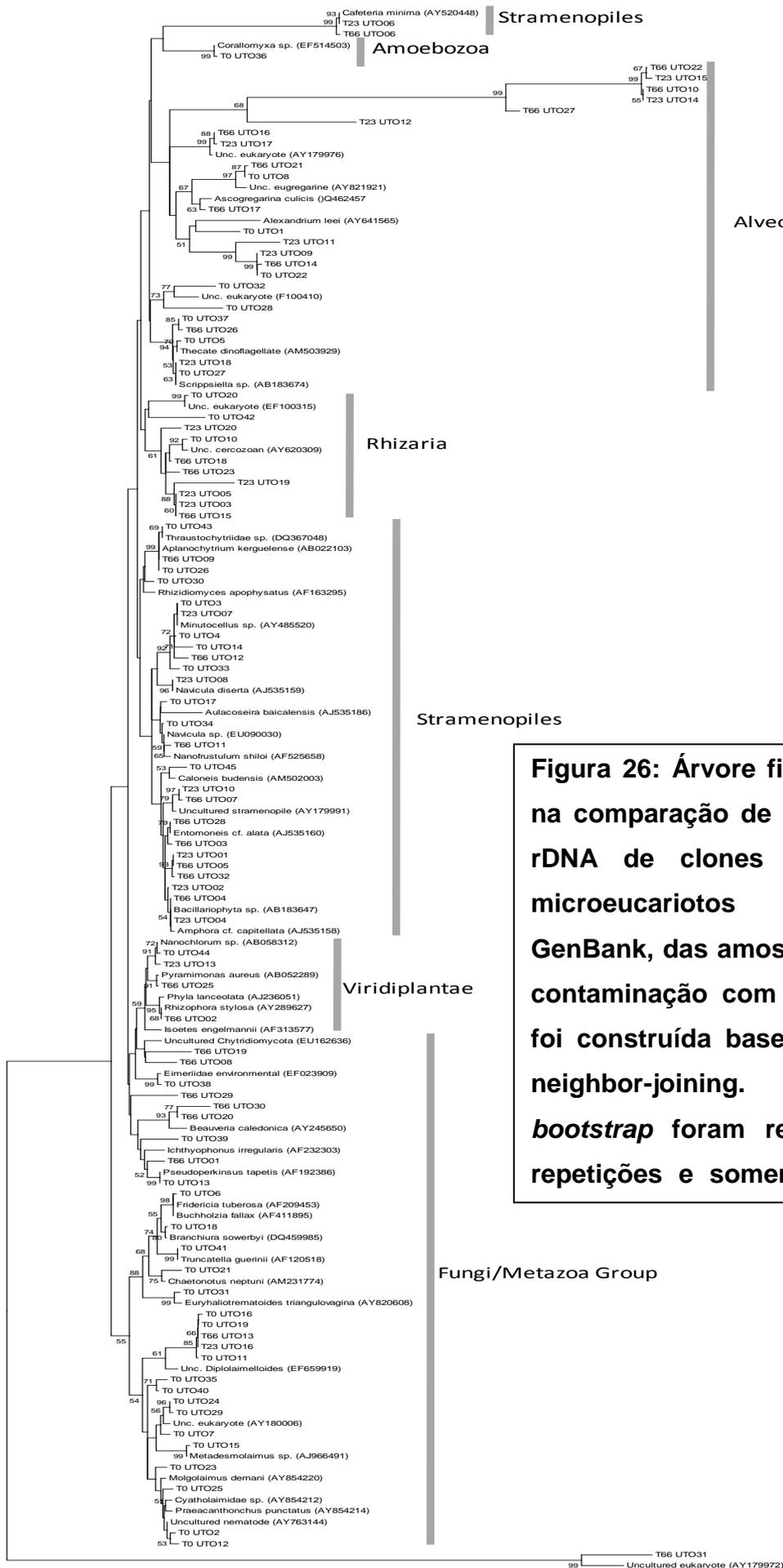


Figura 26: Árvore filogenética baseada na comparação de sequências do 18S rDNA de clones e sequências de microeucariotos provenientes do GenBank, das amostras antes e após a contaminação com petróleo. A árvore foi construída baseada no método de neighbor-joining. As análises de *bootstrap* foram realizadas com 100 repetições e somente são mostrados

Tabela 8: Afiliações filogenéticas das sequências de rDNA 18S de microeucariotos encontrados em sedimento do manguezal da Restinga da Marambaia. T0 - sem contaminação; T23 2% - 23º dia após a contaminação com 2% (v/p) de petróleo; T66 2% - 66º dia após a contaminação com 2% (v/p) de petróleo.

<i>Afiliação filogenética</i>	<i>Espécie ou cepa (nº de acesso)</i>	<i>Sim. (%)</i>	<i>Espécie ou cepa (nº de acesso)</i>	<i>Sim. (%)</i>	T0	T23 2%	T66 2%
Fungi/Metazoa							
Ichthyophonida	Pseudoperkinsus tapetis (AF192386)	99	Pseudoperkinsus tapetis (AF192386)	99	0,8	-	-
	Dermocystidium sp.(AF533950.1)	83	Dermocystidium sp.(AF533950.1)	83	1	-	1,2
Choanoflagellida	Salpingoeca urceolata (EU011931.1)	93	Salpingoeca urceolata (EU011931.1)	93	-	-	4,7
Fungi							
Dikarya	Melanops tulasnei (FJ824761)	83	Uncultured eukaryote		1,6	-	-
	Graphioloa phoenicis (GRAJCMCA)	83	Uncultured eukaryote (EF100410)		0,8	-	-
	Trichosporon lignicola(DQ836003.2)	90	Trichosporon lignicola(DQ836003.2)	90	-	-	1,2
	Eutypa lata. (DQ836896.1)	99	Eutypa lata (DQ836896.1)	99	-	-	2,35
Metazoa							
Nematoda	Paracyatholaimus intermedius (FJ969133)	97	Paracyatholaimus intermedius (FJ969133)	97	1,6	-	-
	Monhysteridae environmental sample(GQ921338.1)	94-95	Monhysteridae environmental sample(GQ921338.1)	94-95	11,5	15,7	2,35
	Daptonema normandicum (AY854224)	91-92	Uncultured eukaryote (AY180006)	92-93	3,3	-	-
	Calomicrolaimus sp.(AY854219.1)		Uncultured eukaryote(GU072521.1)		0,8	-	-
	Ptycholaimellus sp. (FJ040472)	99	Ptycholaimellus sp. (FJ040472)	99	2,5	-	-
	Neochromadora (AY854210)	92-97	Neochromadora (AY854210)	92-97	25,4	-	-
Annelida	Grania variochaeta (AY365459)	91	Uncultured eukaryote (FN393344.1)	92	7,3	-	-
	Heterodrilus minisetosus (AF411885)	98	Heterodrilus minisetosus (AF411885)	98	1,6	-	-
	Daptonema setosum (AY854226)	98	Daptonema setosum (AY854226)	98	0,8	-	-
Platyhelminthes	Pseudohaliotrema sphincteroporos (AJ287568)	92	Pseudohaliotrema sphincteroporos (AJ287568)	92	0,8	-	-
Gastrotricha	Chaetonotus neptuni (AM231774)	94	Chaetonotus neptuni (AM231774)	94	0,8	-	-
Mollusca	Ilyanassa obsoleta (AY145379)	97	Ilyanassa obsoleta (AY145379)	97	0,8	-	-
Stramenopiles							
Bacillariophyta	Licmophora flabellata (EF423409)	89	Uncultured marine eukaryote (EF527077)	99	0,8	-	-
	cf. Minutocellus sp. (AY485520)	88-97	cf. Minutocellus sp. (AY485520)	88-100	17,2	1	3,5
	Navicula tripunctata (AM502028)	96	Uncultured stramenopile (AY179995)	98	1,6	-	-
	Aplanochytrium sp. (DQ367045)	100	Aplanochytrium sp. (DQ367045)	100	0,8	-	-
	Nitzschia longíssima (AY881968)	99	Nitzschia longíssima (AY881968)	99	0,8	-	-
	Pinnularia rupestris (AM501992)	93	Pinnularia rupestris (AM501992)	93	0,8	-	-
	Bacillariophyta sp. (AB183647.1)	92-100	Bacillariophyta sp. (AB183647.1)	92-100	-	32,4	43,5
	Navicula diserta (AJ535159.1)	98	Navicula diserta (AJ535159.1)	98	-	1	-
	Staurosira sp. (EF465491.1)	97	Staurosira sp. (EF465491.1)	97	-	-	1,2
	Entomoneis cf. alata (AJ535160.1)	97-98	Entomoneis cf. alata (AJ535160.1)	97-98	-	-	4,7
	Amphora Montana(AJ243061.1)	93-94	Amphora Montana(AJ243061.1)	93-94	-	-	2,35
Bicosoecida	Cafeteria minima (AY520449.1)	98-99	Cafeteria minima (AY520449.1)	98-99	-	37,3	2,35

Tabela 8 (continuação): Afiliações filogenéticas das sequências de rDNA 18S de microeucariotos encontrados em sedimento do manguezal da Restinga da Marambaia.T0 - sem contaminação; T23 2% - 23º dia após a contaminação com 2% (v/p) de petróleo; T66 2% - 66º dia após a contaminação com 2% (v/p) de petróleo.

<i>Afiliação filogenética</i>	<i>Espécie ou cepa (no de acesso)</i>	<i>Sim</i>	<i>Espécie ou cepa (no de acesso)</i>	<i>Sim</i>	<i>T0</i>	<i>T23</i>	<i>T66</i>
	(%)			(%)		2%	2%
Labyrinthulida	Oblongichytrium sp. (FJ799795)	81	Oblongichytrium sp. (FJ799795)	81	1,6	-	-
	Thraustochytriidae sp. (DQ367048)	98	Thraustochytriidae sp. (DQ367048)	98	0,8	-	-
	Aplanochytrium stochinoi(AJ519935.1)	99	Uncultured labyrinthulid(FJ800649.1)	100	-	-	2,35
Alveolata							
Dinophyceae	Thecate dinoflagellate (AM503929)	99	Thecate dinoflagellate (AM503929)	99	0,8	-	-
	Scrippsiella sp. (AB183677)	99-100	Scrippsiella sp. (AB183677)	99-100	1,6	1,9	-
	Warnowia sp. (FJ947040)	97	Uncultured eukaryote (AY664893)	98	1,6	-	-
	Warnowia sp.(FJ947040.1)	98	Warnowia sp.(FJ947040.1)	98	-	-	1,2
Ciliophora	Varistrombidium sp. (DQ811090)	97	Uncultured eukaryote (EU371395)	98	0,8	-	-
Apicomplexa	Eimeriidae (EF023909)	98	Eimeriidae (EF023909)	98	0,8	-	-
	Selenidium orientale(FJ832161)	80	Selenidium orientale(FJ832161)	80	1,6	-	-
	Cryptosporidiidae (EF024471)	91	Cryptosporidiidae (EF024471)	91	1,6	-	2,35
	Eimeriidae environmental (EF024503.1)	88	Eimeriidae environmental (EF024503.1)	88	-	-	2,35
	Babesia felis (AY452698.1)	82	Uncultured eukaryote (AY179976.1)	95-96	-	1	1,2
Perkinsea	Ascogregarina culicis(DQ462457.1)	91	Ascogregarina culicis(DQ462457.1)	91			2,35
	Perkinsus sp (AF042708.1)	93	Uncultured eukaryote (EF100310.1)	91	-	1	-
Rhizaria							
Cercozoa	Protaspis obliqua (FJ824122)	87	Uncultured cercozoan (AY620309)		1,6	-	-
	Protaspis sp. (FJ824125.1)	98	Protaspis sp. (FJ824125.1)	98	-	-	2,35
	Cercozoa sp. (FJ824126.1)	84-93	Cercozoa sp. (FJ824126.1)	84-93	-	1,9	-
	Cercozoa sp. (FJ824126.1)	92-95	Uncultured marine cercozoan (FN598348.1)	98-99	-	1,9	3,5
	Massisteria marina (AF174370.1)	98	Massisteria marina (AF174370.1)	98	-	1	-
Foraminifera	Ammonia beccarii (U07937)	85	Uncultured eukaryote (EF100335)	86-87	2,5	2,9	7,1
Amoebozoa							
Centramoebida	Corallomyxa sp. (EF514503)	97	Corallomyxa sp. (EF514503)	97	0,8	-	-
Viridiplantae							
Chlorophyta	Nannochloris sp. (AB183585)	99	Nannochloris sp. (AB183585)	99	0,8	1	-
Streptophyta	Pyramimonas aureus(AB052289.1)	98	Pyramimonas aureus(AB052289.1)	98	-	-	1,2
	Carallia brachiata (FJ707525.1)	99	Carallia brachiata (FJ707525.1)	99	-	-	3,5

6.4.3 Análise filogenética das bandas de DGGE

Para a avaliação filogenética, algumas bandas de DGGE foram selecionadas para serem recortadas, amplificadas e posteriormente sequenciadas, sendo então comparadas com as sequências depositadas no NCBI. O critério de seleção foi estar presente apenas nas amostras contaminadas com petróleo, apenas nas amostras sem contaminação ou em todas as amostras com e sem o contaminante.

A figura 27 demonstra o gel de DGGE onde foram recortadas apenas duas bandas, estando uma presente em todas as amostras, com e sem contaminação (banda A), e a outra apenas no tempo de 41 dias sem contaminação (banda B). Ambas as bandas selecionadas são mais próximas de microeucariotos pertencentes ao grupo filogenético Nematoda. A espécie de referência relacionada à banda encontrada apenas na amostra de maior tempo e sem contaminação (T41, banda B) é do gênero *Neochromadora* (tabela 9), o mesmo que demonstrou maior abundância nas amostras de tempo zero sem contaminação, pelos resultados gerados na biblioteca de clones (tabela 8).

A figura 28 revela três bandas encontradas apenas nas amostras contaminadas com óleo, sendo a banda E do grupo Nematoda e as bandas C e D pertencentes ao grupo filogenético Bacillariophyta (tabela 10), o mesmo que predominou após a contaminação com petróleo, pelos resultados revelados na biblioteca de clones (tabela 8). Já a figura 29 demonstrou que as sequências das bandas presentes apenas nas amostras sem óleo (bandas G e H) são mais próximas de microeucariotos pertencentes ao grupo filogenético Nematoda (tabela 11). A banda I parece estar presente apenas nas amostras contaminadas e sua afiliação taxonômica também é pertencente ao grupo Nematoda, porém o gênero é diferente das demais sequências encontradas. A banda F presente apenas nas amostras com óleo, é um ciliado relatado em solo contaminado com hidrocarboneto de petróleo (LARA *et al.*, 2007), e é visualizada em maior intensidade no menor tempo de contaminação (T43 2%) e ainda parece desaparecer nas amostras com 66 dias e com uma concentração maior de óleo (T66 5%).

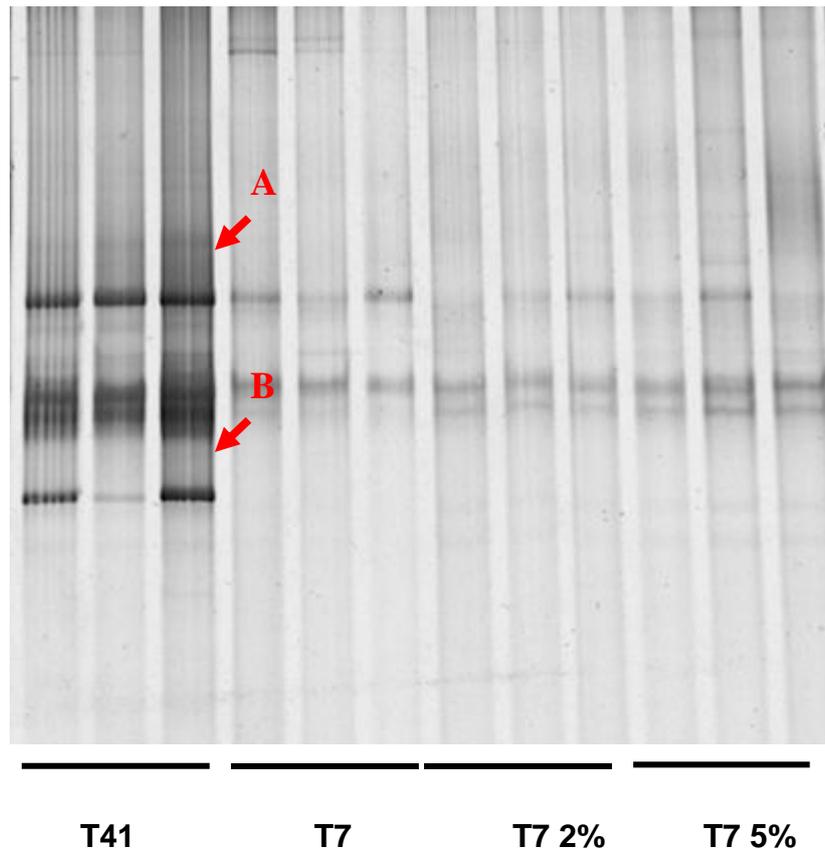


Figura 27: Gel de DGGE demonstrando as bandas recortadas e sequenciadas. T41 – 41 dias sem contaminação com petróleo; T7 - 7 dias sem contaminação com petróleo; T7 2% - 7 dias com 2% de contaminação com petróleo; T7 5% - 7 dias com 5% de contaminação com petróleo.

Tabela 9: Afiliações filogenéticas das sequências das bandas recortadas do gel de DGGE.

<i>Bandas</i>	<i>Afiliação filogenética</i>	<i>Espécie ou estirpe mais próximo (nº de acesso)</i>	<i>Sim. (%)</i>	<i>Local anteriormente encontrados</i>
A	Metazoa Nematoda	Nematoda não cultivado (EU910601)	79%	
B	Metazoa Nematoda	<i>Neochromadora</i> (AY854210.1)	81%	

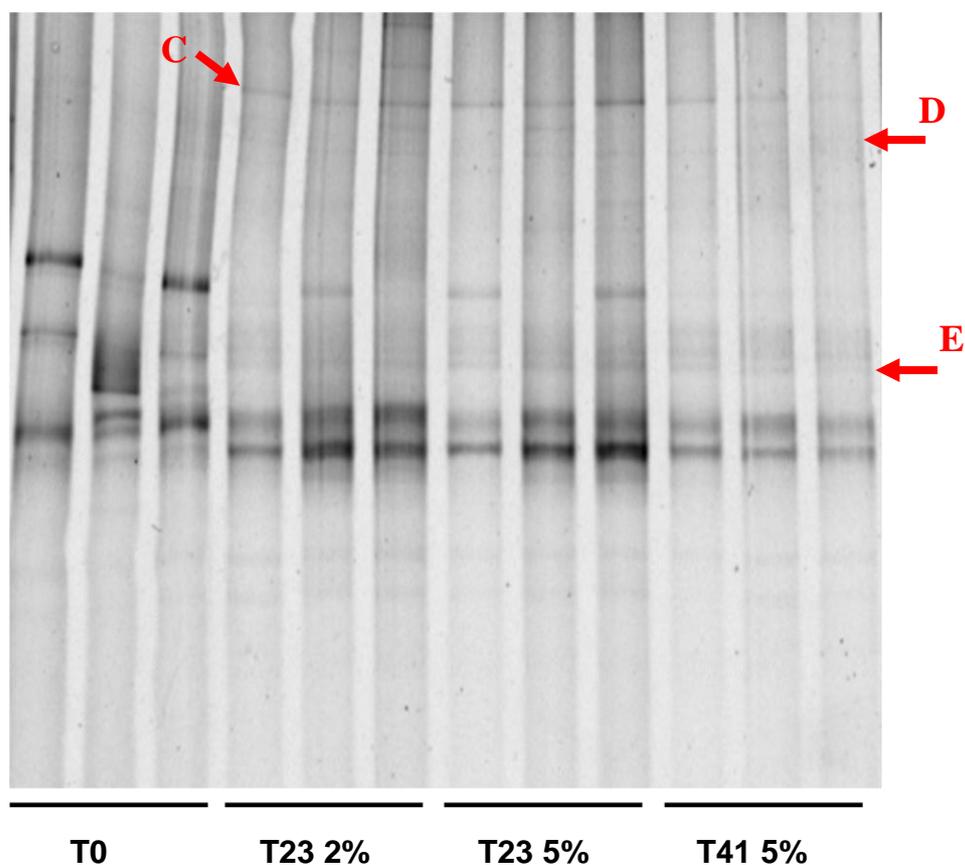


Figura 28: Gel de DGGE demonstrando as bandas recortadas e sequenciadas. T0 – tempo zero, sem contaminação com petróleo; T23 2% - 23 dias com 2% de contaminação com petróleo; T23 5% - 23 dias com 5% de contaminação com petróleo; T41 5% - 66 dias com 5% de contaminação com petróleo.

Tabela 10: Afiliações filogenéticas das sequências das bandas recortadas do gel de DGGE.

Bandas	Afiliação filogenética	Espécie ou estirpe mais próximo (nº de acesso)	Sim. (%)	Local anteriormente encontrados
C	Stramenopiles Bacillariophyta	<i>Amphora Montana</i> (AJ243061)	96%	Microalga ambientes marinhos
D	Stramenopiles Bacillariophyta	<i>Amphora sp.</i> (AB183590)	97%	Microalga ambientes marinhos
E	Metazoa Nematoda	<i>Neochromadora</i> (AY854210.1)	85%	

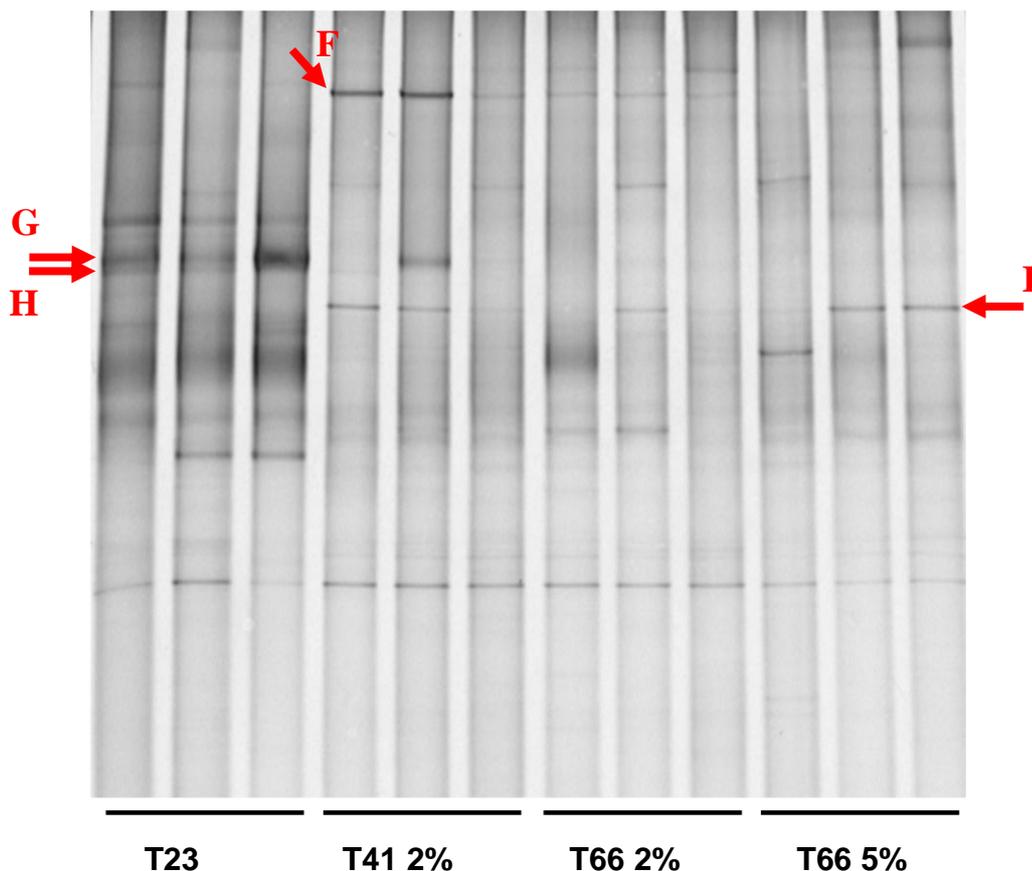


Figura 29: Gel de DGGE demonstrando as bandas recortadas e sequenciadas. T23 – 23 dias sem contaminação com petróleo; T41 2% - 41 dias com 2% de contaminação com petróleo; T66 2% - 66 dias com 2% de contaminação com petróleo; T66 5% - 66 dias com 5% de contaminação com petróleo.

Tabela 11: Afiliações filogenéticas das sequências das bandas recortadas do gel de DGGE.

Bandas	Afiliação filogenética	Espécie ou estirpe mais próximo (nº de acesso)	Sim. (%)	Local anteriormente encontrados
F	Alveolata Ciliophora	Ciliado não cultivado (DQ115950)	74%	Solo contaminado com HPA
G	Metazoa Nematoda	<i>Laxus oneistus</i> (Y16919)	87%	Domina a fauna de areia rasa em barreiras de corais de Beliza
H	Metazoa Nematoda	Diplolaimelloides environmental sample (EF659926)	79%	Ambientes salinos
I	Metazoa Nematoda	<i>Eubostrichus topiarius</i> (Y16917)	87%	Areia em maré baixa do mar Adriático

Ao final do experimento, aproximadamente dois meses após a contaminação, os microcosmos que receberam óleo demonstraram características diferentes dos não contaminados, apresentando um crescimento microbiano visível de coloração esverdeada, e ainda, os sistemas que apresentavam maior porcentagem de hidrocarbonetos de petróleo demonstraram um crescimento mais evidente (Figura 30).



Figura 30: Microcosmo contendo sedimento do manguezal da Restinga da Marambaia contaminado com 5% de óleo, onde foi observado um crescimento microbiano de coloração esverdeada (A); e microcosmo não contaminado (B).

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou o impacto da contaminação por hidrocarbonetos de petróleo na estrutura da comunidade bacteriana e de microeucariotos em sedimento de manguezal proveniente da Restinga da Marambaia, possibilitando assim sugerir possíveis alvos para o biomonitoramento da presença de petróleo e gerar conhecimento a respeito das alterações ocorridas nesse ecossistema, com o objetivo de auxiliar as estratégias de biorremediação e bioprospecção.

O impacto do petróleo na comunidade bacteriana foi avaliado pela técnica de pirosequenciamento. Embora, a utilização desta técnica para avaliação da diversidade microbiana em ambientes naturais venha sendo gradativamente mais utilizada, o conhecimento da estrutura da comunidade bacteriana do ecossistema manguezal ainda é largamente baseada nos estudos dependentes de cultivo (HOLGUIN, VAZQUEZ & BASHAN, 2001; KUMAR, HATHA & CHRISTI, 2007) e da análise de bibliotecas de clones do gene que codifica a subunidade 16S rRNA (CURY, 2006; LIANG *et al.*, 2007; CASTINE *et al.*, 2009), que trabalham com um número reduzido de sequências se comparado ao pirosequenciamento, até o momento não existe nenhum trabalho disponível na literatura que utilize essa abordagem em amostras de manguezal .

A técnica de pirosequenciamento desenvolvida no presente trabalho possibilitou ampliar o conhecimento a respeito da comunidade bacteriana das florestas de mangue, demonstrando que esse ecossistema abriga uma grande diversidade bacteriana. Foram visualizados 22 filos do domínio Bacteria e a estimativa de riqueza de espécies foi em torno de 2.000.

Como relatado em alguns trabalhos anteriores, a predominância neste ecossistema é em geral representada pelo filo Proteobacteria (CURY, 2006; LIANG *et al.*, 2007, CASTINE *et al.* 2009). Porém, dentro deste filo a porcentagem de cada classe varia em relação ao manguezal estudado. Na floresta de mangue da Ilha Hinchinbrook em Queensland, Austrália, o filo Proteobacteria demonstrou ser quase que na sua totalidade dominado pelas classes Gammaproteobacteria e Deltaproteobacteria (CASTINE *et al.*, 2009), o mesmo foi visualizado em nosso estudo. Resultados semelhantes foram descritos em manguezais do litoral Sul do Estado de São Paulo, Brasil, com uma diferença na frequência de

Deltaproteobacteria, que se revelou ser um pouco menor (CURY, 2006). Entretanto, no estudo realizado por LIANG e colaboradores, 2007, no manguezal da Reserva Natural de Futian, localizada na cidade de Shenzhen na China, não houve predominância de uma ou mais classes. A classe Gammaproteobacteria ainda apresentou uma maior porcentagem, porém, menor que nos manguezais citados anteriormente, e a classe Deltaproteobacteria não apareceu em grande abundância ficando atrás de Alpha e Epsilonproteobacteria.

Em nossos resultados, dentro de Gammaproteobacteria, predominaram as famílias Chromatiaceae e Ectothiorhodospiraceae ambas da ordem Chromatiales, um grupo de bactérias anaeróbicas, conhecidas como sulfobactérias, capazes de realizar fotossíntese oxidando H_2S (gás sulfídrico) em íons sulfato e sulfito. O íon sulfato é de grande importância na produtividade do ecossistema, visto que constitui a principal fonte de enxofre para os produtos primários (HOBUSS *et al.*, 2007). Estas bactérias são encontradas geralmente em zonas anóxicas iluminadas de lagos e outros habitats aquáticos onde há acúmulo de gás sulfídrico, característico das florestas de mangue (KRISTENSEN *et al.*, 2008).

Na classe Deltaproteobacteria foi observada a predominância da ordem Desulfobacterales, composta exclusivamente por bactérias anaeróbicas redutoras de sulfato. A redução biológica do sulfato em condições anaeróbicas gera H_2S , fonte energética para os grupos bacterianos citados anteriormente. Estes resultados demonstram a importância do ecossistema manguezal na ciclagem do enxofre, pois além de Desulfobacterales, outros grupos filogenéticos que desempenham o mesmo papel, como os micro-organismos da ordem Desulfuromonales, também são encontrados em quantidades consideráveis. A presença de Desulfobacterales e de outras bactérias redutoras de enxofre relatadas neste trabalho é descrita, também, em manguezais do Rio Grande do Norte, Brasil, mesmo após contaminação por petróleo (CARVALHO *et al.*, 2007) e em diversos outros manguezais pelo mundo (CURY, 2006; LIANG *et al.*, 2007; CASTINE *et al.*, 2009).

O gênero que demonstrou maior abundância no manguezal da Restinga da Marambaia foi o *Caldithrix*, pertencente ao filo Deferribacteres, evidenciando que esse ecossistema é rico em micro-organismos filogeneticamente singulares. Este gênero é quimiorganotrófico, obrigatoriamente anaeróbico, moderadamente termofílico e capaz de fermentar substratos protéicos. Além disso, na presença de

nitrito, estas bactérias podem utilizar hidrogênio molecular ou acetato como aceptor de elétrons para redução de nitrito em amônia. Embora qualquer uma dessas características possa ser encontrada entre os outros táxons termofílicos, a combinação dessas capacidades fenotípicas parece ser bastante incomum. O gênero *Caldithrix* também é encontrado na Dorsal Meso-Atlântica, uma cadeia de montanhas submarinas localizada no oceano Atlântico (MIROSHNICHENKO & BONCH-OSMOLOVSKAYA, 2006).

Os demais filos descritos neste estudo variam em grau de predominância quando comparados com grupos filogenéticos presentes em outros trabalhos, dependendo do manguezal e da técnica utilizada (HOLGUIN, VAZQUEZ & BASHAN, 2001; CURY, 2006; KUMAR *et al.*, 2007; LIANG *et al.*, 2007; CASTINE *et al.*, 2009). A técnica de pirosequenciamento adotada neste trabalho, porém, permitiu a visualização de uma diversidade bem maior de filos, possibilitando a descrição de grupos microbianos não relatados anteriormente em manguezais.

Surpreendentemente, o petróleo parece ter promovido um bioestímulo, uma vez que a riqueza de espécies e a diversidade microbiana aumentaram significativamente após a adição de óleo, principalmente quando comparamos as amostras contaminadas com óleo com o grupo controle, que demonstrou uma diminuição nos indicadores de riqueza de espécies e de diversidade em relação ao tempo zero, ao longo do tempo. Tal fato pode ter ocorrido devido ao consumo de nutrientes presentes no sedimento, os quais ficaram escassos ao longo do tempo, à medida que iam sendo consumidos pelos micro-organismos. Também a ausência, nos microcosmos, de fatores locais tais como ciclo de marés, ciclagem de nutrientes, pode ter contribuído para tal decréscimo que foi visualizado principalmente nos estimadores de riqueza ACE e Chao do que no índice de diversidade Shannon, demonstrando uma tendência de diminuição um pouco mais expressiva no número de UTOs do que na sua diversidade.

Situação similar foi observada em um estudo realizado em microcosmos com sedimento de manguezal do estuário do rio Casqueira em Macau, Rio Grande do Norte, Brasil. A adição de óleo ao sedimento provocou um aumento da ordem de 10 vezes na contagem de unidades formadoras de colônias, passando de 10^6 UFC/ ml para 10^7 UFC/ ml, e ainda, também foi visualizado uma diminuição na diversidade no

sedimento controle (sem contaminação), passando de 22 para 12 espécies (média de triplicatas), após 90 dias (COSTA, 2007).

Porém, quando analisamos em nosso estudo a diversidade das amostras que receberam 5% de óleo, o aumento da riqueza e da diversidade não é tão grande, muito possivelmente por atingir níveis mais elevados de toxicidade, o que de certa forma pode estar inibindo a bioestimulação provocada pelo óleo em menor porcentagem. Após 66 dias de experimento com 2% de óleo, diversidade parece diminuir, possivelmente, por ocorrer degradação das frações dos hidrocarbonetos de petróleo mais rapidamente acessada pelos micro-organismos degradadores. É possível que haja, também, um rápido consumo de nitrogênio e fósforo disponíveis para a população hidrocarbonoclástica, o que torna mais lenta ou até mesmo cessa a degradação do contaminante, tornando a fonte do bioestímulo indisponível para os micro-organismos. Esta limitação na degradação deve-se ao alto teor de carbono do poluente, levando a um desequilíbrio na razão C:N:P (YANG *et al.*, 2009) (TAKETANI *et al.*, 2009).

As alterações na abundância de cada linhagem filogenética da comunidade bacteriana acompanharam, na sua maioria, o observado pelos estimadores de riqueza de espécies e pelo índice Shannon. Os dados indicam que houve um aumento após a adição de óleo e uma diminuição com o passar do tempo, sem alterar de forma significativa a porcentagem de dominância de cada grupo filogenético, salvo algumas exceções de grupos que aumentaram de forma mais significativa após a contaminação. Como exemplo, podemos citar a classe Gammaproteobacteria onde se observaram variações relativamente altas na porcentagem de suas ordens, famílias e gêneros, principalmente na ordem Alteromonadales, que apresentou um aumento significativo após a contaminação, enquanto que o aumento da abundância dos demais grupos filogenéticos foi bem menor. Dentro dessa ordem, os gêneros que acompanharam essas alterações foram *Marinobacterium* e principalmente *Marinobacter*.

Os gêneros *Marinobacter* e *Marinobacterium* são descritos em diversos trabalhos como estando presentes em áreas contaminadas com petróleo, tais como, sedimento de lagos (YAKIMOV *et al.*, 2005), solos salinos (GU *et al.*, 2007), ambientes marinhos (CUI *et al.*, 2008; BORDOLOI & KONWAR, 2009) inclusive em manguezal. O trabalho desenvolvido por BRITO e colaboradores, 2008, em um

manguezal contaminado da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, Brasil, detectou a presença de *Marinobacter* dentre os doze gêneros isolados deste ecossistema. Estes micro-organismos são encontrados também em reservatórios petrolíferos, como o reservatório de óleo com alto teor de sal de Qinghai, China, onde *Marinobacterium* está entre as bactérias dominantes neste ambiente (YUEHUI *et al.*, 2008); em reservatórios na Bacia de Campos, Brasil (SETTE *et al.*, 2007) e ainda em águas de injeção de plataformas também na Bacia de Campos, onde se observou uma predominância de 67% do gênero *Marinobacter* entre os micro-organismos (KORENBLUM *et al.*, 2010). Este gênero apresenta ainda competente capacidade de degradar hidrocarbonetos petrogênicos (LATTUATI *et al.*, 2002; DEPPE *et al.*, 2005).

NICHOLSON & FATHEPURE, 2004, em um estudo realizado em solos contaminados com benzeno e com alto teor de sal, sugerem o gênero *Marinobacter* como sendo o responsável pela degradação desse composto observada no trabalho. O gênero *Marinobacter* é ainda descrito na literatura como degradador de tolueno e xileno (GAUTHIER *et al.*, 1992) tetradecano, hexano, eicosano, heneicosano, (HUU *et al.*, 1999; NICHOLSON & FATHEPURE, 2004) e fluoranteno em sedimento de manguezal (BRITO *et al.*, 2009).

Os resultados do screening da comunidade bacteriana antes e após a contaminação são essenciais para a biorremediação deste ambiente, pois nos ensaios de laboratório que buscam bactérias hidrocarbonoclasticas para a formação de consórcios bacterianos, são isolados diversos micro-organismos com elevada eficiência na degradação in-situ. No entanto, ao serem testados no ambiente não apresentam resultados positivos (LAUNEN *et al.*, 2002; SAPONARO *et al.*, 2002; TAM & WONG, 2008), possivelmente devido à competição com os demais organismos e às diferenças de pH, salinidade, temperatura, nutrientes e outros fatores que diferem um ecossistema complexo, como o manguezal, do meio de cultura onde são realizadas as experimentações (YU *et al.*, 2005).

Alguns trabalhos descritos na literatura relatam esses casos de insucesso na utilização da técnica de bioaugmentação em Florestas de Mangue, como os estudos realizados por YU e colaboradores (2005), onde um consórcio bacteriano formado por três espécies isoladas de sedimento de manguezal que apresentava alto potencial na degradação de hidrocarbonetos petrogênicos em meio de cultura

líquido foi inoculado no ambiente, não demonstrando, no entanto qualquer efeito nas porcentagens de degradação dos hidrocarbonetos. Neste mesmo trabalho, a técnica de bioestimulação proporcionou a degradação de mais de 97% do contaminante. Resultados parecidos foram relatados em um trabalho realizado nos manguezais do Rio New Calabar, na Nigéria (ODOKUMA & DICKSON, 2003).

No entanto, a bioaugmentação pode tornar-se eficiente nesse ecossistema, caso sejam utilizadas técnicas de isolamento específicas para os micro-organismos que demonstraram, em estudos prévios, alta capacidade de degradação e competição no próprio ambiente, como por exemplo, *Marinobacter* e *Marinobacterium* no sedimento da Restinga da Marambaia. Isso diminuiria a seleção de estirpes que apresentam eficiência na degradação apenas em laboratório, o que possibilitaria a criação de um consórcio bacteriano com capacidade degradadora para além dos meios de cultura. Os trabalhos existentes na literatura que demonstram uma baixa eficiência na bioaugmentação em manguezais (ODOKUMA & DICKSON, 2003; YU *et al.*, 2005; TAM & WONG, 2008) não revelam um estudo prévio das alterações ocorridas na estrutura da comunidade microbiana no próprio ambiente antes da criação de um consórcio de bactérias hidrocarbonoclasticas.

Foi possível detectar um aumento na riqueza de espécies tanto pela estimativa de Chao 1 quanto ACE e na diversidade microbiana pelo índice de *Shannon*, o que demonstra um crescimento do número de micro-organismos e das atividades bacterianas após a contaminação, levando a crer que os micro-organismos presentes neste ambiente foram estimulados pela presença do óleo. Por este motivo, o que seria um limitante na degradação de hidrocarbonetos de petróleo em manguezais não é a capacidade degradadora de sua comunidade microbiana, já descritas em diversos trabalhos (CHANG, CHANG & YUAN *et al.*, 2008; HONG *et al.*, 2008; TAM & WONG, 2008; YUN, 2008; LI *et al.*, 2009), e sim outro fator, como por exemplo, o desequilíbrio na razão C:N:P devido ao alto teor de carbono do poluente, provocando um rápido consumo de nitrogênio e fósforo, já escassos neste ecossistema (HOLGUIN, VAZQUEZ & BASHAN, 2001; VAZQUEZ, 2000).

A detecção de um grande número de micro-organismos redutores de sulfato neste trabalho, tanto antes como após a contaminação, gera dados para sugerir uma estratégia diferenciada de bioestimulação em ambientes como os manguezais, onde os processos anaeróbicos predominam. A técnica compreende a adição de

aceptores de elétrons solúveis, para ajudar na remoção dos contaminantes. Os aceptores de elétrons mais comuns no ambiente natural são: nitratos, manganês [Mn (IV)], ferro [Fe (III)] e sulfato (LEVETT, 1990). No entanto, em um estudo realizado por LI e colaboradores (2009) foi demonstrado que na biodegradação anaeróbica de hidrocarbonetos de petróleo em sedimento de manguezal, o acceptor de elétrons dominante foi o sulfato, o que corrobora os resultados do nosso trabalho, pois foi visualizada uma grande abundância de bactérias de grupos filogenéticos que apresentam tal característica tanto antes como após a contaminação.

Os grupos bacterianos como *Marinobacterium* e principalmente *Marinobacter* podem ainda ser utilizados como alvos para o biomonitoramento de hidrocarbonetos de petróleo neste ecossistema, pois apresentaram um significativo aumento no número de suas sequências após a adição de óleo, quando comparado com os demais. E ainda, a grande diversidade bacteriana neste ecossistema, principalmente nas amostras impactadas, com o surgimento de micro-organismos não visualizado antes da contaminação, como por exemplo, o pequeno grupo bacteriano Deinococcus-Thermus que inclui o gênero *Deinococcus*, com várias espécies resistentes à radiação e degradadoras de materiais tóxicos e ainda a espécie *Thermus aquaticus*, da qual foi isolada a primeira Taq polimerase (CHIEN, EDGAR & TRELA, 1976), demonstrando o potencial dos ambientes impactados para a bioprospecção de micro-organismos que possuam algum interesse industrial.

Recentemente, a utilização de técnicas moleculares para o estudo da diversidade de microeucariotos em ambientes naturais vem aumentando, o que demonstra que a diversidade microbiana de eucariotos é provavelmente muito maior do que se acreditava anteriormente (MOON-VAN DER STAAY, DE WACHTER & VAULOT, 2001; ZETTLER *et al.* 2002). Alguns estudos que utilizam bibliotecas de clones baseadas no gene que codifica a subunidade ribossomal 18S demonstrando uma diversidade de microeucariotos diferente do visualizado no manguezal da Restinga da Marambaia. ZUENDORF e colaboradores (2006) estudaram a diversidade destes eucariotos nas águas do Fiorde Mariager, Dinamarca, e observaram uma predominância do grupo Alveolata seguido por Stramenopila com 41% e 28% respectivamente (ZUENDORF *et al.*, 2006). Em sedimento de mar profundo rico em metano na Baía de Sagami, Japão, também foi visualizada a diversidade de microeucariotos por análise molecular da subunidade 18S rDNA,

havendo uma abundância de 5,4% de Stramenopila, 8,6% de Cercozoa, 15,1% de Alveolata e 63,2% do grupo Fungi, sendo na sua totalidade *Cryptococcus curvatus* (TAKISHITA, *et al.* 2007). GANDANHO & SAMPANHO (2005) verificaram ainda a diversidade de microeucariotos em um reservatório aquático de uma mina de pirita abandonada em Portugal, que apresenta condições extremas de baixo pH e altas concentrações de metais pesados, e foi visualizado que 54,8% das sequências pertenciam a dois clones do grupo Viridiplantae e 14,6% a um clone de Stramenopila, nesse trabalho foi ainda visualizado clones pertencentes aos grupos Fungi e Alveolata (GADANHO & SAMPANHO, 2005).

Comparando nossos estudos a estes resultados pode-se perceber a singularidade do ecossistema manguezal não apenas pelas suas características físico-químicas ou pela sua flora e fauna, mas também pela sua estrutura da diversidade de microeucariotos, que se demonstrou diferenciada quando comparada com outros ambientes estudados até o presente trabalho.

O impacto do petróleo na comunidade de microeucariotos, ao contrário do observado sobre o domínio Bacteria, demonstra uma diminuição nos estimadores de riqueza de espécie ACE e Chao1 e no índice de diversidade Shannon, após 23 e 66 dias de experimento, revelando a sensibilidade de grande parte dos microeucariotos desse ecossistema à contaminação por hidrocarbonetos de petróleo.

O grupo taxonômico que demonstrou maior sensibilidade a contaminação com petróleo foi o Nematoda (nematódeos). Tal fato pode ser observado tanto pelos resultados gerados pela biblioteca de clones, onde esse grupo era predominante na comunidade de microeucariotos antes da contaminação apresentando redução na sua abundância após a adição de petróleo, quanto através do sequenciamento das bandas de DGGE, já que todas as bandas recortadas e sequenciadas das amostras sem contaminação com petróleo eram pertencentes a este grupo taxonômico, sendo muitas delas visualizadas apenas nas amostras sem o contaminante.

O gênero de maior abundância do grupo Nematoda, o *Neochromadora*, apresentava uma dominância de 25 % de todos os microeucariotos estudados neste trabalho antes da contaminação, não sendo visualizado após a adição de petróleo, e, ainda, este gênero é também visualizado em uma banda de DGGE que é encontrada apenas nas amostras sem óleo (banda I, figura 28), o que revela a grande sensibilidade deste gênero a presença do contaminante. Entretanto, em um

estudo conduzido por HEDFI e colaboradores (2007), em microcosmos com sedimento do Mar Mediterrâneo, onde foram simuladas contaminações com diferentes porcentagens de níquel, foi demonstrado uma pequena abundância de uma espécie deste gênero, *Neochromadora trichophora*, nas amostras com concentrações consideráveis de níquel, demonstrando que um mesmo grupo pode apresentar resistência diferenciada a diferentes contaminantes (HEDFI *et al.*, 2007). Já o gênero *Minutecellus*, que também apresentou grande sensibilidade a contaminação por petróleo de acordo com nossos resultados, também apresentou sensibilidade a contaminação por metais pesados (LEVY, STAUBER & JOLLEY, 2007). Tais dados nos levam a crer que o impacto na comunidade de determinados grupos de microeucariotos varia sensivelmente dependendo do contaminante e do ecossistema atingido.

Apesar de ser visualizado no presente trabalho a diminuição nos índices que medem a diversidade e riqueza de espécies, alguns grupos mostraram-se estimulados pela adição do óleo revelando um estímulo provocado por este contaminante nestes grupos específicos de microeucariotos. Os microeucariotos que apresentaram grande aumento de abundância nas amostras contaminadas com óleo foram: *Bacillariophyta* sp. e *Cafeteria mínima*, ambos *Bacillariophyta* (diatomáceas). As diatomáceas são o grupo mais importante do fitoplâncton, responsável por quase metade da produtividade marinha primária e estão amplamente difundidos nos mais variados ambientes, principalmente nos mares, rios, lagos, estuários e terra úmida e como também sobre o gelo, troncos de árvores e em águas termais entre outros (BOZARTH, MAIER & ZAUNER, 2009).

Alguns trabalhos relatam a presença destes micro-organismos em ambientes contaminados com óleo, como o estudo desenvolvido por MOSTAFA e colaboradores (2000), onde foi relatado o grupo *Bacillariophyta* como o fitoplancton mais abundante no inverno em um local contaminado por óleo no Rio Nilo, Egito. CÉZAR (2007) visualizou que houve um aumento de algumas espécies de diatomáceas após um derramamento de óleo diesel e vegetal no rio Negro, Paraná.

Diatomáceas fósseis são também importantes para os geólogos na datação geocronológica, ou seja, para a determinação da idade de certas rochas, que, por sua vez, são importantes na busca de petróleo. No passado geológico, especialmente no período terciário, as diatomáceas formaram, no fundo dos mares

antigos, extensos depósitos hoje conhecidos como terra das diatomáceas ou diatomitos. Os poços petrolíferos nos campos de Santa Maria, Califórnia, passam através de uma camada de terra de diatomáceas marinhas com cerca de um quilometro de espessura. A presença de diatomito é relatada em diversos lugares do Mundo, inclusive no Brasil, como na bacia de Campos, no Estado do Rio de Janeiro. Conhecer as características e a idade destas rochas pode indicar a presença de reservatórios de petróleo.

Apesar do grande número de trabalhos referentes ao grupo filogenético Bacillariophyta em áreas impactadas com óleo, as espécies encontradas no NCBI referentes ao maior número de sequências relatadas neste trabalho, nos microcosmos que receberam óleo, não foram descritas anteriormente como presentes em ambientes com hidrocarbonetos de petróleo.

Os microeucariotos *Bacillariophyta* sp. e *Cafeteria minima* podem ser utilizados como alvos para o biomonitoramento de hidrocarbonetos de petróleo, pois apresentaram um aumento significativo em sua abundância após a contaminação, dominando a comunidade de microeucariotos. A espécie *Cafeteria minima* relatada como possível bioindicador é descrita como pertencente ao grupo taxonômico Stramenopollis, porém neste trabalho não se agrupou com os demais membros de seu grupo taxonômico.

As bandas de DGGE visualizadas somente após a contaminação com petróleo, podem ser utilizadas como possíveis padrões para o monitoramento de áreas impactadas por este contaminante. Apesar da similaridade entre as sequências das bandas DGGE e as armazenadas no NCBI não serem muito elevadas, a banda A tem como referência um ciliado não cultivado relatado em um solo argiloso com um histórico de mais de 90 anos de poluição por hidrocarbonetos de petróleo (LARA *et al.*, 2007).

Os resultados do impacto da contaminação por hidrocarbonetos de petróleo na comunidade bacteriana e de microeucariotoas são de extrema importância para o ecossistema manguezal e principalmente para a Restinga da Marambaia, que, apesar de ser um ambiente sem histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo, está localizada na Baía de Sepetiba, onde se encontra também o Porto de Itaguaí. Este porto está em expansão visando a sua adequação para o recebimento de navios cada vez maiores e mais rápidos (FEEMA, 2010), o que torna esse

ambiente altamente suscetível a um desastre ecológico provocado por derramamento de óleo.

Estudos mais aprofundados sobre os micro-organismos que demonstraram no presente trabalho características favoráveis para o biomonitoramento de petróleo em manguezal possibilitarão o desenvolvimento de técnicas que permitirão identificar a presença de hidrocarbonetos nos ambientes impactados.

7. CONCLUSÕES

- A técnica de pirosequenciamento revelou uma diversidade bacteriana mais ampla do que a descrita até o presente momento em manguezal.
- Constatou-se que a contaminação do sedimento de manguezal da Restinga da Marambaia com petróleo provoca um aumento no número de espécies e na diversidade da comunidade bacteriana.
- O filo Proteobacteria é predominante nas amostras antes e após a contaminação.
- Os gêneros da comunidade bacteriana que representam maior aumento em sua abundância após a contaminação com petróleo são *Marinobacterium* e *Marinobacter*.
- A detecção de um grande número de grupos taxonômicos de bactérias redutoras de sulfato antes e após a contaminação com petróleo, demonstra a grande importância da utilização deste aceptor de elétrons na técnica de biorremediação.
- Os metazoários predominaram a comunidade de microeucariotos na amostra de sedimento de manguezal da Restinga da Marambaia, sem contaminação com petróleo.
- Em Metazoa o grupo taxonômico de maior abundância é o Nematoda (nematódeos).
- Os gêneros de microeucariotos de maior abundância antes da contaminação com petróleo são *Monhysteridae*, *Minutocellus* e principalmente *Neochromadora*.
- Ao contrário do observado na comunidade bacteriana, a contaminação com petróleo no sedimento de manguezal da Restinga da Marambaia acarreta em uma diminuição no número de espécies e na diversidade da comunidade de microeucariotos.

- Os Nematódeos demonstram grande sensibilidade à contaminação com petróleo, principalmente o gênero *Neochromadora*.
- Foi possível detectar um grande aumento na abundância do grupo filogenético Bacillariophyta (diatomácias) após a contaminação com petróleo.
- O gênero *Bacillariophyta* sp. não foi detectado antes da contaminação com petróleo no sedimento de manguezal da Restinga da Marambaia, porém após a contaminação, é revelada uma dominância na comunidade de microeucariotos superior a 30% nas amostras com 23 dias de contaminação e com cerca de 40% nas amostras com 66 dias de contaminação.
- A espécie *Cafeteria minima* também não foi detectada antes da contaminação com petróleo, porém, após contaminação sua abundância foi de 37,3% nas amostras com 23 dias de contaminação e apenas 2,35% nas amostras com 66 dias de contaminação.
- As bandas de DGGE visualizadas apenas após a contaminação com petróleo podem ser alvos para o monitoramento de áreas impactadas por este contaminante.
- As espécies *Bacillariophyta* sp. e *Cafeteria Minima* demonstram-se como potenciais alvos para o bimonitoramento da presença de petróleo em sedimento de manguezal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSMANN, A.; TUKAJ, Z. **The effect of anthracene and phenanthrene on growth, photosynthesis, and SOD activity of the green algae (*Scenedesmus armatus*) depends on the PAR irradiance and CO₂ level.** Arch. Environ. Contam. Toxicol., 47, 177–184, 2004.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation.** J. of Contr. Rel., 67, 418-453, 1994.
- ANSOTEGUI, A.; SAROBE, A.; TRIGUEROS, J. M.; URRUTXURTU, I.; ORIVE, E. **Size distribution of algal pigments and phytoplankton assemblages in a coastal-estuarine environment: contribution of small eukaryotic algae.** J. Plankton Res., 25, 341–355, 2003.
- ARMYNOT D. C. E.; DEBENAY, J. P.; SOULARD, D. R. **Foraminiferal proxies for pollution monitoring in moderately polluted harbours,** Environmental Pollution, 127, 27–40, 2003.
- ATLAS, R. M. **Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective.** Microbiol Rev., 45, 180–209 1981.
- ATLAS, M. R.; BARTHA, D. M. **Microbial Ecology. Fundamentals And Applications.** 3rd Ed. The Benjamin/Cummings Pub. Comp., Inc. Redwood City, Cal. 563,1993.
- BALAYIANNIS, G.; BALAYIANNIS, E. P. **Bee Honey as an Environmental Bioindicator of Pesticides' Occurrence in Six Agricultural Areas of Greece Arch.** Environ. Contam. Toxicol., 55, 462–470, 2008.
- BARCELONA, M. J.; HOLM, T. R.; SCHOCK, M. R.; GEORGE, G. K. **Spatial and temporal radients in aquifer oxidation–reduction conditions.** Water Res., 25, 991-1003, 1989.
- BERNEY, C.; FAHRNI, J.; PAWLOWSKI, J. **How many novel eukaryotic 'kingdoms'? Pitfalls and limitations of environmental DNA surveys.** BMC Biol, 2, 13, 2004.
- BLAKE, W. H.; WALSH, R. P.; REED, J. M.; BARNSLEY, M. J.; SMITH, J. **Impacts of landscape remediation on the heavy metal pollution dynamics of a lake surrounded by non-ferrous smelter waste.** Environ. Pollut., 148, 268–280, 2007.
- BOEHM, P. D.; PAGE, D. S. **Exposure elements in oil spill risk and natural resource damage assessments: A review.** Human And Ecological Risk Assessment, 13, 418-448, 2007.
- BORDOLOI, N. K.; KONWAR, B. K. **Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons.** J. Hazard. Mater., 170, 495-505, 2009.
- BOSIRE, J. O.; DAHDUH-GUEBAS, F.; WALTON, M.; CRONA, B. I.; LEWIS, R. R.; FIELD, C.; KAIRO, J. G.; KOEDAM, N. **Functionality of restored mangroves: A review.** Aquatic Botany, 89, 251–259, 2008.
- BOZARTH, A.; MAIER, U. G.; ZAUNER, S. **Diatoms in biotechnology: modern tools and applications.** Appl. Microbiol. Biotechnol., 82, 195-201, 2009.
- BRANDINI, F. P.; LOPES, R. M.; GUTSEIT, K. S.; SPACH, H. L.; SASSI, R. **Planctonologia na plata-forma continental do Brasil: diagnose e revisão bibliográfica.** MMA, CIRM, FEMAR. 196 p., 1997.
- BRITO, E. M.; DURAN, R.; GUYONEAUD, R.; GONI-URRIZA, M.; GARCIA DE OTEYZA, T.; CRAPEZ, M. A.; ALELUIA, I.; WASSERMAN, J. C. **A case study of in situ oil contamination in a mangrove swamp (Rio De Janeiro, Brazil).** Mar. Pollut. Bull., 58, 418-423, 2009.

- BURNS, K. A.; CODI, S.; DUKE, N. C. **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.** Mar. Pollut. Bull., 41, 392-402, 2000.
- BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L. **Conceptual basis for the application of biomonitoring on stream water quality programs.** Cad. Saúde Pública, 19(2), 465-473, 2003.
- CAI, X.; LIU, W.; JIN, M.; LIN, K. **Environmental effects of inclusion complexation between methylated cyclodextrin and diclofop-methyl.** J. Agric. Food Chem., 53, 6744–6749, 2007.
- CAIRNS J.; VAN DER SCHALIE. **Biological Monitoring in Water Pollution.** Pergamon Press, 955, 1982.
- CARON, D. A.; PEELE, E. R.; LIM, E. L.; DENNETT, A. M. R. **Picoplankton and nanoplankton and their trophic coupling in the surface waters of the Sargasso Sea south of Bermuda.** Limnol. Oceanogr., 44, 259–272, 1999.
- CARPENTER, A.; MACGILL, S. **Charging for port reception facilities in North Sea Ports: putting theory into practice.** Mar. Pollut. Bull., 42, 257–266, 2005.
- CARRASCO-LETELIER, L.; EGUREN, G.; MELLO, F. T.; GROVES, P. **Preliminary field study of hepatic porphyrin profiles of (*Astynax fasciatus*) (Teleostei, Characiformes) do define anthropogenic pollution.** Chemistry, 62, 1245–1252, 2006.
- CASTINE, S. A.; BOURNE, D. G.; TROTT, L.A.; MCKINNON, D.A. **Sediment microbial community analysis: Establishing impacts of aquaculture on a tropical mangrove ecosystem.** Aquaculture, 297, 91–98, 2009.
- CARVALHO C. M.; MEDEIROS S. R. B.; LIMA, L. F. A.; BLAHA C. A. G. **Environmental samples of mangrove Diogo Lopes, oilfield potiguar.** Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil, 2007.
- CHANG, B. V., CHANG, I. T. & YUAN, S. Y. **Anaerobic degradation of phenanthrene and pyrene in mangrove sediment.** Bull Environ Contam Toxicol 80, 145-149, 2008.
- CHEN, J., WONG, M. H., WONG, Y. S. & TAM, N. F. (2008). **Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Sphingomonas* sp. a bacterial strain isolated from mangrove sediment.** Mar Pollut Bull 57, 695-702, 2008.
- CÉSAR, J. **Diatomáceas (Ochrophyta) Epilíticas do rio Negro, Paraná: Estrutura da comunidade antes e após um derramamento de óleo diesel e vegetal.** UFPR, 77p., 2007.
- CHELIUS, M. K.; TRIPLETT E. W. **The diversity of Archaea and Bacteria in association with the roots of *Zea mays*.** L. Microb. Ecol., 41, 252–263, 2001.
- CHEN, Q.U.; XU, R.L.; TAM,N.F.Y.; CHEUNG, S.G.; SHIN, P.K.S. **Use of ciliates (Protozoa: Ciliophora) as bioindicator to assess sediment quality of two constructed mangrove sewage treatment belts in Southern China.** Marine Pollution Bulletin 57, 689–694, 2008.
- CHIEN A.; EDGAR D. B.; TRELA J. M. **Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*.** J. Bact. 127, 1550–7, 1975.
- CHEN, J., WONG, M. H., WONG, Y. S. & TAM, N. F. **Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Sphingomonas* sp. a bacterial strain isolated from mangrove sediment.** Mar Pollut Bull 57, 695-702, 2008.
- COATES, J.D.; ANDERSON, R.T. **Emerging techniques for anaerobic bioremediation of contaminated environments.** Trends Biotechnol. 18, 408-412, 2000.

CONTE, P.; ZENA, A.; PILIDIS, G.; PICCOLO, A. **Increased retention of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils induced by soil treatment with humic substances.** Environ. Pollut., 112, 27–31, 2001.

CONTE, P.; AGRETTO, A.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. **Soil remediation: humic acids as natural surfactants in the washings of highly contaminated soils.** Environ. Pollut., 135, 515–522, 2005.

COSTA J. G. **Impacto da contaminação de petróleo sobre comunidades microbianas do estuário do rio casqueira, Macau, RN.** Monografia (Ciências Biológicas), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio de Janeiro, 2007.

COLWELL, R.K. **EstimateS: Statistical Estimation of Species Richness and Shared Species from Samples. Version 5. User's Guide and application.** published at: <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>, 2000.

CUI, Z., LAI, Q., DONG, C. & SHAO, Z. **Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic Ridge.** Environ. Microbiol., 10, 2138-2149, 2008.

CURY, J. C. **Bacterial and Archaeal diversity in mangrove and marisma soils,** Tese (Doutorado em Agronomia) 147p. Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brazil, 2006.

DAS, S., LYLA, P. S.; KHAN, A. S. **Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives.** Current Science 90, 1325-1335, 2006.

DAWSON S.C.; PACE N.R. **Novel kingdom-level eukaryotic diversity in anoxic environments.** Proc Natl Acad Sci USA 99:8324–8329, 2002.

degradation in algae cultures. Environ. Toxicol. Chem. 26, 970–975.

DEPPE, U., RICHNOW, H. H., MICHAELIS, W. & ANTRANIKIAN, G. **Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium.** Extremophiles, 9, 461-470, 2005.

DÍEZ, B., C. PEDRÓS-ALIÓ, AND R. MASSANA. **Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit Rrna gene cloning and sequencing.** Appl. Environ. Microbiol. 67, 2932–2941, 2001.

DÍEZ, P.; ALIO C.P; MARSH, T.L; MASSANA R. **Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) To Study the Diversity of Marine Picoeukaryotic Assemblages and Comparison of DGGE with Other Molecular Techniques** Appl Environ Microbiol. 67 2942–2951, 2001.

DOTT, W., FEIDIEKER, D., KAMPFER, P., SCHLEIBINGER, H., STRECHER, S. **Comparison of autochthonous bacteria and commercially available cultures with respect to their effectiveness in fuel-oil degradation.** Journal of Industrial Microbiology 4, 365–373, 1989.

DUKE, N. C., J.-O. MEYNECKE, S. DITTMANN, A. M. ELLISON, K. ANGER, U. BERGER, S. CANNICCI, K. DIELE, K. C. EWEL, C. D. FIELD, N. KOEDAM, S. Y. LEE, C. MARCHAND, I. NORDHAUS, AND F. DAHDUOH-GUEBAS. **A World Without Mangroves?** Science 317, 41-42, 2007.

DUNDAR, M.S. **Vanadium concentrations in settled outdoor dust particles.** Environ. Monit. Assess. 123, 345–350, 2006.

EDGCOMB V.P., KYSELA D.T., TESKE A., DE VERA GOMEZ A., SOGIN M.L. **Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment.** Proc Natl Acad Sci USA 99, 7658–7662, 2002.

FEEMA. Disponível em: <http://www.feema.rj.gov.br/baia-sepetiba.asp?cat=75>. Acessado em 14 de Janeiro de 2010

FIELD, C.. **International Society for Mangrove Ecosystems, Okinawa, Japan. South China Printing Co., Hong Kong.** Journeys amongst mangroves 140, 1995.

FRENZILLI, G.; FALLENI, A.; SCARCELLI, V.; DEL BARGA, I.; PELLEGRINI, S.; SAVARINO, G.; MARIOTTI, V.; BENEDETTI, M.; FATTORINI, D.; REGOLI, F.; NIGRO, M. **Cellular responses in the cyprinid *Leuciscus cephalus* from a contaminated freshwater ecosystem.** Aquatic Toxicology 89, 188–196, 2008.

GADANHO M.; SAMPAIO J. P. **Microeukaryotic diversity in the extreme environments of the Iberian Pyrite Belt: a comparison between universal and fungi-specific primer sets, temperature gradient gel electrophoresis and cloning.** FEMS Microbiol Ecol 57, 139–148, 2006.

GARRITY S. D., LEVINGS S. D., BURNS K. A. **Long-term effects on the physical structure of the mangrove fringe, estuarine, coastal and shelf science.** The Gal. oil spill 38: 327-348, 1994.

GAUTHIER, M. J.; LAFAY, B.; CHRISTIEN, R.; FERNANDEZ, L.; ACQUAVIVA, M.; BONIN, P.; BERTRAND, J. C. ***Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium.** Int. J. Syst. Bacteriol., 42, 568–576, 1992.

GEOFFROY, L., DEWEZ, D., VERNET, G., POPOVIC, R. **Oxyfluorfen toxic effect on (*S. obliquus*) evaluated by different photosynthetic and enzymatic biomarkers.** Arch. Environ. Contam. Toxicol. 45, 445–452, 2003.

GESAMP. **Impact of oil and related chemicals on the marine environment.** Rep. and Stud. 50: 180, 1993.

GOMEZ J.L.G. & DAUVINA J.C. **Amphipods are Good Bioindicators of the Impact of Oil Spills on Soft-Bottom Macrobenthic. Communities Marine Pollution Bulletin** Vol. 40, No. 11, pp. 1017-1027, 2000

GRIEBLER, C.; SONNTAG, B.; MINDL, B.; POSCH, T.; KLAMMER, S.; PSENNER, R. **Assessment of the Ecological Integrity of Traunsee (Austria) Via Analysis of Sediments and Benthic Microbial Communities.** 2, 33-62, 2002.

GU, J., CAI, H., YU, S. L., QU, R., YIN, B., GUO, Y. F., ZHAO, J. Y. & WU, X. L. ***Marinobacter gudaonensis* sp. nov., isolated from an oil-polluted saline soil in a Chinese oilfield.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 57, 250-254, 2007.

GUIJIAN, L., LIUGEN, Z., DUZGOREN-AYDIN, N.S., LIANFEN, G., JUNHUA, L., ZICHENG, P. **Health effects of arsenic, fluorine, and selenium from indoor burning of Chinese coal.** Rev. Environ. Contam. Toxicol. 189, 89–106, 2007.

HAKANSON L.; BLENCKNER T. **A review on operational bioindicators for sustainable coastal management.** Criteria, motives and relationships Ocean & Coastal Management. 51, 43–72, 2008.

HARBISON, P. **Mangrove muds – A sink and a source for trace metals.** Mar. Pollut. Bull. 17, 246-250, 1986.

HASLAM S, SINKER, C., WOLSELEY, P. **Fondly known as "Hook, Line and Sinker", this work provides an accessible guide to our aquatic flora, including emergents.** British Water Plants. 10, 1982.

HEDFI, A., MAHMOUDI, E., BOUFAHJA, F., BEYREM, H. & AISSA, P. **Effects of increasing levels of nickel contamination on structure of offshore nematode communities in experimental microcosms.** Bull Environ Contam Toxicol 79, 345-349, 2007

- HOBUSS, C.; VENZKE, D.; GOUVEIA, D.; GOBEL, L.; KROLOW, M.; DEVANTIER, P.; ALVES, R.; JACONDINO, V. **SULFUR CYCLE**, Rio Grande do Sul, Brazil, 2007.
- HOLLIGER, C., ZEHNDER, A. J. B. **Anaerobic Biodegradation Of Hydrocarbons**. Curr. Opin. Biotechnol. 7: 326-330, 1996.
- HOLGUIN, G.; VAZQUEZ P. & BASHAN, Y. **The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview**. Biol Fert Soils, 33, 265–278, 2001.
- HONG, Y. W., YUAN, D. X., LIN, Q. M. & YANG, T. L. **Accumulation and biodegradation of phenanthrene and fluoranthene by the algae enriched from a mangrove aquatic ecosystem**. Mar. Pollut. Bull., 56, 1400-1405, 2008.
- HYNE R.V., MAHER W.A. **Macroinvertebrate Biomarkers: Links to Toxicosis and Changes in Population or Communities**. Technical Report, 2000.
- HUANG , H., LARTER, S.R., BOWLER, B.F. J. AND OLDENBURG, T.B.P **A dynamic biodegradation model suggested by petroleum compositional gradients within reservoir columns**. Org. Geochem. 35, 299-316, 2004.
- HUU, N. B.; DENNER, E. B. M.; HA, D. T. C.; WANNER, G.; STAN-LOTTER, H. ***Marinobacter aquaeolei* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well**. Int. J. Syst. Bacteriol., 49, 367–375, 1999.
- ISLAM, M.S., TANAKA, M. **Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis**. Mar. Pollut. Bull. 48, 624–649, 2004.
- JAHAN, K.; AHMED, T.; MAIER, W. J. **Phenanthrene mineralization in soil in the presence of nonionic surfactants**. Toxicol. Environ. Chem., 64, 127–143, 1997.
- KE, L., BAO, W., CHEN, L., WONG, Y. S. & TAM, N. F. **Effects of humic acid on solubility and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid media and mangrove sediment slurries**. Chemosphere, 76, 1102-1108, 2009.
- KEEGAN, T.J., FARAGO, M.E., THORNTON, I., HONG, B., COLVILE, R.N., PESCH, B., JAKUBIS, P., NIEUWENHUIJSEN, M.J. **Dispersion of As and selected heavy metals around a coal-burning power station in central Slovakia**. Sci. Total Environ. 358, 61–71, 2006.
- KELLY, M.G.; GIRTON, C.; WHITTON, B.A. **Use of moss-bags for monitoring heavy metals in rivers**. Water Research 21, 1429–1435, 1987.
- KOLKWITZ R, MARSSON M. **Oekologie der tierischen Saprobien**. Internationale Revue der Gesamten. Hydrobiologie und Hydrographie. 2:126-152, 1909.
- KORDA, A.; SANTAS, P.; TENENTE, A.; SANTAS, R. **Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used**. Appl. Microbiol. Biotechnol., 48, 677-686, 1997.
- KORENBLUM, E., VALONI, E., PENNA, M. & SELDIN, L. **Bacterial diversity in water injection systems of Brazilian offshore oil platforms**. Appl. Microbiol. Biotechnol., 85, 791-800, 2010.
- KRAUSS, K. W.; LOVELOCK L. E.; MCKEE, K. L.; LÓPEZ-HOFFMAN, L.; EWE, S. M. L.; SOUSA, W. P. **Environmental drivers in mangrove establishment and early development: A review** Aquatic Botany,. 89, 105-127, 2008.

- KRISTENSEN, E.; ALONGI, D. M. **Control by fiddler crabs (*Uca vocans*) and plant roots (*Avicennia marina*) on carbon, iron and sulfur biogeochemistry in mangrove sediment.** . *Limnol. Oceanogr.*, 51, 1557–1571, 2006
- KRISTENSEN, E.; BOUILLON, S.; DITTMAR, T.; MARCHAND, C. **Organic carbon dynamics in mangrove ecosystems: A review.** *Aquatic Botany*, 89, 201–219, 2008.
- KUMAR, S., HATHA, A. A. & CHRISTI, K. S. **Diversity and effectiveness of tropical mangrove soil microflora on the degradation of polythene carry bags.** *Rev. Biol. Trop* , 55, 777-786, 2007.
- KUZNETSOV, A. M., ULSTRUP, J. **Electron transfer in chemistry and biology: an introduction to the theory.** . New York: Wiley, 1988.
- LAHA, S. L. Z.; EDWARDS, D.A.; LUTHY, R.G. **Surfactant solubilization of phenanthrene in soil-aqueous systems and its effects on bioremediation.** *Aquatic. Chem.*, 244, 339-361, 1995.
- LAUNEN, L. A.; BUGGS, V. H.; EASTEP, M. E.; ENRIQUEZ, R. C.; LEONARD, J. W.; BLAYLOCK, M. J. **Bioremediation of polyaromatic hydrocarbon-contaminated sediments in aerated bioslurry reactors.** *Bioremediation Journal*, 6, 125–141, 2002.
- LARA, E.; BERNEY C.; HARMS, H.; CHATZINOTAS, A. **Cultivation-independent analysis reveals a shift in ciliate 18S rRNA gene diversity in a polycyclic aromatic hydrocarbon-polluted soil.** *FEMS Microbiol. Ecol.* 62, 365 – 373, 2007.
- LATTUATIA, A.; METZGER, P.; ACQUAVIVAB, M.; BERTRANDB, J.; LARGEUA, C. **n-Alkane degradation by *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* strain SP 17: long chain b-hydroxy acids as indicators of bacterial activity.** *Organic Geochemistry*, 33, 37- 45, 2002.
- LAMPARELLI, C.C. **Mapeamento dos ecossistemas costeiros do Estado de São Paulo.** *Cetesb* 108, 1998.
- LAUNEN, L. A., BUGGS, V.H., EASTEP, M.E., ENRIQUEZ, R.C., LEONARD, J.W., BLAYLOCK, M.J. **Bioremediation of polyaromatic hydrocarbon-contaminated sediments in aerated bioslurry reactors.** *Bioremediation Journal* 6, 125–141, 2002.
- LEAHY, J. G., COLWELL, R.R. **Microbial degradation of hydrocarbons in the environment.** . *Microbiological Reviews* 54, 305–315 54, 305–315, 1990.
- LEE, S. M. & CHAO, A . **Estimating population size via sample coverage for closed capture-recapture models.** *Biometrics* 50, 88-97, 1994.
- LEI, A-P., HU, Z-L., WONG, Y-S., TAM, N.F-Y. **Removal of fuoranthene and pyrene by different microalgal species.** *Bioresour. Technol.* 98, 273–280, 2007.
- LEVETT, P. N. **Anaerobic bacteria: a functional biology.** Milton Keynes, UK: Open University Press 15–26, 1990.
- LEVY J. L.; STAUBER J. L.; JOLLEY D. F. **Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity.** *Science of the Total Environment* 387, 141–154, 2007.
- LEWTAS, J. **Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects.** *Mutat. Res.*, 2007.
- LI, W. K. W.; SUBBA RAO, D.V.; HARRISON, W.G.; SMITH, J.C.; CULLEN, J.J.; IRWIN, B.; PLATT, T. **Autotrophic picoplankton in the tropical ocean.** *Science* 219:292–295, 1994.

- LI, H.; ZHAO, Q.; BOUDFADEL, M.C.; VENOSA, A. **A universal nutrient application strategy for the bioremediation of oil-polluted beaches.** Marine Pollution Bulletin, 54, 1146-1161, 2007.
- LI, C. H.; ZHOU, H. W.; WONG, Y. S. & TAM, N. F. **Vertical distribution and anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments in Hong Kong, South China.** Sci Total Environ, 2009.
- LIANG, J.; CHEN, Y.; LAN, C.; TAM, N. F. Y.; ZAN, Q.; HUANG, L. **Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment.** Mar. Biol., 150, 739–747, 2007.
- LIU, L.J.S.; BOX, M.; KALMAN, D.; KAUFMAN, J.; KOENIG, J.; LARSON, T.; LUMLEY, T.; SHEPPARD, L.; WALLACE, L. **Exposure assessment of particulate matter for susceptible populations in Seattle.** Environ. Health Perspect. 111, 909–918, 2003.
- LÓPEZ-GARCÍA, P., F. RODRÍGUEZ-VALERA, C. PEDROÓS-ALIÓ, AND D. MOREIRA. **Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton.** Nature 409, 603–607, 2001.
- MACFARLANE G.R.; BURCHETT M.D. **Photosynthetic Pigments and Peroxidase Activity as Indicators of Heavy Metal Stress in the Grey Mangrove, Avicennia marina (Forsk.) Vierh.** Marine Pollution Bulletin 42, 3, 233-240, 2001.
- MALLICK, N. **Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga (Chlorella vulgaris): response of the antioxidant system.** J. Plant Physiol. 161, 591–597, 2004.
- MATTOS, C. C. L. V. In: **Natural History Marambaia**, 55-66. Edited by Menezes, L. F. T. A.; Peixoto, L.; Araújo D. S., Seropédica, Edur, Brazil, 2005
- MENDELSSOHN, I. A.; LIN, Q. **The development of bioremediation for oil spill cleanup in coastal wetlands.** U.S. Dept. of Interior, Minerals Management Service, Gulf of Mexico OCS Region, New Orleans, LA. OCS Study MMS 2002-048, 2003.
- MENEZES, L. F. T. & ARAÚJO, D. S. D. **Structure of two vegetation cord external Restinga Marambaia, RJ.** Acta bot. bras. 13:115-236, 2004.
- MERSCH, J.; REICHARD, M. **In situ investigation of trace metal availability in industrial effluents using transplanted aquatic mosses,** Arch. Environ. Con. 34, 336–342, 1998.
- METIAN, M.; WARNAU M. **The Tropical Brown Alga Lobophora variegata (Lamouroux) Womersley: A Prospective Bioindicator for Ag Contamination in Tropical Coastal Waters.** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology , 81, 455-458, 2008.
- MEYER, U.; HAGEN, W.; MEDEIROS, C. **Mercury in a northeastern Brazilian mangrove area, a case study: potential of the mangrove oyster Crassostrea rhizophorae as bioindicator for mercury.** Marine Biology 131: 113±121, 1998
- MIROSHNICHENKO, M.L.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E.A. **Recent developments in the thermophilic microbiology of deep-sea hydrothermal vents.** Extremophiles, 10, 85–96, 2006.
- MNIF, S.; CHAMKHA, M.; SAYADI, S. **Isolation and characterization of Halomonas sp. strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hypersaline conditions.** J Appl Microbiol, 107, 785-94, 2009
- MOON-VAN DER STAAY, S.Y.; DE WACHTER, R.; VAULOT, D. **Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity.** Nature 409, 2001.
- MORALES-CASELLES, C.; MARTÍN-DÍAZ, M.L.; RIBA, I.; SARASQUETE, C.; DELVALLS, T.A. **Sublethal responses in caged organisms exposed to sediments affected by oil spills** Chemosphere 72, 819–825, 2008.

MOSTAFA M. E.; AMAL H. E.; MOHAMED E. H. O.; AYMAN H. **Comparative studies on the green algae *Chlorella homosphaera* and *Chlorella vulgaris* with respect to oil pollution in the river Nile.** Water, Air, & Soil Pollution, 124, 187-204, 2000.

NICHOLSON, C. A.; FATHEPURE, B. Z. **Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions.** Appl. Environ. Microbiol., 70, 1222–1225, 2004.

NIELSEN, T.; SIIGUR, K.; HELWEG, C.; JØRGENSEN, O.; HANSEN, P.; KIRSO, U. **Sorption of Polycyclic Aromatic Compounds to Humic Acid As Studied by High-Performance Liquid Chromatography** Environ. Sci. Technol., 31, 1102–1108, 1997.

NÜBEL, U., ENGELEN, B., FELSKE, A., SNAIDR, J., WIESHUBER, A., AMANN, R.I., LUDWIG, W., BACKHAUS, H. **Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis.** J. Bact. 178: 5636–5643, 1996.

NUDI, A.H.; WAGENER, A.L.R.; FRANCONI, E.; SCOFIELD, A.L.; SETTE C.B.; VEIGA, A. **Validation of *Ucides cordatus* as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluating sediment and crab HPA records.** Environment International 33, 315–327, 2007.

ODOKUMA, L. O. DICKSON, A. A. **Bioremediation of a Crude Oil Polluted Tropical Mangrove Environment.** Journal of Applied Sciences & Environmental Management 7, 23-29, 2003.

OLGUÍN, E. H.; HERNANDEZ, M. E.; SÁNCHEZ-GALVÁN, G. **Hydrocarbon mangroves pollution and bioremediation, phytoremediation and restoration strategies.** Rev. Int. Contam. Ambient., 23, 139-154, 2007.

OWEN, J. **The environmental management of oil tanker routes in UK waters.** Mar. Policy 23, 289–306, 1999.

PATTISON, A.B.; MOODY, P.W.; BADCOCK, K.A.; SMITH, L.J.; ARMOUR, J.A.; RASIAH, V.; COBON, J.A.; GULINO, L.M.; MAYER, R. **Development of key soil health indicators for the Australian banana industry, a p p. s o i l. e c o l., 4 0, 1 5 5 – 1 6 4, 2008.**

PEREIRA FILHO, O. & ALVES, J.R.P. **Conhecendo o manguezal.** Apostila técnica, G. Mundo da Lama, RJ. 4ª ed. 10p, 1999.

RAMSAY, M. A.; SWANNELL, R. P. J.; SHIPTON, W. A.; DUKE, N. C.; HILL, R. T. **Effect of bioremediation community in oiled mangrove sediments.** Mar. Pollut. Bull., 41, 413–419, 2000.

REBHUN, M.; DE SMEDT, F.; RWETABULA, J. **Dissolved humic substances for remediation of sites contaminated by organic pollutants. Binding-desorption model predictions.** Water Res, 30, 2027–2038, 1996.

REUSS, N., & L. K. POULSEN. **Evaluation of fatty acids as biomarkers for a natural plankton community. A field study of a spring bloom and a post-bloom period off West Greenland.** Mar. Biol. 14, 1423–434, 2002.

REYNAUD, S.; DESCHAUX, P. **The effects of 3-methylcholanthrene on lymphocyte proliferation in the common carp (*Cyprinus carpio* L.)** Toxicology 211, 156–164, 2005.

ROESCH L. F., FULTHORPE R. R., RIVA A., CASELLA G., HADWIN A. K. M., KENT A. D. **Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity.** ISME J 1: 283–290.

ROSSI, M., MATTOS, I. F. A. **O ecossistema mangue: uma análise dos solos e da vegetação no estado de São Paulo.** Rev. Inst. Flor. 4: 930-936, 1992.

RUSSEL, F.E.; KOTIN, P. **Squamous papilloma in the white croaker.** Journal of National Cancer Institute 18, 857–861, 1956.

SALT D.E., SMITH R.D., RASKIN I. **Phytoremediation**, *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol.* 643-668, 1998.

SAPONARO, S., BONOMO, L., PETRUZZELLI, G., ROMELE, L., BARBAFIERI, M. **Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) slurry phase bioremediation of a manufacturing gas plant (MGP) site aged soil**. *Water, Air and Soil Pollution* 135, 219–236, 2002.

SARUBBO, L. D. L.; DE CAMPOS-TAKAKI, G. M. **Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002**. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9, 400-406, 2006.

SEMADS. **Manguezais educar para proteger**. *Proj. Planágua FEMAR*. 95, 2001.

SETTE, L. D.; SIMIONI, K. C. M.; VASCONCELLOS, S. P.; DUSSAN, L. J.; NETO, E. V. S.; OLIVEIRA, V. M. **Analysis of the composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin**. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91, 253–266, 2007.

SCHULZ, H.D. In: **Redox: fundamentals processes and applications**, 235-246. Edited by Scüring, J.; Schulz, H.D.; Fischer, W.R.; Böttcher, J.; Duijnsveld, W.H.M, Berlin, Germany, 2000.

SHIARIS, M. P. **Seasonal biotransformation of naphthalene, phenanthrene, and benzo[a]pyrene in surficial estuarine sediments**. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 1391–1399, 1989.

SMITH, S. V. **Budget of calcium carbonate, southern California continental borderland**. *Journal of Sedimentary Research*, 41, 798-808, 1971.

SOGIN M. L., MORRISON H. G., HUBER J. A., MARK WELCH D., HUSE S. M., NEAL P. R. **Microbial diversity in the deep sea and the underexplored 'rare biosphere'**. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 12115–12120, 2006.

SUTHAR S, SINGH S, DHAWAN S. **Earthworm as bioindicators of metals (Zn, Fe, Mn, Cu, Pb and Cd) in soils: Is metal bioaccumulation affected by their ecological categories**. *Ecol Eng* 32, 99–107, 2008.

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

TAKISHITA, K.; TSUCHIYA, M.; KAWATO, M.; OGURI, K.; KITAZATO, H.; MARUYAMA, T. **Genetic Diversity of Microbial Eukaryotes in Anoxic Sediment of the Saline Meromictic Lake Namakoiike (Japan): On the Detection of Anaerobic or Anoxic-tolerant Lineages of Eukaryotes**. *Protist.*, 158, 51-64, 2007.

TAM, N. F., GUO, C. L., YAU, W. Y. & WONG, Y. S. (2002). **Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong Kong**. *Mar Pollut Bull* 45, 316-324, 2002.

TAM, N. F. & WONG, Y. S. **Effectiveness of bacterial inoculum and mangrove plants on remediation of sediment contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons**. *Mar. Pollut. Bull.*, 57, 716-726, 2008.

THIBAUT, S. L.; ANDERSON, M.; FRANKENBERGER, W. T. JR. **Influence of surfactants on pyrene desorption and degradation in soils**. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 283–287, 1996.

TOLOSA, I., MORA, S.J., FOWLER, S.W., VILLENEUVE, J-P., BARTOCCI, J., CATTINI, C. **Aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine biota and coastal sediments from the Gulf and the Gulf of Oman**. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1619–1633, 2005.

TORRES, M.A., TESTA, C.P., GASPARI, C.G., MASUTTI, M.B., PANITZ, C.M.N., CURI-PEDROZA, R., ALMEIDA, E.A., DI MASCIIO, P., WILHELM FILHO, D. **Oxidative stress in the mussel (*Mytella guyanensis*) from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil.** Mar. Pollut. Bull. 44, 923–932, 2002.

TORRES A.M., BARROS M.P., CAMPOS S.C.G., PINTO E., RAJAMANI S., SAYRE R.T., COLEPICOLO P. **Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review Ecotoxicology and Environmental Safety**, (71) 1– 15, 2008

TOTI, D. S., COYLE, F. A. & MILLER, J. A. **A Structured Inventory of Appalachian Grass Bald and Health Bald Spider Assemblages and a Test of Species Richness Estimator Performance.** J. Arachnol. 28: 329–345, 2000.

TREMOLADA P., BERNARDINELLI I., COLOMBO M., SPREAFICO M., VIGH M. **Coumaphos distribution in the Hive Ecosystem: Case study for modeling applications.** Exotoxicology 13, 589-601, 2004.

TREVORS, J. T., KUIKMAN, P., VAN ELSAS, J.D. **Release of bacteria into soil: cell numbers and distribution.** . Journal of Microbiological Methods 19, 247–259, 1994.

TRIPATHI, B.N., METHA, S.K., AMAR, A., GAUR, J.P. **Oxidative stress in (*Scenedesmus sp.*) during short- and long-term exposure to Cu²⁺ and Zn²⁺.** Chemosphere 62, 538–544, 2006.

UENO, D., WATANABE, M., SUBRAMANIAN, A., TANAKA, H., FILLMANN, G., LAM, P.K.S., ZHENG, G.J., MUCHTAR, M., RAZAK, H., PRUDENTE, M., CHUNG, K.H., TANABE, S. **Global pollution monitoring of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) furans (PCDFs) and coplanar polychlorinated biphenyls (coplanar PCBs) using skipjack tuna as bioindicator.** Environ. Pollut. 136, 303–313, 2005.

U.S. EPA. **Health assessment document for diesel engine exhaust.** Environmental Protection Agency, 8-90, 2002.

VÁLEGA, M.A.I.; LILLEBO, I.; CAÇADOR, E.; PEREIRA, A.C.; DUARTE, M.A.; PARDAL. **Mercury mobility in a salt marsh colonised by *H. portulacoides*.** 2nd International Symposium on Wetland Pollutant Dynamics and Control, 2007.

VALIELA, I. **Marine ecological processes (2nd. Edition).** Springer-Verlag, New York. 686, 1995.

VAZQUEZ, P. **Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon.** Biol Fertil Soils, 30, 460-468, 2000.

VOGEL, T. M. **Bioaugmentation as a soil bioremediation approach.** Curr. Opin. Biotechnol. 7, 311-316, 1996.

WAKE, H. **Oil refineries: a review of their ecological impacts on the aquatic environment.** Estuar. Coast. Shelf Sci. 62, 131–140, 2005.

WARD, D. M., BROCK, T.D. **Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments.** Applied and Environmental Microbiology 35, 353–359, 1978.

WARREN, N.; ALLAN, I.J.; CARTER, J.E.; HOUSE, W.A.; PARKER, A. **Pesticides and other micro-organic contaminants in freshwater sedimentary environments – a review.** Applied Geochemistry, 18, 159-194, 2003.

WILMS, R.; SASS, H.; KO"PKKE, B.; KO"STER, J.; CYPIONKA, H.; ENGELEN, B. **SPECIFIC Bacterial, Archaeal, and Eukaryotic Communities in Tidal-Flat Sediments along a Vertical Profile of Several Meters,** Applied And Environmental Microbiology. 72, 2756–2764, 2006.

- YAKIMOV, M.M.; DENARO, R.; GENOVESE, M.; CAPPELLO, S.; D'AURIA, G.; CHERNIKOVA, T. N.; TIMMIS, K.N.; GOLYSHIN, P.N.; GILULIANO, L. **Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons.** *Environmental Microbiology*, 7(9), 1426-1441, 2005.
- YANG, Q., TAM, N.F.Y., WONG, Y.S., LUAN, T.G., WU, W.S., LAN, C.Y., SHIN, P.K.S., CHEUNG, S.G. **Potential use of mangroves as constructed wetland for municipal sewage treatment in Futian, Shenzhen, China.** *Marine Pollution Bulletin*, 57, 735–743, 2008.
- YANG, S. Z., JIN H.J., WEIZ., HE R.X., JI Y.J., LI X.M., YU S.P. **Bioremediation of Oil Spills in Cold Environments: A Review.** *Pedosphere*, 19, 371–381, 2009.
- YONEDA, T.N. **Área Temática: Pláncton.** Centro de Estudios do Mar, Univ. Fed. Paraná. 1999
- YU, K. S., WONG, A. H., YAU, K. W., WONG, Y. S. & TAM, N. F. **Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments.** *Mar. Pollut. Bull.* 51, 1071-1077, 2005.
- YUEHUI, S.; BEIWEN, Z.; FAN, Z.; ZHENGLIANG, W.; FUCHANG, S.; LINGGE, Z.; TINGSHENG, X.; LONGJIANG, Y. **Analysis on the Microbial Diversity of Qinghai High Salt Content Oil Reservoirs.** IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering. Proceedings, 2, 780-783. 2008.
- YUN, T. Y.-R., L.; TIAN-LING, Z.; LI-ZHE, C.; XIAO-XING, C.; CHONG-LING, Y. **Contamination and potential biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments of Xiamen, China.** *Marine Pollution Bulletin*, 56, 1184-1191, 2008.
- ZETTLER L. A.; GÓMEZ F.; ZETTLER E.; KEENAN B. G.; AMILS R.; SOGIN M. L. **Eukaryotic diversity in Spain's River of Fire.** *Nature* 417:137, 2002.
- ZHUANG, Y.; THOMPSON, J.; ZYGARLICHE, C.J.; PAVLISH, J. **Development of a mercury transformation model in coal combustion flue gas.** *Environ. Sci. Technol.* 38, 5803–5808, 2004.
- ZUENDORF A.; BUNGE J.; BEHNKE A., BARGER K.; STOECK T. **Diversity estimates of microeukaryotes below the chemocline of the anoxic Mariager Fjord, Denmark.** *FEMS Microbiol Ecol* 58, 476–491, 2006.

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](#)