



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO

QUANDO O PETRÓLEO EMPOBRECE

MAHYSA FERREIRA COSTA

FEIRA DE SANTANA – BA
SETEMBRO, 2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO

QUANDO O PETRÓLEO EMPOBRECE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Feira de Santana como parte dos requerimentos necessários para obtenção do título de mestre em Ecologia e Evolução.

MAHYSA FERREIRA COSTA

Orientador: Prof. Dr. Eddy José Francisco de Oliveira
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Taíse Bomfim de Jesus

FEIRA DE SANTANA - BA
SETEMBRO, 2019

Ficha catalográfica Biblioteca Central Julieta Carteado UEFS

Costa, Mahysa Ferreira
C874q Quando o petróleo empobrece / Mahysa Ferreira Costa. - 2019.
106f.: il.

Orientador: Eddy José Francisco de Oliveira
Coorientadora Taíse Bomfim de Jesus

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana.
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, 2019.

1. Hidrocarboneto de petróleo. 2. Área de Proteção Ambiental
(APA) – Pratigi, Bahia. 3. Diversidade microbiana autóctone. I. Oliveira,
Eddy José Francisco de, orient. II. Jesus, Taíse Bomfim de, coorient.
III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 502.57:547.912

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO

MAHYSA FERREIRA COSTA

QUANDO O PETRÓLEO EMPOBRECE

Defesa em: 27/09/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eddy José Francisco de Oliveira (Orientador) - UEFS

Prof. Dr. Rogério Mercês Ferreira Santos - UEFS

Prof^a. Dra. Danúsia Ferreira Lima - UFBA

FEIRA DE SANTANA – BA
SETEMBRO, 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual Feira de Santana (UEFS) e ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução por ter propiciado toda estrutura para o desenvolvimento e realização desse estudo. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado integral disponibilizada. Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001.

Meus sinceros agradecimentos, inicialmente, a minha co-orientadora, Prof^a. Dra. Taíse Bomfim de Jesus, já que foi a partir dela que cheguei ao meu orientador, Prof. Dr. Eddy José Francisco de Oliveira, a quem também devo meus agradecimentos, pois sempre depositou em mim muita confiança e estima, além de sua ajuda e orientação no decorrer do trabalho porque, a final de contas, foi um desafio para os dois.

Também agradeço à minha família, meus pais Noibélia e Valter, pela compreensão e ensinamentos nessa longa jornada da vida. Além da grande ajuda dos amigos, em especial Richard Onoo, que tenho um apreço enorme e que esteve comigo desde o início.

Agradeço aos colegas que conheci no Programa por compartilharmos as angústias da vida acadêmica. E a todos que fizeram parte, de alguma forma, no decorrer do trabalho.

RESUMO

O presente estudo visou acessar e investigar a diversidade microbiana autóctone presente no solo do manguezal com o intuito de servir como estudo referencial para trabalhos posteriores, visto que até o atual momento não foi relatado na literatura análises da diversidade genética microbiana dos sedimentos de manguezal do Rio Santarém, área de Floresta Atlântica, do Ecopolo III da APA do Pratigi. Portanto, a partir da realização do levantamento da diversidade microbiana autóctone em ambiente de manguezal, por meio da nova geração de sequenciamento massivo, da determinação dos teores de material orgânico e análises de HTPs, obtivemos resultados que demonstram maior abundância do filo *Proteobacteria*, seguido do filo *Chloroflexi*, onde a presença desses grupos de micro-organismos no sedimento podem indicar a ocorrência de contaminação por hidrocarboneto, seja ela recente ou histórica. A área do estudo em questão recebe influência do estuário da Baía de Camamu e sua localização geográfica chama a atenção sobre sua vulnerabilidade para a ocorrência de impactos provocados pelo derramamento de hidrocarbonetos do petróleo, além de ser uma Área de Proteção Ambiental (APA). Sendo assim, o presente estudo também avaliou a estrutura e diversidade de comunidade microbiana autóctone exposta ao óleo da bacia do Recôncavo, por meio da amplificação da região V4 do gene 16S rRNA utilizando a plataforma NGS Illumina, através de um experimento de perturbação criado em laboratório, onde seria analisado o efeito dessa variável sob os grupos microbianos pelo período de 30 dias. A partir dos resultados gerados, notou-se o crescimento expressivo do grupo *Proteobacteria*, podendo indicar a presença de grupos que apresentem função metabólica para biorremediação, além do experimento em laboratório demonstrar o empobrecimento de células bacterianas após 30 dias do contato do petróleo sob a comunidade microbiana. Diante do que foi observado através desse estudo, a estrutura e a diversidade da comunidade microbiana autóctone do sedimento de manguezal do rio Santarém são afetadas negativamente com a ocorrência do derramamento de petróleo.

Palavra-chave: Diversidade microbiana usando gene 16S rRNA, NGS Illumina, APA do Pratigi, hidrocarboneto de petróleo

Abstract

The present study aimed to access and investigate the native microbial diversity present in the mangrove soil in order to serve as a reference study for further work, so far, no analysis of the microbial genetic diversity of the mangrove sediments of the rio Santarém, Floresta Atlântica, of the Ecopolo III - APA do Partigi has been reported in the literature. Therefore, from the survey of the native microbial diversity in a mangrove environment, through the new generation of massive sequencing, the determination of the organic material contents and the analysis of HTPs, we obtained results that demonstrate a greater abundance of the *Proteobacteria* phylum, followed by the *Chloroflexi* phylum, where the presence of these groups of microorganisms in the sediment may indicate the occurrence of recent or historical hydrocarbon contamination. The study area in question is influenced by the Camamu Basin estuary and its geographical location draws attention to its vulnerability to the impacts of oil spills, in addition to being an Environmental Protection Area (APA). Thus, the present study also evaluated the structure and diversity of autochthonous microbial community exposed to oil from the Recôncavo basin by amplifying the V4 region of the 16S rRNA gene using the NGS Illumina platform through a laboratory disturbance experiment, where the effect of this variable on microbial groups would be analyzed for a period of 30 days. From the results generated, we noticed the significant growth of the Proteobacteria group, which may indicate the presence of groups that have metabolic function for bioremediation, besides the laboratory experiment demonstrating the depletion of bacterial cells after 30 days of oil contact under the community microbial. Given what was observed through this study, the structure and diversity of the native microbial community of the Santarém river mangrove sediment are negatively affected by the occurrence of the oil spill.

Keywords: Microbial diversity using 16S rRNA gene, NGS Illumina, APA do Partigi, Petroleum Hydrocarbon

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I

Figura 1. Ecopolos da APA do Pratigi - OCT (2012)	40
Figura 2. Baía de Camamu	41
Figura 3. Imagens do google maps representando a área de coleta.....	42
Figura 4. Foto representando os dois pontos de coleta (Costa, 2018).....	43
Figura 5. Desenho experimental.....	44
Figure 6. Curva de rarefação para OTUs da comunidade microbiana das quatro amostras de sedimento do ecossistema de manguezal	49
Figure 7. Abundância relativa dos principais grupos no nível de filo da comunidade microbiana nas quatro amostras de sedimentos no ecossistema demangue	49
Fig. Sup. 8- Abundância relativa dos principais grupos no nível de classe da comunidade microbiana nas quatro amostras de sedimentos no ecossistema de mangue	72
Fig. Sup. 9-. Abundância relativa dos principais grupos no nível de ordem da comunidade microbiana nas quatro amostras de sedimentos no ecossistema de mangue.....	72
Figura 10. Principais resultados da análise de coordenadas (PcoA) com QIIME ponderado nas quatro amostras de sedimento domangueza	52
Figura 11. Diagrama de Venn das sequências do gene 16S rRNA de sedimentosdo solo da Bahia, totalizando 945 Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) ;;;;	53
Figura 12. Curva de rarefação para OTUs da comunidade microbiana das duas amostras de sedimento (Superfície e Inferior) do ecossistema manguezal..	54
Figura 13. Abundância relativa de grupos principais no nível de filo da comunidade microbiana nas duas amostras de sedimentos (Superior e Inferior) no ecossistema de mangue	55
Fig. Sup. 14. Abundância relativa de grupos principais no nível de classe da comunidade microbiana nas duas amostras de sedimentos (Superior e Inferior) no ecossistema de mangue.....	72

Figura 15. Resultado da Análise de coordenadas principais (PCoA) com QIIME ponderado nas duas amostras (Superfície e Inferior) no manguezal57

Figura 16. Diagrama de Venn das sequências do gene 16S rRNA (Superior e Inferior) de sedimentos do solo da Bahia, totalizando 1076 Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs)58

Fig. Sup.17. Perfil cromatográfico dos HTPs (n-C8 a n-C40) de sedimento (P1T) de manguezal do rio Santarém, sul do Estado da Bahia; onde o eixo y, representa a abundância e o eixo x, o tempo de retenção em minutos.73

Fig. Sup.18. Perfil cromatográfico dos HTPs (n-C8 a n-C40) de sedimento (P1B) de manguezal do rio Santarém, sul do Estado da Bahia; onde o eixo y, representa a abundância e o eixo x, o tempo de retenção em minutos73

Fig. Sup.19. Perfil cromatográfico dos HTPs (n-C8 a n-C40) de sedimento (P2T) de manguezal do rio Santarém, sul do Estado da Bahia; onde o eixo y, representa a abundância e o eixo x, o tempo de retenção em minutos.74

Fig. Sup.20. Perfil cromatográfico dos HTPs (n-C8 a n-C40) de sedimento (P2B) de manguezal do rio Santarém, sul do Estado da Bahia; onde o eixo y, representa a abundância e o eixo x, o tempo de retenção em minutos.74

Capítulo II

Figura 1. Imagens do google maps representando a área de coleta81

Figura 2. Foto representando os dois pontos de coleta (Costa, 2018)82

Figura 3. Desenho experimental84

Figura 4. Curvas de rarefação para OTU da comunidade microbiana da amostra de sedimentos contaminados por hidrocarbonetos no ecossistema de mangue88

Figura 5. Abundância relativa dos principais grupos no nível de filo da comunidade microbiana nas amostras de sedimentos contaminados por hidrocarbonetos do ecossistema de mangue89

Figura 6- Abundância relativa dos principais grupos no nível de classe da comunidade microbiana nas amostras de sedimentos contaminados por hidrocarbonetos do ecossistema de mangue90

Figura 7. Resultado da Análise de coordenadas principais (PCoA) com QIIME ponderado em amostras de sedimentos contaminados por hidrocarbonetos do ecossistema de mangue92

Figura 8. Diagrama de Venn das sequências do gene 16S rRNA de sedimentos do solo contaminado da Bahia, totalizando 1009 Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs)93

Figura 9. Diagrama de Venn das sequências do gene 16S rRNA de sedimentos do solo contaminado da Bahia, totalizando 827 Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs)93

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Sequências das quatro amostras e índices de diversidade do estudo	47
Tabela 2. Sequências das duas amostras (Superfície e Inferior) e índices de diversidade do estudo	52
Tabela 3. Amostras com os valores de MO e TOC	58

Capítulo II

Tabela 1. Sequências das amostras contaminadas por hidrocarbonetos e índices de diversidade do estudo	87
---	----

ÍNDICE DE QUADROS

Capítulo I

Quadro 1. Áreas amostradas com seus referentes pontos de georeferenciamento e temperatura do solo (°C)	42
Quadro 2. Informações sobre a região V4 do gene 16S ribossomal (Caporaso et al., 2012).....	4475
Quadro Sup. 3- Valores obtidos das análises de TOC	73
Quadro Sup.4- Valores obtidos da amostra de sedimento (P1T).	75
Quadro Sup.5- Valores obtidos da amostra de sedimento (P1B).	75
Quadro Sup.6- Valores obtidos da amostra de sedimento (P2T).	75
Quadro Sup.7- Valores obtidos da amostra de sedimento (P2B).	75

Capítulo II

Quadro 1. Informações sobre a região V4 do gene 16S ribossomal (Caporaso et al., 2012).....	87
---	----

LISTA DE SIGLAS

Amplicons - Produto Amplificado

BC – Baía de Camamu

BTS – Baía de Todos os Santos

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

GPS - Sistema de Posicionamento Global

HTP - Hidrocarbonetos Totais do Petróleo

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

MO – Matéria Orgânica

OCT – Organização da Conservação de Terras

OTU – Unidades Taxonômicas Operacionais

P1 – Área alagada

P1B – Área alagada de subsuperfície

P1T – Área alagada de superfície

P1t1 – Área alagada 7 dias após adição do petróleo

P1t2 – Área alagada 15 dias após adição do petróleo

P1t3 – Área alagada 30 dias após adição do petróleo

P2 – Área sem interferência marinha

P2B - Área sem interferência marinha de subsuperfície

P2T – Área sem interferência marinha de superfície

P2t1 - Área sem interferência marinha 7 dias após adição do petróleo

P2t2 - Área sem interferência marinha 15 dias após adição do petróleo

P2t3 - Área sem interferência marinha 30 dias após adição do petróleo

PCoA - Análise de Coordenadas Principais

TOC – Carbono Orgânico Total

SUMÁRIO

FUNDAMANTAÇÃO TEÓRICA.....	13
Bioma Mata Atlântica.....	13
Ecossistema Manguezal.....	14
O Petróleo e o Manguê.....	16
Ecologia Microbiana.....	19
NGS (Next - generation Sequencing) e Estudos Ecológicos.....	25
Referências bibliográficas.....	29
ARTIGO 1.....	35
Introdução.....	36
Objetivos.....	38
Materiais e métodos.....	39
Resultados.....	47
Discussão.....	59
Considerações finais.....	66
Referências bibliográficas.....	67
Anexos.....	75
ARTIGO 2.....	76
Introdução.....	77
Hipótese e previsão.....	79
Objetivos.....	79
Materiais e métodos.....	80
Resultados.....	86
Discussão.....	93
Considerações finais.....	97
Referências bibliográficas.....	98

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

BIOMA MATA ATLÂNTICA

Considerado um dos principais biomas do Brasil, a Mata Atlântica encontra-se presente em toda porção leste do território brasileiro, apresentando formações florestais nativas (Ex: Floresta Ombrófila Densa; Floresta Ombrófila Mista, também denominada de Mata de Araucárias; Floresta Ombrófila Aberta; Floresta Estacional Semidecidual; e Floresta Estacional Decidual), além dos ecossistemas associados, como os manguezais, vegetações de restingas, campos de altitude, brejos interioranos e encaves florestais do Nordeste (Campanili; Schaffer, 2010).

O bioma deixou de ocupar mais de 1,3 milhões de km² que se distribuía por 17 estados do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Alagoas, Sergipe, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí), para hoje apresentar 29% de sua cobertura original, devido ao desmatamento e problemáticas envolvendo as ações humanas. E mesmo com os dados demonstrando uma alta redução desse bioma, estima-se que ainda existam cerca de 20 mil espécies vegetais, que significa, aproximadamente, 35% das espécies existentes no Brasil, incluindo espécies endêmicas e ameaçadas de extinção (Campanili; Schaffer, 2010). Portanto, por ser caracterizado como um hotspot brasileiro com alta diversidade biológica e endemismo, sendo sua riqueza maior quando comparado a alguns continentes, como é o caso da América do Norte, se torna de extrema relevância a conservação e preservação das áreas de Mata Atlântica, além de que, hoje o bioma encontra-se altamente fragmentado, com as áreas relativamente extensas e áreas com diversos estágios de degradação (Campanili; Schaffer, 2010; Lagos; Muller, 2009; Medeiros; Savi; Brito, 2005).

Esse atual cenário do bioma Mata Atlântica encontra-se entre os mais ameaçados do mundo, e à medida que a biodiversidade vai sendo perdida, as consequências vão tornando-se cada vez mais danosas e irreversíveis, como a

redução e perda de ecossistemas, de populações, diminuição variabilidade genética, de espécies e dos processos evolutivos que permitem a continuidade da diversidade genética e biológica (Galindo-Leal; Câmara, 2005).



Figura 1. Mapa dos principais biomas brasileiros (IBGE, 2004)

ECOSSISTEMA MANGUEZAL

Dentro do bioma Mata Atlântica estão presentes diferentes ecossistemas florestais, dos quais o manguezal faz parte e encontram-se distribuídos pelo mundo inteiro, chegando a ocupar cerca de 60 a 75% da área costeira tropical esubtropical. Classificados ecologicamente como zona de transição dos ambientes marinho, terrestre e de água doce, e, portanto, sob a presença de organismos extremamente adaptados às condições de flutuação da salinidade, além da capacidade de conseguirem se desenvolverem em sedimentos com baixa taxa de oxigênio disponível. Sendo assim, estes ecossistemas são tidos como relevantes devido ao fato de apresentarem alta produtividade e biodiversidade biológica de peixes, moluscos e crustáceos, sem contar as devidas condições de recursos (alimentação, proteção e reprodução) para espécies animais que se utilizam do ambiente, como as

aves, répteis e mamíferos (Holguin et al., 2006; DE Macedo Soares et al., 2010; Farjalla et al., 2009). Sendo assim, o manguezal é descrito como um ecossistema ocupado por populações de vegetais, animais e micro-organismos interagindo entre si e como ambiente.

Os manguezais apresentam relevante papel no sequestro e estoque de carbono no solo e na biomassa desse ecossistema. A quantidade de carbono sequestrado do ambiente por área ocupada pela vegetação típica de manguezais se equipara ao das florestas tropicais úmidas, principalmente levando em consideração a reserva de carbono presente na biomassa que recobre o solo. Porém, quando se trata da soma de todo o estoque de carbono existente no sistema (biomassa subterrânea e acima do solo), o manguezal abriga por unidade de área um valor significativamente maior do que em quaisquer florestas terrestres, até mesmo a Amazônia (ICMBio, 2018).

Esses ecossistemas estuarinos também funcionam como redutores de impactos ocasionados na zona costeira diante das mudanças climáticas que podem ser provocadas por mudanças da temperatura, dos regimes de chuvas, tempestades e elevação do nível do mar, além do aumento da concentração de gás carbônico (ICMBio, 2018). Portanto, as existências dos manguezais proporcionam uma minimização da vulnerabilidade das áreas continentais que podem ser acometidas por tempestades e inundações, sem contar o acúmulo de sedimentos que auxiliam na redução da destrutibilidade por processos erosivos, de assoreamento e no aumento do nível do mar (ICMBio, 2018).

Por outro lado, muito embora os manguezais sejam caracterizados por sua extrema importância, esses ambientes sofrem devido a diversas ameaças, a exemplo da perda de vegetação, fragmentação de habitat, danos a qualidade dos ambientes aquáticos, degradação do solo e contaminação da água ocasionada pelo derramamento de petróleo e metais pesados provocados por ações antrópicas em todo o mundo, onde todos esses fatores acabam trazendo prejuízos nas ofertas de recursos ao meio ambiente e, conseqüentemente, as comunidades que são sustentadas pela pesca, extrativismo, coleta de marisco e turismo para sobrevivência (ICMBio, 2018).

Os manguezais, portanto, são considerados ambientes nutritivos, com elevada importância como no que diz respeito à exportação de matéria orgânica para os estuários, sendo esse material biológico decomposto por micro-organismos e transformado em nutrientes para o solo. Contudo, esses locais são responsáveis pela produção de mais de 95% do alimento advindo da pesca. Por conta disso, é de fundamental relevância sua conservação para sustento das comunidades ribeirinhas e das comunidades animais que dependem desse local para reprodução e desenvolvimento (Carvalho, 2006; Lemos, 2004). O manguezal também desempenha o papel de filtro biológico, garantindo a retenção de impurezas contaminantes das águas, o que permite a sua qualidade ambiental (Machado *et al.*, 2004), além de gerar uma estabilidade geomorfológica da zona costeira (Lacerda, 2005; Monteiro, 2005).

Tratando do solo dos ecossistemas de manguezais, sabe-se que são formados pelo acúmulo de partículas orgânicas e inorgânicas oriundas dos ambientes terrestres e marinhos que são movimentadas através da suspensão e ressuspensão dos sedimentos, onde, a partir desse processo as partículas maiores e mais pesadas ficam depositadas ao fundo e as partículas mais finas e leves, de argila e silte, são agregadas e decantadas por floculação (Stralher & Stralher, 2000; Vannucci, 1999).

No geral, os solos de manguezais apresentam uma composição mineralógica bastante diversificada, além de existir uma variada diversidade de organismos que contribuem na formação e funcionamento desse ecossistema, porém pouco é conhecido sobre as comunidades microbianas presentes nesses solos.

O PETRÓLEO E O MANGUE

O petróleo é uma mistura complexa de compostos que podem ser encontradas em diferentes estágios dos estados físicos: sólido, líquido e gasoso e originário das rochas sedimentares. Esse composto orgânico, formado por processos biogeoquímicos é constituído essencialmente, por átomos de hidrogênio e carbono, ou também conhecido como petróleo, além de apresentarem menores proporções de oxigênio, enxofre e nitrogênio, metais e outros elementos (Usberco & Salvador, 2002, Seabra 2008, Thapa et al. 2012), formando estruturas químicas aromáticas e alifáticas que constituem o petróleo, juntamente com impurezas presentes nos poços onde são extraídos e outros compostos orgânicos. Portanto, são moléculas que apresentam como característica principal a combustão, por ser uma grande fonte de

energia. No entanto, o petróleo é uma mistura complexa dessas substâncias que irá apresentar uma variação em sua composição de acordo com a posição geográfica que se encontra e, conseqüentemente, das condições físicas, químicas e biológicas de onde se originou (Crapez et al. 2002, Van Hamme et al. 2003).

O petróleo é um combustível fóssil e formado por deposição e decomposição dos organismos aquáticos no fundo dos oceanos e encobertos por sedimentos, onde o tempo e a pressão irão atuar transformando esse material em uma substância viscosa e bastante escura.

Em condições normais ambientais de pressão e temperatura, classificam-se como gasosas aquelas moléculas que apresentam até quatro átomos de carbono, indica-se estado líquidos para aquelas moléculas que possuem de cinco a quinze átomos de carbono e encontra-se em estado sólido as moléculas que contém mais de dezoito átomos de carbono (William e McCain Jr. 1990).

Os petróleos, como dito anteriormente, são classificados em subgrupos denominados em alifáticos, cicloalifáticos e aromáticos podendo variar desde cadeias de fita simples até as mais complexas, ramificadas ou cíclicas (Tabela 1) (Milanelli 1994, Morrison 1985). A estrutura molecular dos petróleos pode variar desde cadeias de fita simples até mais complexas, com cadeias ramificadas ou estruturas cíclicas (Halliburton 2001).

Em grau de toxicidade, os petróleos aromáticos são considerados os representantes mais tóxicos, seguidos pelos cicloalifáticos, olefinas e, por último, os alifáticos. Segundo Zílio & Pinto 2002, a composição do petróleo pode ser definida por:

- petróleos saturados, que incluem alcanos de cadeia simples e ramificada (compostos parafínicos) e cicloalcanos (compostos naftênicos);
- petróleos aromáticos, incluindo moléculas aromáticas puras, cicloalcano-aromáticos (compostos nafteno-aromáticos) e, em alguns casos, compostos cíclicos de enxofre;
- resinas e asfaltenos, que correspondem aos compostos policíclicos, com alto peso molecular, os quais possuem átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio.

Tabela 1. Características e exemplos das principais classes de petróleos

Petróleos	Características	Exemplos
Alifáticos	<ul style="list-style-type: none"> □ são menos densos que a água; □ o tamanho da molécula é inversamente proporcional à sua volatilidade e hidrossolubilidade. 	Metano, propano, butano (gases a temperatura ambiente); hexano, octano, hexadecano (líquidos à temperatura ambiente); eicosano, triacontano, pentacontano (sólidos em temperatura ambiente)
Cicloalifáticos	<ul style="list-style-type: none"> □ possuem até 6 átomos de carbonos em forma de anel; □ são bastante resistentes à degradação microbiana 	Ciclohexano, metilciclohexano, metilciclopentano, 1,2-dimetilciclopentano
Aromáticos	<ul style="list-style-type: none"> □ muito voláteis e relativamente didrossolúveis; □ possuem anel benzênico; □ alguns são resistentes à degradação microbiana 	Benzeno, naftaleno, tolueno, xileno e fenantreno.

Adaptada de Morrison, 1985 (Morrison, 1985).

Devido à localização geográfica próxima as áreas de exploração, produção e transporte da atividade petroquímica, os ambientes de manguezais são considerados locais de alta vulnerabilidade a propensão de impacto por derramamento de petróleo (Burns *et al.*, 1993). Após o ocorrido, o petróleo apresenta alteração em suas características por conta dos fatores físicos e biológicos, a exemplo da oxidação fotoquímica, dissolução, dispersão, evaporação e, principalmente, a biodegradação (Sloan, 1999). Sendo que essas alterações irão ser influenciadas pelo ambiente (habitat atingido, proporção do impacto no meio, quantidade de material derramado, espécies atingidas), como também pelas características da região (condição hidrográfica, meteorológica, já poderia modificar a dispersão do petróleo, o clima e a época do ano, influenciando o ciclo de vida das espécies) (Sloan, 1999).

O impacto de um acidente por derramamento de petróleo atingido os ambientes de manguezais geram graves e numerosos efeitos, porém o tempo é um forte aliado na redução da toxicidade dessa complexa substância. O volume do petróleo pode ser diminuído com a ocorrência de chuvas no local e com a influência das marés. Assim como, as condições climáticas também podem provocar alterações químicas fazendo diminuir o nível de toxicidade do petróleo bruto, já que o clima ajuda a evaporar as porções mais voláteis, através do processo de oxidação, por exemplo. Contudo, a condição de limitação de oxigenação do solo é um grande influenciador da degradação dessa substância podendo fazer com que esses processos ocorram mais lentamente ou rapidamente (Lima, 2010).

ECOLOGIA MICROBIANA

As bactérias são micro-organismos que fazem parte de um grupo abundante de seres que conseguiram colonizar os mais variados tipos de ambientes presentes na Terra, considerados seres onipresentes (Brock, 2003).

Diante da longa história evolutiva e adaptação aos mais distintos ambientes, os micro-organismos acumularam uma impressionante diversidade genética, que excede, em muito, a diversidade dos organismos eucariontes (Souza, E., 2012; Andrade, 2013). Estudos filogenéticos baseados em sequências do 16S rDNA mostram, por exemplo, que a distância filogenética entre dois grupos de bactérias – halofílicas e espiroquetas – é 2,5 vezes maior que a distância entre os animais e as

plantas, que são classificados em reinos diferentes (Lundberg *et al.*, 2013). Sendo assim, os micro-organismos representam o repertório mais rico em diversidade química e molecular na natureza, constituindo a base de processos ecológicos, como os ciclos biogeoquímicos (do carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo e diversos metais), e da cadeia trófica, além de manterem relações vitais entre si e com os organismos mais complexos (Ramírez *et al.*, 2017; Vilela *et al.*, 2012).

O solo é considerado o extenso habitat dos micro-organismos, sendo que, atualmente, já é sabido que as diversas formas microbianas são encontradas nos diferentes nichos ecológicos, especialmente nos solos, onde estão presentes as maiores reservas dessa diversidade, que funcionam como as principais fontes de carbono da Terra. Os trabalhos de Torsvik e Ovreas, 2002; Torsvik *et al.*, 2002; Curtis e Sloan, 2004, demonstram através de dados brutos que essa fonte inesgotável de material genético obtidos através de cálculos simples, mostram a existência de 3000 a 11000 genomas em apenas 1g de solo, o que chega a, aproximadamente, 10 bilhões de micro-organismos com possivelmente milhões de espécies diferentes. Baseado em análises de gene da subunidade ribossomal 16S (rDNA 16S), que é um marcador amplamente utilizado para este propósito, demonstram existir uma riqueza em solo variando entre 2000 e 5000 espécies (Lundberg *et al.*, 2013; Schloss e Handelsman, 2006), podendo outras análises chegarem ao valor de 52000 espécies (Roesch *et al.*, 2007).

Os solos são ambientes muito complexos que inclui uma variedade de micro-habitats físicos com diferentes gradientes descontínuos e condições ambientais, devido a interação de diferentes parâmetros, a exemplo do pH, gases, água, estrutura das partículas, mudanças climáticas e atividade biótica. Pesquisas indicam que os papéis exercidos pelo armazenamento de água, fixação de vegetais no solo e as trocas gasosas tem influência sobre a estrutura do solo e, conseqüentemente, sobre a diversidade microbiana, promovendo mudanças espaciais e estruturais da comunidade de micro-organismo (Ranjard & Richaume 2001; Sessitsch *et al.* 2001). Os resultados dessas pesquisas demonstraram que a diversidade microbiana em solos contendo partículas menores foi maior em relação aos solos que apresentam partículas maiores; outros resultados indicam que o tipo e a quantidade de substratos orgânicos disponíveis têm uma grande influência na abundância de grupos microbianos e na sua diversidade funcional nos ecossistemas do solo (Fede *et al.* 2001; Grayston *et al.* 2001).

No solo estão presentes diferentes nutrientes que fazem parte da biomassa microbiana e estabelecem um papel importante nas reações metabólicas. Os principais elementos minerais são C, H, O, N, P e S, onde estes fazem parte dos ciclos biogeoquímicos, mediados por micro-organismos presentes na biosfera, assim como, alguns processos fisiológicos e bioquímicos nos micro-organismos são mediados por nutrientes minerais, a exemplo da síntese enzimática; estabilização da parede celular; estrutura do DNA e RNA; divisão celular; ligação de fagos à célula; mobilidade e interações simbióticas (Leite e Araújo, 2007). Demonstrando assim, a importância funcional da comunidade microbiana para o meio ambiente, já que são os micro-organismos responsáveis pela maior parte da ciclagem do carbono na natureza, além de serem essenciais para a degradação da matéria orgânica e capazes de utilizar o petróleo como fonte de energia e carbono (Mariano, 2006).

Bactérias autóctones com capacidade de reduzir ou remover petróleos e tolerantes a metais incluem espécies dentro dos gêneros *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Candida*, *Sporobolomyces*, *Flavobacterium*, *Rhodotorula*, *Brevibacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus*, *Alcanivorax*, *Gordonia* e *Dietzia* (Jiao et al., 2016; Bastiaens et al., 2000; Boonchan et al., 2000). Porém, a degradação de poluentes é realizada por consórcios microbianos, já que aumenta a eficiência de degradação quando comparado a degradação decorrente de culturas puras (Jiao et al., 2016).

A capacidade de degradação de substâncias poluentes por micro-organismos marinhos é conhecida e são encontrados em números abundantes, sendo assim esses mesmos micro-organismos também podem estar presentes em regiões de mangue, onde várias espécies já demonstraram serem capazes de metabolizar esse poluente, porém estão em maior número nos sedimentos contaminados do que nas áreas naturais (Gisele Nunes, 2006). Contudo, o impacto ambiental ocasionado por substâncias poluentes do petróleo que podem ser degradadas por micro-organismos ainda é um assunto de tamanha relevância e destaque (Seo et al. 2009).

A investigação de comunidades bacterianas, estrutura, diversidade e funcionalidade podem fornecer uma ilustração mais compreensível de espécies responsáveis pela degradação de poluentes, a exemplo dos petróleos.

PERTURBAÇÃO ECOLÓGICA E BIORREMEDIAÇÃO

Compreender a adaptação das comunidades biológicas frente às mudanças ambientais é uma questão central em ecologia e evolução. O estudo de perturbação ecológica é definido como uma interrupção do equilíbrio da composição e estrutura das comunidades decorrente de ações sejam elas naturais ou antropogênicas (Berga et al., 2012).

Estudos ecológicos são muito focados nas áreas de zoologia e botânica, recebendo pouco enfoque nas comunidades microbianas (Jiao et al., 2016). A grande diversidade microbiana ajuda a esses organismos procarióticos se adaptarem a vários habitats, incluindo aqueles ambientes impactados com petróleo e metais pesados. Esta ampla adaptabilidade tem grande valor para a biorremediação de ecossistemas danificados, já que ajudaria a fornecer, compreender e avaliar uma visão importante em processos ecossistêmicos (Jiao et al., 2016).

Problemas ambientais causados por contaminação é uma questão global, e a maioria desses impactos são caracterizados pela presença de poluentes complexos, incluindo compostos inorgânicos, a exemplo dos metais pesados gerados por atividades de mineração e indústrias metalúrgicas, e orgânicos, como os petróleo liberados no derramamento de óleo (Jiao et al., 2016; Zagatto, 2006; Carrasco et al., 2003).

As comunidades microbianas alteram sua composição rapidamente e a grande maioria é dificilmente identificada utilizando os métodos padrões de cultura. A maioria dos micro-organismos possui baixa abundância em diferentes ambientes, chamado de “biosfera rara”, possivelmente isso pode ser explicado devido a sua menor probabilidade de sucesso na dispersão para novos ambientes (Sogin et al., 2006). É provável que a disponibilidade de recursos, capacidade de captura de recursos, a tolerância as baixas condições de recursos, seja por limitação do mesmo e/ou fatores ambientais influenciando, funcionem como motores fundamentais para a alteração na composição e estrutura de espécies microbianas, devido à grande diversidade fisiológica presente nas comunidades microbianas (Grace, 1991). Portanto, a diversidade populacional microbiana terá uma alta e forte influência no sucesso da biorremediação, já que para haver a redução ou remoção por completo de substâncias tóxicas derramadas acidentalmente em áreas ambientais, se faz necessário um maior

número de micro-organismos capazes de degradar os compostos, para assim tornar o processo mais rápido e eficiente (Vidalli, 2001). Sendo, portanto, reconhecida como diretamente proporcional a relação do número de espécies presentes no ambiente, com o tempo utilizado para degradação do material impactante (Vidalli, 2001).

A área superficial do solo apresenta maior diversidade microbiana, visto que nessa região os fatores abióticos, a exemplo da temperatura, água, oxigenação, luminosidade, favorecem o surgimento e desenvolvimento de micro-organismos (Vidalli, 2001). Dessa forma, a biorremediação é definida como técnicas que se utilizam de micro-organismos, plantas, ou produtos biológicos, a exemplo de enzimas ou compostos celulares, para a remoção, redução ou recuperação de áreas impactadas por compostos tóxicos (Muteca, 2012).

O processo de biorremediação promovida por espécies microbianas que possuam a capacidade de metabolizar a substância poluente culminando sua transformação em compostos inofensivos ao ambiente e aos seres que ali residem, pode ocorrer de duas maneiras, através da bioestimulação que é a adição de nutrientes favorecendo o crescimento populacional microbiano e, portanto, o aumento da ação metabólica na quebra do petróleo. E, a bioaugmentação que é a adição de micro-organismos específicos e eficazes no ambiente impactado. O que irá definir um maior ou menor número de micro-organismos no ambiente contaminado é a quantidade de substância poluente exposta e, à medida que vai se reduzindo, a população microbiana vai se estabilizando (Yakubu 2007). Portanto, a biorremediação é baseada em três princípios básicos: a presença do micro-organismo com capacidade metabólica, a disponibilidade do contaminante e as condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade microbiana (Meneghetti, 2007).

A utilização do processo de biorremediação traz vantagens quando comparado a outras técnicas aplicadas para remoção de áreas contaminadas por petróleos, a exemplo dos custos mais barateados, um método mais seguro, pode ser realizado em locais de difícil acesso e, principalmente, o produto metabolizado pelos micro-organismos são, consideravelmente menos tóxicos ao ambiente e a quem se utilizar dele, além de degradá-los de forma permanentemente (Mandri & Lin 2007, Yakubu 2007).

Bioaugmentação

A bioaugmentação é uma estratégia do processo de biorremediação que pode

ser aplicada caso não haja uma comunidade microbiana autóctone que apresente uma capacidade metabólica suficiente para eliminar a substância poluente, porém com o aumento da diversidade microbiana se torna mais eficazo processamento dos contaminantes.

De acordo com Yu et al, 2005 e Mckew et al, 2007 bioaugmentação é uma técnica utilizada para tornar um ambiente contaminado, capaz de reduzir ou até mesmo eliminar os efeitos da poluição através do acréscimo de cepas específicas ou consórcios microbianos eficientes no processo de quebra dos compostos poluentes para obtenção de carbono e energia.

Para que a utilização dessa técnica tenha êxito, as condições ambientais do local perturbado precisam ser adequadas, já que os micro-organismos adicionados precisam se adaptar facilmente às novas condições estabelecidas no meio. Em casos de contaminação por óleo cru, por conta da extensa diversidade de petróleos presentes, a aplicação de um consórcio microbiano pode otimizar o processo, pois o resíduo da degradação de um micro-organismopode passar a ser o substrato para outro. Além disso, na ocorrência de uma co-contaminação, algumas espécies microbianas podem ter sua atividade metabólica interferida por algum contaminante atuante naquele ambiente. Dessa forma, tratando-se de um consórcio, o micro-organismo que conseguiu se adaptar àquelas condições possa degradá-lo e assim permitir que as populações anteriormente inibidas consigam se reestabelecer, garantindo o sucesso da biorremediação (Roane *et al.*, 2001).

Tratando-se do ponto de vista ecológico, nos ambientes marinhos alguns fatores precisam ser considerados para que haja o sucesso da bioaugmentação, os principais deles são a adaptação dos organismos à salinidade, concentração de oxigênio dissolvido e a dinâmica da água. Após a transferência dos micro-organismos cultivados em meio para o ambiente de local contaminado, culminana diminuição das populações dos micro-organismos adicionados, já que se encontram sob condições de estresse. Portanto, podem ser resultantes de uma baixa eficiência do processo algumas variáveis, exemplo da flutuação de temperatura, pH, a quantidade de nutrientes e o nível de toxicidade do contaminante (Gentry *et al.* 2004). Além disso, nota-se que as comunidades microbianas autóctones e previamente selecionadas apresentam maiores chances de conseguir sobreviver e propagar-se no ambiente após uma reintrodução, quando comparados a micro-organismos isolados de outros locais(Thavasi *et al* 2011).

Biestimulação

No processo da biorremediação a disponibilidade de nitrogênio e fósforo é elementar para o crescimento microbiano, principalmente em ambientes marinhos onde sua ocorrência é limitada (Thavasi *et al* 2011). Em casos de ambientes perturbados pelo derramamento de óleo, há uma grande probabilidade de na água contaminada já estarem presentes bactérias que estão aptas a metabolizar os petróleos (Koren *et al.* 2003; Orcutt *et al.* 2010). Porém, mesmo com a possibilidade de haver microrganismos com tal capacidade, seu crescimento irá se limitar devido à alta razão C : N e C : P (Venosa *et al.* 2010). Para isso, a adição de N e P na forma de fertilizantes é considerada uma forma eficaz para se estimular o crescimento e a atividade microbiana e assim proporcionar o catabolismo do óleo por microrganismos (Atlas & Hazen 2011). Conclui-se que tal técnica de adição de nutrientes ou compostos para estimular e proporcionar o crescimento microbiano é denominado de bioestimulação.

Quando comparado o ambiente terrestre ao marinho, o processo de bioestimulação no marinho precisa ser julgado com maior cautela e boa base de estudos (Tyagi *et al.* 2011). Para isso, umas das maiores preocupações que se precisa ter é que ao adicionar os bioestimulantes, os mesmos devem entrar em contato com os micro-organismos nas proximidades da mancha de óleo e, ao mesmo tempo, não devem possuir grande solubilidade em água, já que podem se dispersar no oceano e não surtir nenhum efeito desejado. Quando aplicados em locais em que a dispersão é mais lenta, deve-se tomar o cuidado para não eutrofizar o ambiente de tal forma que o acelerado crescimento de algas reduza a concentração de oxigênio dissolvido na água (Nikolopoulou & Kalogerakis 2009).

NGS (Next - generation Sequencing) E ESTUDOS ECOLÓGICOS

A Floresta Atlântica é conhecida por sua elevada diversidade e endemismo e, por esses fatores, passou a ser considerada um hotspot ecológico, já que sua localização geográfica favorece as altas taxas de vegetação diferenciadas das demais áreas e, portanto, abriga espécies que são existentes apenas nesses ambientes. Por esses motivos, todo cuidado é pouco, e a necessidade de conservação é imediata, já que se encontra sob forte ameaça de destruição. Por fazer parte de um dos

ecossistemas dentro da Floresta de Mata Atlântica, os manguezais são áreas fragilizadas e que precisam de maior atenção devido as suas características ambientais, principalmente no que se diz respeito aos seus solos e a sua diversidade microbiana, que pode ter a estrutura e funcionalidade da comunidade autóctone comprometida pela ação do petróleo, principalmente em ambientes vulneráveis como os manguezais.

O rápido e grande avanço nas técnicas moleculares funcionou como forte impulsionador dos estudos de ecologia microbiana no que diz respeito à avaliação da estrutura e diversidade das comunidades microbianas, especialmente pela dificuldade de identificação de organismos microbiológicos por técnicas taxonômicas morfológica convencional, além de serem muito utilizadas nos estudos de metagenômica, através dos marcadores filogenéticos, obtendo sequências de 16S rRNA para procariotos e 18S rRNA para os eucariotos, que permite avaliar a diversidade genética de um determinado ambiente (He et al., 2008) e que são geradas pelas plataformas NGS (Next- Gen Sequencing) ou também chamadas de sequenciamento de segunda geração. ONGS se diferencia do método de Sanger, tanto positivamente quanto negativamente, em sua maioria necessitam de grandes investimentos e apresentam tamanhos físicos consideráveis, capazes de gerar enormes quantidades de dados usando uma combinação de muitas amostras em apenas uma execução de sequenciamento e, como principal vantagem a construção de bibliotecas *in vitro* sem a necessidade de amplificar e clonar fragmentos de DNA, a partir da plataforma de sequenciamento Illumina. Portanto para as análises metagenômicas esse é um processo bastante viável já que permite a construção de grandes bibliotecas (Liu, et al. 2012).

A partir da utilização desse método em muitos campos da pesquisa, passou-se a desenvolver outros marcadores genéticos para identificação não apenas de animais, como também de seres procarióticos, arqueas e bactérias (Pomerantz, et al. 2017). O gene 16S que codifica subunidades de rRNA, utilizado para identificação de procariotos, se mostrou ser superior ao COI em alguns principais clados de vertebrados (Pomerantz, et al. 2017).

O sequenciador Illumina utilizado na investigação da diversidade e estrutura de procariotos a partir de amostras ambientais é um dos mais indicados para esse tipo de análise, pois se trata de uma técnica molecular que ajuda a analisar e classificar a comunidade microbiana autóctone que independe da forma de cultivo e isolamento

clássico (Liu, *et al.* 2012). E além da identificação de espécies, cria grande quantidade de bases de dados de referência através de sequências do material genético usando um padrão de amostragem, tornando mais rápido o progresso taxonômico (Pomerantz, *et al.* 2017).

O sequenciador *Illumina Genome Analyzer* teve sua criação no ano de 2006 e é baseado no “sequenciamento por síntese” (SBS) que consiste na formação da fita de DNA ligada a adaptadores que se ligam a oligonucleotídeos imobilizados presentes na célula de fluxo (flow cell), sendo amplificada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em ponte e mantendo-se próximas umas das outras formando clusters, ao final, em cada uma delas terão se formado milhões de cópias do fragmento de DNA de interesse (figura 1). A partir das cópias idênticas da mesma sequência as bibliotecas são sequenciadas (Liu, *et al.* 2012).

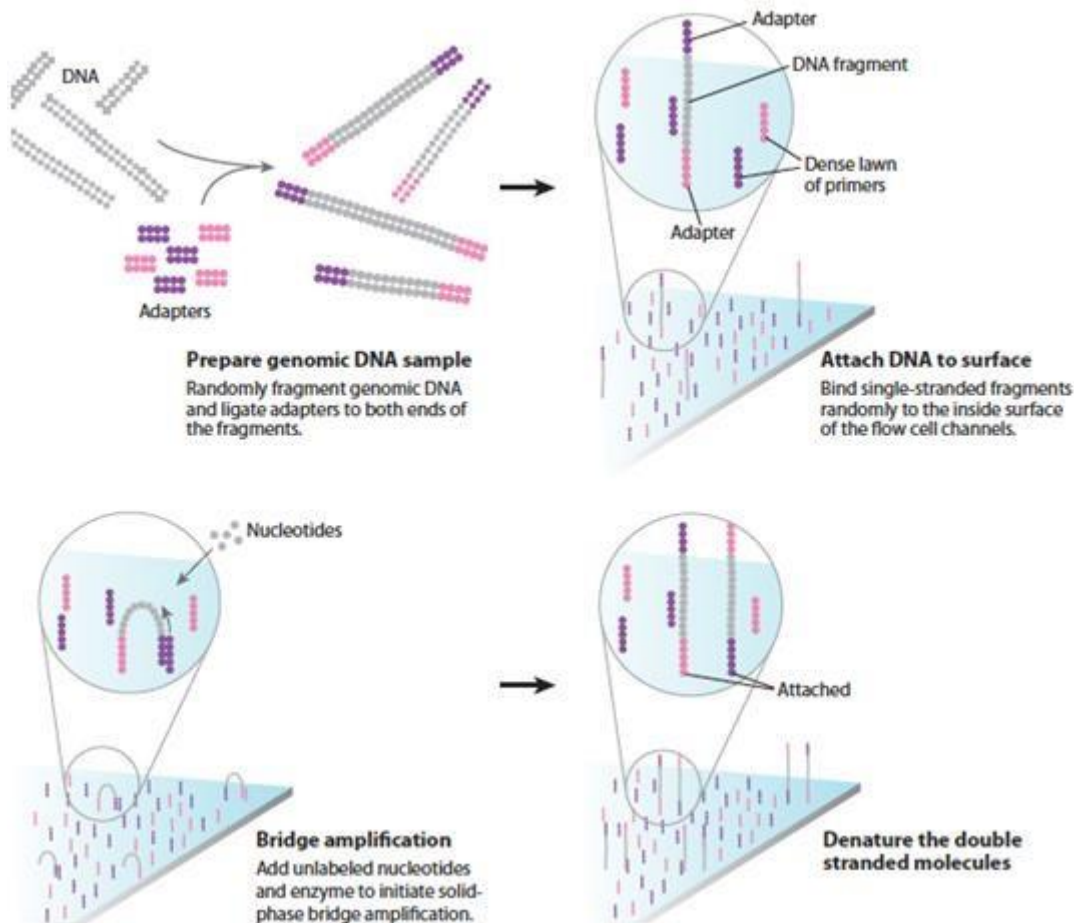
No processo de análise genômica os milhões de aglomerados são sequenciados base a base em paralelo usando quatro nucleótidos marcados com fluorescência. Após a adição de cada base complementar, os fluorocromos são excitados por um laser e a cor revelada permite a identificação da base que foi incorporada. O fluorocromo é depois retirado para permitir que a próxima base se ligue ao *template*, e então seja lida cada base adicionada por vez (Liu, *et al.* 2012).

Contudo, o sequenciador *Illumina* apresenta como características específicas uma grande geração de dados (300Mp – 15Gb), reads com capacidade de leitura de 75 – 600 pb, tempo de 4 – 40 horas de sequenciamento e análise de dados na máquina. Portanto, vem se tornando uma tecnologia revolucionária no campo da genômica, já que proporciona um sequenciamento de larga escala, grande geração de dados e apresenta uma boa relação de custo-benefício levando em consideração a qualidade e acurácia dos dados. Logo, as plataformas NGS estão sendo cada vez mais aplicadas em diferentes finalidades, a exemplo do sequenciamento de regiões específicas, genoma completo, transcriptoma, marcadores epigenéticos e, principalmente, para fins diagnósticos, relacionado a clínica médica (Liu, *et al.* 2012).

Ultimamente, a taxa de extinção das espécies tem sofrido uma rápida aceleração devido as mudanças ambientais provocadas pelas atividades antrópicas, sendo elas a fragmentação de habitat, propagação de espécies exóticas, poluição e mudanças climáticas, que ocasionam uma séria pressão sobre a biodiversidade (Pomerantz, *et al.* 2017). Uma das medidas mitigadoras para minimizar esses efeitos e de grande relevância, é a conservação, que com a ajuda de novas

técnicas, se torna cada vez mais eficaz a descrição da existência de uma população, ou mesmo espécies (Pomerantz, *et al.* 2017).

Figura 1: Sequenciamento do Illumina



Referências Bibliográficas

ANDRADE, P. A. M. A composição de comunidade bacteriana do solo como fator determinante na micorrização de cana – de - açúcar do *Glomus clarum*. f.73. Dissertação (Mestrado em Ciências – área de Solos e Nutrição de Plantas) – Curso de pós-graduação em Ciências. USP. Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2013.

ATLAS, R.M.; HAZEN, T.C. Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in U.S. history. **Environ. Sci. Technol.** 45:6709–15. 2011.

BASTIAENS, L. et al. Isolation of Adherent Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) – Degrading Bacteria Using PAH-Sorbing Carriers. **Applied Environmental Microbiology**. v. 66, p.1834-1843. 2000.

BERGA M, SZÉKELY AJ, LANGENHEDER S. Effects of disturbance intensity and frequency on bacterial community composition and function. **PLoS ONE** 7(5), e36959. doi:10.1371/ journal.pone.0036959. 2012.

BOONCHAN, S.; BRITZ, M.L.; STANLEY, G.A.. Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, p.1007-1019. 2000.

BROCK, L. *Biología de los Microorganismos*. 3ª Edición. Southern Illinois University Carbondale: Pearson Education, p.1011, 2003.

BURNS, K. A.; GARRITY, S. D.; LEVINGS, S. C. How many years until mangrove ecosystems recover from catastrophic oil spills? *Marine Pollution Bulletin*, v. 26, n. 5, p. 239-248, 1993.

CAMPANILI, M.; SCHAFFER, W. B. *Mata Atlântica: manual de adequação ambiental – Brasília: MMA/SBF, 2010.*

CARNEIRO, M. A. C.; ASSUNÇÃO, H. F.; PAULINO, H. B.; SOUZA, E. D. Desenvolvimento inicial de milho crioulo em um latossolo vermelho de cerrado submetido à esterilização. **Global Science And Technology**. Rio Verde, v. 05, n.02, p. 69 –78, 2012

CARRASCO, M. et al. Assessment of urban and industrial contamination levels in the bay of Cádiz, SW Spain *Marine Pollution Bulletin*, v. 46, n 3, p. 335-345, 2003.

CARVALHAL, F.. **Conhecendo o Manguezal Aspectos Ecológicos e Sociais**. Disponível em: <http://www.ib.usp.br/ecosteiros/textos_educ/mangue/index.htm> Acesso em 27/05/2019.

CRAPEZ, M.A.C.; BORGES, A.L.N.; BISPO, M.G.S. & PEREIRA, D.C. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. *Ciência hoje*, 30: 179. 2002.

CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T. Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. **Curr Opin Microbiol.** V.7, n.3, Jun, p. 221-6. 2004.

DE MACEDO-SOARES, P.H.M., PETRY, A.C., FARJALLA, V.F., AND CARAMASCHI, E.P. Hydrological connectivity in coastal inland systems: lessons from a Neotropical fish metacommunity. **Ecology of Freshwater Fish** 19, 7-18.2010

FARJALLA, V., AMADO, A., SUHETT, A., AND MEIRELLES-PEREIRA, F. DOC removal paradigms in highly humic aquatic ecosystems. **Environmental Science and Pollution Research** 16, 531-538, 2009

FEDE, K.L.; et al. Characterization of dilution enrichment cultures obtained from size-fractionated soil bacteria by BIOLOG^R community-level physiological profiles and restriction analysis of 16S rRNA genes. **Soil Biology & Biochemistry**: 1555-1562. 2001.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. Capítulo 1. In: GalindoLeal, C. e Câmara, I.G. (Eds). Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 3-11 pp. 2005

GENTRY, T.; RENSING, C.; PEPPER, I. New Approaches for Bioaugmentation as a Remediation Technology. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 34:447–494. 2004.

GRACE, J.B. A clarification of the debate between Grime and Tilman. *Funct. Ecol.* 5, 583 e 587. 1991.

GRAYSTON, S.J.; et al. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**: 533-551. 2001

HALLIBURTON, AD. Basic Petroleum Geology and Log Analysis. Halliburton Company. 2001.

HE, Z. Development and application of functional gene arrays for microbial community analysis **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, Oklahoma, v. 18, n. 6, p. 1319-1327, 2008.

HOLGUIN, G.; ZAMORANO, P.G.; BASHAN, L.E.D.; MENDOZA, R.; AMADOR, E. *et al.* Mangrove health in an arid environment encroached by urban development a case study. **Science of Total Environment**, 363: 260-274, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Mapa de Biomas e de Vegetação. Rio de Janeiro: IBGE. Acessível em www.ibge.gov.br. 2004

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio). Atlas dos Manguezais do Brasil / Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Brasília, 176 p. 2018

JIAO, S.; CHEN, W.; WANG, E.; WANG, J.; LIU, Z.; LI, Y.; WEI, G. Microbial succession in response to pollutants in batch-enrichment culture. **Revista Scientific Reports**. Publicado em 24 de fevereiro de 2016.

KOREN, O.; KNEZEVIC, V.; RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Petroleum Pollution Bioremediation Using Water-Insoluble Uric Acid as the Nitrogen Source Petroleum Pollution Bioremediation Using Water-Insoluble Uric Acid as the Nitrogen Source.

Appl. Environ. Microbiol. 69:6337–6339. 2003.

LACERDA, L. D. Brazil, In: **Principles for a code of conduct for the management and sustainable use of mangrove ecosystems**, CenTer/ISME/World Bank, *no prelo*. 2005.

LAGOS, A. R.; MULLER, B. L. A. Hotspot brasileiro - Mata Atlântica. Saúde & Ambiente em Revista, Duque de Caxias, v. 2, n. 2, jul. 2009

LEITE, F. C. L.; ARAÚJO, S. F. A. Ecologia microbiana do solo. Embrapa Meio-Norte Teresina. PI. Dezembro, 2007.

LEMOS, R. M.. **Degradação ambiental causada pela ocupação antrópica em área de manguezais no bairro São Domingos em Ilhéus, Ba.** 2004. 21f. Monografia (Graduação em Geografia), Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2004.

LIMA, D. F. **Biorremediação em sedimentos impactados por petróleo na baía de todos os santos, bahia: avaliação da degradação de petróleos saturados.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Bahia, Salvador.2010

LIU, L. et AL. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems - Review Article. Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2012, Article ID251364, 11 pages doi:10.1155/2012/251364. 2012.

LUNDBERG D.S., YOURSTONE S., MIECZKOWSKI P. et al. Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. **Nature Methods** v.10, p.999–1002, 2013.

MACHADO, W.; TANIZAKI, K. F.; LACERDA, L. D. Metal accumulation on the fineroots of *Rizophora mangle* L. **ISME/GIOMIS Electronic Journal**, v. 4, n. 2, 2 p. 2004

MANDRI, T. & LIN, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in KwazuluNatal, South Africa. African Journal of Biotechnology, 6 (1): 023-027. 2007.

MARIANO, A. P. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. 2006. 162 f. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2006.

MCKEW B A, COULON F, YAKIMOV MM, DENARO R, GENOVESE M, SMITHCJ, OSBORN A M, TIMMIS KN, MCGENITY TJ. Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. Environ. Microbiol. 9:1562–71. 2007

MEDEIROS, J. D.; SAVI, M.; BRITO, B. F. A. Seleção de áreas para criação de Unidades de Conservação na Floresta Ombrófila Mista. **Biotemas**, Florianópolis, v. 18, n. 2, p. 33-50, mar. 2005.

MENEGHETTI, L.R.R.. **Biorremediação na descontaminação de um solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia. Departamento de Engenharia Civil.

Universidade de Passo Fundo. 112 p. 2007

MILANELLI, JCC. **Efeitos do petróleo e da limpeza por jateamento de um costão rochoso da Praia de Barequeçaba**, São Sebastião, São Paulo. Universidade de São Paulo. 1994.

MONTEIRO, L.H.U. **Estudo das áreas de mangues entre os estados Piauí Pernambuco com um enfoque para o estado do Ceará nos anos de 1978 e 1999/2004 utilizando sensoriamento remoto**. Dissertação de Mestrado pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 98 f, 2005.

MORRISON, R.T. Química Organica, 2nd ed. San Marcos. 1985.

MUTECA, F. L. L. Biorremediação de solo contaminado com óleo cru proveniente de Angola. Dissertação de mestrado, RJ, 2012.

NIKOLOPOULOU, M.; KALOGERAKIS, N. Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons. J. Chem. Technol. Biotechnol. 84:802–807. 2009.

NUNES, G.L. **Diversidade e estrutura de comunidades da Bacteria e Archaea em solo de mangue contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 84 p. 2006

OCT - ORGANIZAÇÃO DE CONSERVAÇÃO DA TERRA. 2012, Disponível em: <<http://www.oct.org.br/>>. Acesso em 30/07/2019.

ORCUTT, B.N.; JOYE, S.B.; KLEINDIENST, S.; KNITTEL, K.; RAMETTE, A.; REITZ, A.; SAMARKIN, V.; TREUDE, T.; BOETIUS, A. Impact of natural oil and higher hydrocarbons on microbial diversity, distribution, and activity in Gulf of Mexico cold-seep sediments. Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr. 57:2008–2021. 2010.

POMERANTZ, A., *et al.* Real-time DNA barcoding in a remote rainforest using nanopore sequencing. BioRxiv preprint first posted online Sep. 15, 2017.

RAMÍREZ *et al.* ***Bacillus spp***: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. Nova. vol.15 nº.27 Bogotá Jan./June 2017.

RANJARD, L. & RICHAUME, A. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. Research Microbiology 152: 707-716. 2001

ROANE T.M., JOSEPHSON K.L., PEPPER I.L. Dual-Bioaugmentation Strategy To Enhance Remediation of Cocontaminated Soil. Appl. Environ. Microbiol. 67:3208–3215. 2001.

ROESCH, L. F. W., R. R. FULTHORPE, *et al.* Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. The ISME Journal. V.1, p.283-290, 2007.

SCHLOSS, P. D., J. HANDELSMAN. Toward a Census of Bacteria in Soil. PLoS Computational Biology. V.2, p.786-93, 2006.

SEABRA, P. N. Uso da biorremediação em áreas impactadas pela indústria do petróleo. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. *Microbiologia Ambiental*. 2.ed. Embrapa Meio Ambiente, 647p. 2008.

SEO, J.; KEYN, Y & LI, Q.X. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health* . 6: 278-309.2009.

SESSITSCH, A.; et al. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Applied and Environmental Microbiology*67: 4215-4224. 2001.

SLOAN, N. A. **Oil impacts on cold-water marine resources: a review relevant to Parks Canada's evolving marine mandate**. Occasional Paper No. 11, ParksCanada, National Parks,1999

SOGIN, M.L., MORRISON, H.G., HUBER, J.A., MARK WELCH, D., HUSE, S.M.,

NEAL, P.R., et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 12115 e 12120. 2006.

SOUZA, E. D. Desenvolvimento inicial de milho crioulo em um latossolo vermelho de cerrado submetido à esterilização. *Global Science and Technology*. Rio Verde, v.05, n.02, p.69 - 78, 2012.

STRALHER, A.N.; STRALHER, A.H. **Geografia física**. 3 ed. Barcelona: Omega,550 p. 2000.

THAPA, B.; KUMAR, K. C.; GHIMIRE, A. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*. v. 8, n. 1, 164- 170, 2012.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT, I.M. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresour. Technol.* 102:772–8. 2011

TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol.* V. 5, n. 3, Jun, p. 240-5. 2002.

TORSVIK, V.; OVREAS, L. et al. Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*. V. 296, n. 5570, May 10, p. 1064-6. 2002

TYAGI, M.; DA FONSECA, M.M.R.; DE CARVALHO, C.C.C.R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation* 22:231–41. 2011.

USBERCO, J.; SALVADOR, E. **Química** - volume único. 5ª ed. reform.— São Paulo : Saraiva, 2002.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A. & WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4): 503-549. 2003

VANNUCCI, M. **Os manguezais e nós**: um síntese de percepções. São Paulo:

EDUSP, 233 p. 1999

VENOSA, A.D.; CAMPO, P.; SUIDAN, M.T. Biodegradability of lingering crude oil 19 years after the Exxon Valdez oil spill. *Environ. Sci. Technol.* 44:7613–21. 2010.

VIDALLI, M. Bioremediation: An overview. *Journal of Applied Chemistry*, 73 (7), pp. 1163-1172, 2001.

VILELA, L. A. F.; RIBEIRO, D. O.; SANTOS, F. L.; FERREIRA, D. A.;

William D, McCain Jr. Components of Naturally Occurring Petroleum Fluids. *In: The properties of petroleum fluids*. PennWell Books. 1990

YAKUBU, M.B. Biological approach to oil spills remediation in the soil. *African Journal of Biotechnology*, 6 (24): 2735-2739. 2007.

YU K.SH, WONG A H.Y, YAU K.W.Y, WONG Y.S, TAM N.F.Y. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 51:1071–7. 2005

ZAGATTO, P.A. Ecotoxicologia. Capítulo 1. *In: ZAGATTO, P.A. & BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. Rima. São Carlos. SP. 1-13p. 2006

ZÍLIO, E.L. E PINTO, U.B. Identification and distribution of the main groups of components present in brazilian crude oils. *Boletim Técnico da PETROBRAS*, 45:21–25. 2002

CAPÍTULO I –

ESTRUTURA DA COMUNIDADE MICROBIANA
DESEDIMENTO DE MANGUEZAL DA
FLORESTAATLÂNTICA DO BAIXO SUL DA
BAHIA

INTRODUÇÃO

Considerado um dos principais biomas do Brasil, a Mata Atlântica encontra-se presente em toda porção leste do território brasileiro, apresentando formações florestais nativas (Ex: Floresta Ombrófila Densa; Floresta Ombrófila Mista, também denominada de Mata de Araucárias; Floresta Ombrófila Aberta; Floresta Estacional Semidecidual; e Floresta Estacional Decidual), além dos ecossistemas associados, como os manguezais, vegetações de restingas, campos de altitude, brejos interioranos e encaves florestais do Nordeste (Campanili; Schaffer, 2010).

Os manguezais são considerados ambientes nutritivos, com elevada importância no que diz respeito à exportação de matéria orgânica para os estuários, sendo esse material biológico decomposto por micro-organismos e transformado em nutrientes para o solo (ICMBio, 2018). Tais ambientes, também desempenham o papel de filtro biológico, garantindo a retenção de impurezas contaminantes das águas, o que permite a sua qualidade ambiental (Machado *et al.*, 2004), além de gerar uma estabilidade geomorfológica da zona costeira (Lacerda, 2005; Monteiro, 2005). Assim, esses ecossistemas apresentam tamanha relevância para qualidade do ambiente e são considerados um dos mais produtivos do planeta.

Esses ecossistemas estuarinos também funcionam como redutores de impactos ocasionados na zona costeira diante das mudanças climáticas que podem ser provocadas por mudanças da temperatura, dos regimes de chuvas, tempestades e elevação do nível do mar, além do aumento da concentração de gás carbônico (ICMBio, 2018). Portanto, as existências dos manguezais proporcionam uma minimização da vulnerabilidade das áreas continentais que podem ser acometidas por tempestades e inundações, sem contar o acúmulo de sedimentos que auxiliam na redução da destrutibilidade por processos erosivos, de assoreamento e no aumento do nível do mar (ICMBio, 2018).

A diversidade microbiana em solos de manguezais é influenciada por fatores biogeográficos, ecológicos e antropogênicos (Holguin *et al.*, 2001; Alongi, 1996). A microbiota dos ecossistemas manguezais é composta pela junção dos micro-organismos presentes em solo terrestre, marinho e de água doce (Holguin *et al.*, 2001; Alongi, 1996). Por esse motivo, esses ambientes estuarinos são considerados hotspots por sua diversidade microbiana (Liu *et al.*, 2019).

Os solos são ambientes muito complexos que inclui uma variedade de micro-

habitats físicos com diferentes gradientes descontínuos e condições ambientais, devido a interação de diferentes parâmetros, a exemplo do pH, gases, água, estrutura das partículas, mudanças climáticas e atividade biótica. Pesquisas indicam que os papéis exercidos pelo armazenamento de água, fixação de vegetais no solo e as trocas gasosas tem influência sobre a estruturado solo e, conseqüentemente, sobre diversidade microbiana, promovendo mudanças espaciais e estruturais da comunidade de micro-organismo (Ranjard & Richaume 2001; Sessitsch *et al.* 2001). Diferentes estudos demonstraram que a diversidade microbiana em solos contendo partículas menores foi maior em relação aos solos que apresentam partículas maiores; outros estudos indicam que o tipo e a quantidade de substratos orgânicos disponíveis têm uma grande influência na abundância de grupos microbianos e na sua diversidade funcional nos ecossistemas do solo (Fede *et al.* 2001; Grayston *et al.* 2001).

No geral, os solos de manguezais apresentam uma composição mineralógica bastante diversificada, além de existir uma variada diversidade de organismos que contribuem na formação e funcionamento desse ecossistema. Sendo assim, nosso estudo buscou acessar e compreender a estrutura e diversidade das comunidades microbianas autóctones presente em ecossistema manguezal situado em região de Mata Atlântica, a fim de servir como estudo referencial para outros posteriores, visto que até o atual momento não foi relatado na literatura análises da diversidade genética microbiana dos sedimentos de manguezal do Rio Santarém, localizado na Área de Proteção Ambiental do Pratigi, Bahia – Brasil e, portanto, merece relevante atenção quanto a qualidade ambiental.

OBJETIVOS

Objetivo Geral: Realizar levantamento de diversidade da comunidade microbiana autóctone em ambiente de manguezal por meio da nova geração de sequenciamento massivo.

Objetivos Específicos:

- Acessar a diversidade genética de comunidades microbianas autóctones de sedimento de manguezal utilizando a plataforma de nova geração Illumina (MiSeq);
- Estudar os Domínios Bacteria e Archaea, através dos marcadores filogenéticos, obtendo sequências de 16S rRNA para procariontes;
- Determinar a abundância relativa e a taxonomia das comunidades autóctones presentes em amostras de sedimento de manguezal;
- Servir como estudo de referência para trabalhos que venham a ser desenvolvidos posteriormente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de Estudo

O trabalho consistiu na coleta de sedimento em um ecossistema manguezal, presente no Ecopolo III da APA do Pratigi, do rio Santarém entre as coordenadas -13.721829 e -39.033586, área de Mata Atlântica, e localizada no município de Ituberá - Baixo sul da Bahia, acesso pela estrada BA-250. Com 171 mil hectares, a APA do Pratigi possui grandes remanescentes florestais e apresenta elevado valor de conservação, sendo, portanto, considerada um hotspot ambiental (OCT, 2012) (Fig.1).

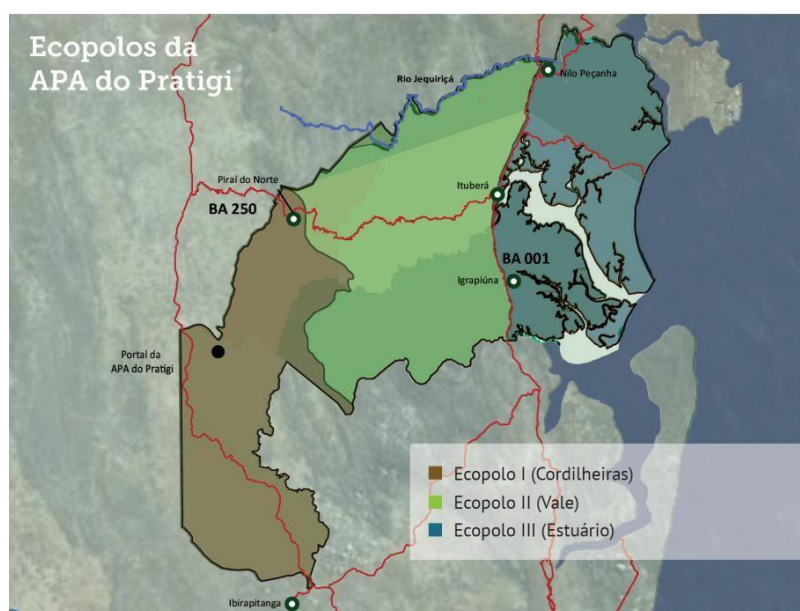


Figura 1. Ecopolos da APA do Pratigi - OCT (2012)

O Ecopolo III possui um dos mais extensos remanescentes florestais contínuos da Bahia, com 15.300 hectares de mata em diferentes estágios sucessionais. Próximo à planície costeira predomina estuários com restingas e manguezais, proporcionando áreas com diferentes tipos de solo (OCT, 2012). É uma região muito distinta dos outros Ecopolos I e II, sendo considerada como o ambiente mais diverso, por se tratar de um ambiente estuarino.

Ainda no Ecopolo III situa-se a Bacia de Camamu (BC), na região conhecida como Costa do Dendê, com uma área de 383,67 km², dessa área 44% é representada por manguezal. A BC está inserida em um rico ambiente estuarino banhada pelos

principais rios: Serinhaém, Igrapiúna, Sorojó e Marau. A Ponta do Mutá e a Ponta do Apaga-fogo são as extremidades da BC que possui, aproximadamente, 6 km de largura e onde há a comunicação da baía com o oceano (Fig. 2).

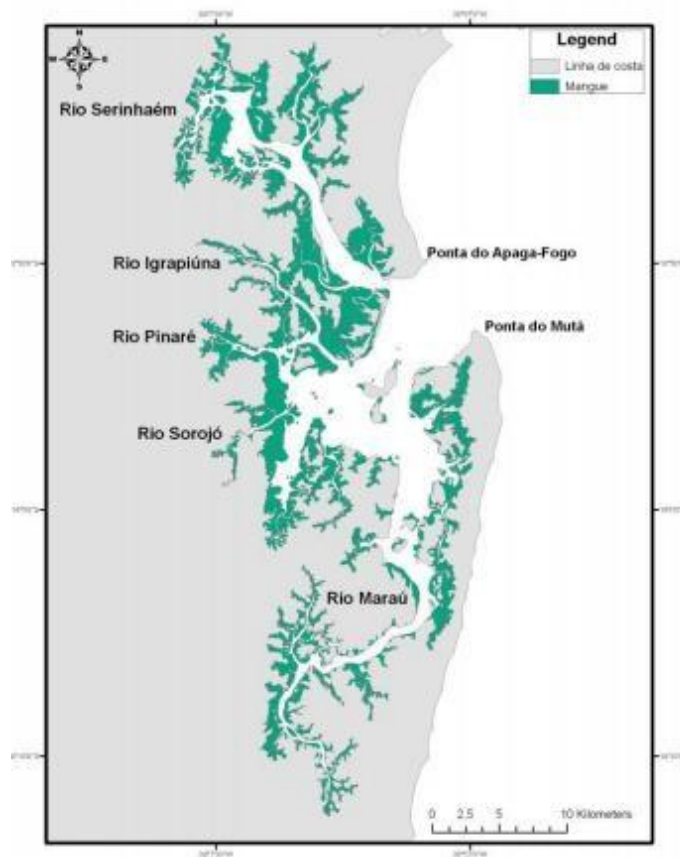


Figura 2. Baía de Camamu

Coleta do Inóculo

A coleta das amostras de sedimentos foram realizadas em um manguezal do rio Santarém, pertencente a região de Mata Atlântica (Fig. 3), no dia 05 de setembro do ano de 2018, com auxílio de um GPS (Sistema de Posicionamento Global) e termômetro para definir cada ponto (Quadro 1). Nos pontos definidos retirava-se a camada superficial que continha restos orgânicos presentes e que pudessem comprometer a qualidade das amostras. Com a ajuda de uma cavadeira manual, o trado holandês com 1,5 polegadas, próprio para perfuração de solo, foi realizada a coleta das camadas superficiais com profundidade de 0-10 cm (superficial = T) e subsuperficiais a uma profundidade de 30-35 cm (subsuperficial = B). Após a retirada do trado contendo a amostra do sedimento, as mesmas foram armazenadas em tubos falcon 50 mL, aos quais foram adicionados 5 mL de tampão dess preservante

(Dimetilsulfóxido + EDTA + Sal Saturado) e 4 mL de glicerina 5%, que ajudam a manter o DNA extraível intacto, sem degradá-lo. Em seguida, todas as amostras foram colocadas em um isopora condicionado com gelo e mantidas sob refrigeração durante todo o período de coleta e transporte até o laboratório, onde lá foram congeladas em freezer (- 80°C) até o momento da extração do DNA total. A área foi amostrada em dois pontos diferentes e em cada um deles, retirou-se três subamostras para compor uma amostra composta sendo, posteriormente, agrupadas. O P1 identificado como região de área alagada e o P2 a região que não recebe interferência da maré, onde as subamostras foram coletadas numa distância máxima de 3 m entre elas (Fig. 4).

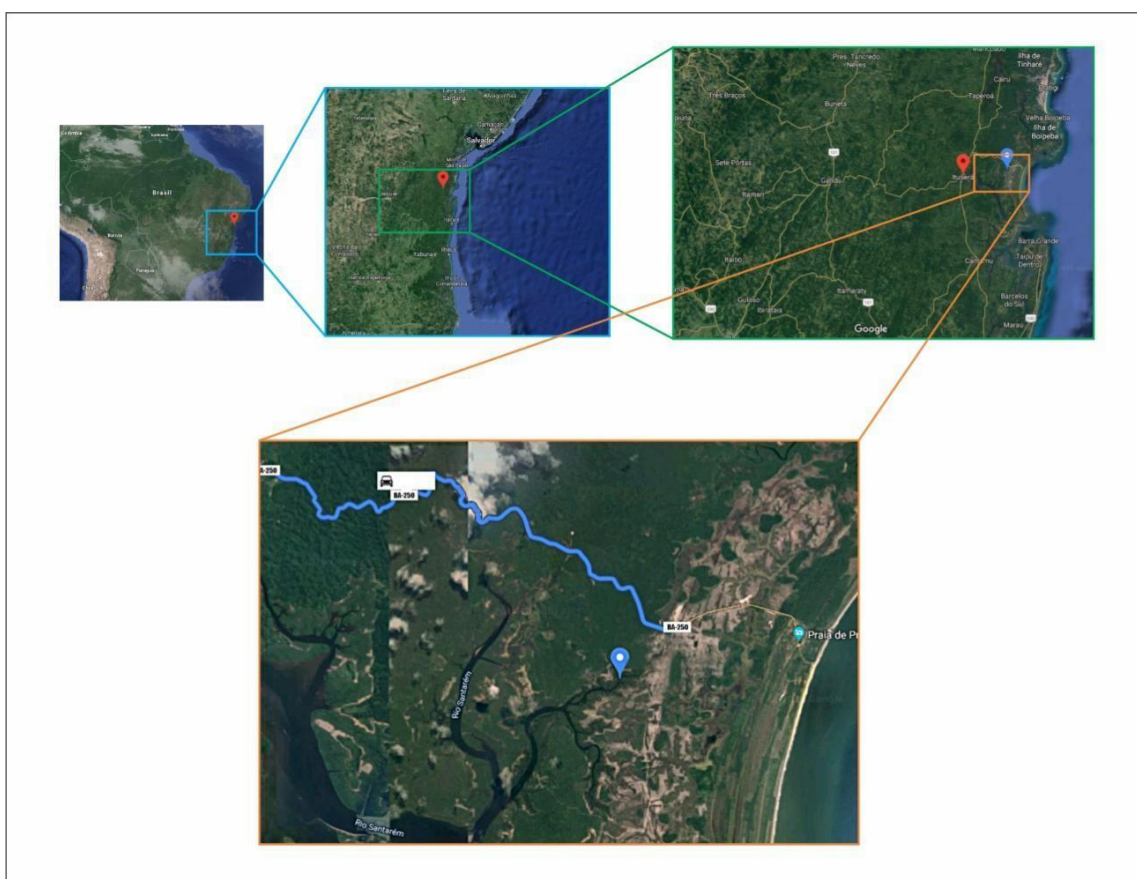


Figura 3. Imagens do google maps representando a área de coleta



Figura 4. Foto representando os dois pontos de coleta (Costa, 2018)

Quadro 1. Áreas amostradas com seus referentes pontos de georeferenciamento e temperatura do solo (°C)

PONTOS	SUBAMOSTRAS	GPS	TEMPERATURA DO SOLO °C
Área sempre alagada	1	24L0497125 UTM8483619	28° C
	1.1	24L0497109 UTM8483621	26° C
	1.2	24L0497083 UTM8483566	27° C
Área sem interferência marinha	2	24L0497166 UTM8483673	28° C
	2.1	24L0497139 UTM8483670	28° C
	2.2	24L0497151 UTM8483671	27° C

foram analisadas utilizando o QIIME 1.9.1 - Quantitative Insights Into Microbial Ecology, considerando 97% de similaridade com o banco de dados 16S SILVA (Quast et al., 2013).

Quadro 2. Informações sobre a região V4 do gene 16S ribossomal (Caporaso et al., 2012)

Região	Tamanho do fragmento	Primer	Sequência do Primer (5' - 3')
V4	292 bp	515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
		806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT

Bioinformática e Análises dos dados

Os *amplicons* das amostras de sedimentos foram submetidos a uma série de análises utilizando o programa computacional QIIME (versão 1.9.1). Este programa consiste de um pipeline para análise comparativa de comunidades microbianas em vários ambientes. A principal função desta ferramenta de bioinformática é a classificação das sequências dentro de unidades taxonômicas (por vezes até o nível de espécies), análise filogenética, análise de biodiversidade e estatística (Caporaso et al., 2011).

A Análise de Coordenadas Principais (Principal Coordinates Analysis – PCoA) foi realizada com a finalidade de demonstrar a similaridade ou distância relativa entre grupos de amostras, com base na heterogeneidade na composição das comunidades (beta diversidade) (Legendre, 2012). Esta análise permite compreender as variações na estrutura da comunidade microbiana, permitindo uma visão mais robusta da distribuição das amostras a partir da matriz de OTUs, no software QIIME (v1.9.1).

Para estimar a diversidade alfa foram utilizados três métricas: Chao1, que estima a riqueza de espécies; OTUs observadas, que estimam a quantidade de unidades taxonômicas operacionais encontradas em cada amostra; e índice de Shannon, que estima a diversidade de espécies. As curvas de rarefação foram geradas com base no número de OTUs observadas em cada tratamento. O diagrama de Venn foi gerado a partir de uma ferramenta da web (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

Determinação da Matéria Orgânica (MO) e Carbono Orgânico Total (TOC) em sedimento

Após a coleta, as amostras de sedimento foram pesadas (200 g) em balança de precisão da marca Shimadzu, modelo AY220, espalhadas em tiras de papéis metro, devidamente identificados, e secos na estufa por 48 h a 40°C (Embrapa, 2003). A seguir, as amostras secas foram armazenadas no dessecador e, após resfriamento foram pesados e mantidas em recipientes vedados até a realização dos protocolos de determinação dos teores de MO e TOC, descritas a seguir:

Método da Mufla

Iniciou-se o procedimento de determinação do teor de matéria orgânica pelo método da mufla estabelecido pela Embrapa (2017), com algumas modificações: secagem dos cadinhos de porcelana na estufa por 1h a 100°C, afim de retirar toda a umidade presente nas amostras. Após esse período os cadinhos foram armazenados no dessecador para resfriagem e pesagem. Com o auxílio da balança analítica, 2 g das amostras de sedimentos foram pesadas no cadinho e transferidas para a mufla, sendo mantidas por 6hs a 500°C. Os cadinhos contendo as amostras foram retirados da mufla para o dessecador e, em seguida, pesados. Por fim, foram realizados os cálculos de teor da M.O. através da fórmula:

$$\%M.O = (P1 - P2) \times 100 / M \text{ amostra}$$

P = massa do cadinho após estufa 100°C/
1 h; P1 = massa da amostra no cadinho;

P2 = massa da amostra no cadinho calcinado a

500°C
M amostra = P1 – P

Sendo assim, o teor de matéria orgânica foi determinado pela diferença entre a massa do solo seco em estufa e a massa do resíduo obtido após a incineração em mufla.

Digestão da amostra de sedimento em bloco digestor

Primeiramente, pesou-se 0,5 g da fração argila seca com o auxílio da balança de precisão da marca Shimadzu, modelo AY220. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos (25X250 mm) e posteriormente foram adicionados aos tubos 9 mL do ácido clorídrico (HCl) e 3 mL do ácido nítrico (HNO₃),

e colocadas no bloco digestor para ocorrer a digestão ácida assistida por micro-ondas, usando o forno Microwave GO – Anton Paar sob temperatura de 170°C por 2h (Embrapa, 2003). Após esse processo de dissolução, as amostras foram filtradas e avolumadas com água ultra-pura em balões volumétricos de 50 mL e armazenadas (Embrapa, 2003).

Determinação do Carbono Orgânico Total (TOC)

Para a realização da quantificação do carbono orgânico, inorgânico e total das amostras de sedimento, após secas e digeridas, as amostras líquidas foram analisadas manualmente através do equipamento Multi N/C 2100 - Analytik Jena seguindo as instruções do produto. O valor do carbono orgânico total (TOC) foi definido através da fórmula: $C \text{ total} = C \text{ orgânico} + C \text{ inorgânico}$.

RESULTADOS

Índice de diversidade da comunidade microbiana autóctone em sedimento de mangue da Mata Atlântica

Para assegurar maior confiabilidade dos resultados, as amostras foram trabalhadas em triplicatas até a realização das extrações, que foram preparadas utilizando os pools das subamostras coletadas, gerando no total 4 amostras (P1= superficial e subsuperficial; P2= superficial e subsuperficial). As sequências efetivas foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) considerando 97% de similaridade através do banco de dados SILVA. O número de OTUs das 4 amostras variou no intervalo de 11495.500 para 15996.500, usando nível de corte de 3% (Tabela 1), sendo a amostra P2B contendo o menor número de OTUs e a amostra P1B o maior número de OTUs, ou seja a P1B apresentou maior riqueza e diversidade em relação as demais amostras. O índice de riqueza (chao1) revelou que a amostra P2T obteve o índice de menor riqueza e a amostra P2B o menor índice de diversidade (Tabela 1). A curva de rarefação das 4 amostras representadas revela que o platô foi alcançado, indicando que as quantidades das sequências foram suficientes para demonstrar a diversidade total do ambiente (Fig. 6).

Sample ID	Seqs/Sample	chao1 Ave	observed_otus Ave.	shannon
P1T	100000.0	25373.762	15324.500	5.452
P1B	100000.0	26180.600	15996.500	5.499
P2T	100000.0	14448.211	11902.600	4.409
P2B	100000.0	15864.612	11495.500	4.398

Tabela 1. Sequências das 4 amostras e índices de diversidade do estudo

No presente estudo, as OTUs geradas pelas sequências parciais do gene 16S rRNA da região V4 detectou 72 grupos referentes ao nível taxonômico de filo, sendo 25 identificados, onde dessas, 3 são pertencentes ao Domínio Archaea: *Crenarchaeota*; *Euryarchaeota* e *Parvarchaeota*, representando cerca

de 12% do total de taxa, e 22 filas fazem parte do Domínio Bactéria, que representou a maior parte de taxa, com aproximadamente 83%, sendo elas: *Acidobacteria*; *Actinobacteria*; *Armatimonadetes*; *Bacteroidetes*; *Caldithrix*; *Chlamydiae*; *Chlorobi*; *Chloroflexi*; *Cyanobacteria*; *Elusimicrobia*; *Fibrobacteres*; *Firmicutes*; *Fusobacterix*; *Gemmatimonadetes*; *Lentisphaerae*; *Nitrospirae*; *Planctomycetes*; *Poribacteria*; *Proteobacteria*; *Spirochaetes*; *Tenericutes*; e *Verrucomicrobia* (Fig. 7). Os sedimentos coletados no manguezal da Mata Atlântica resultaram em 118 mil reads cada amostra.

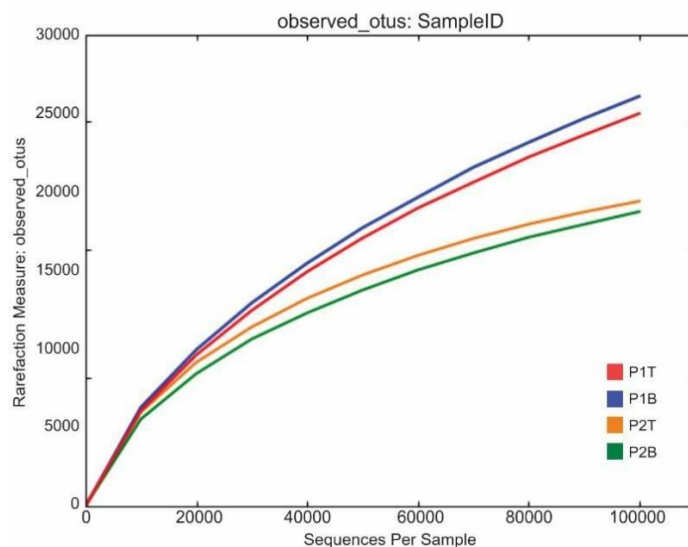


Figure 6. Curva de rarefação para OTUs da comunidade microbiana das quatro amostras de sedimento do ecossistema de manguezal

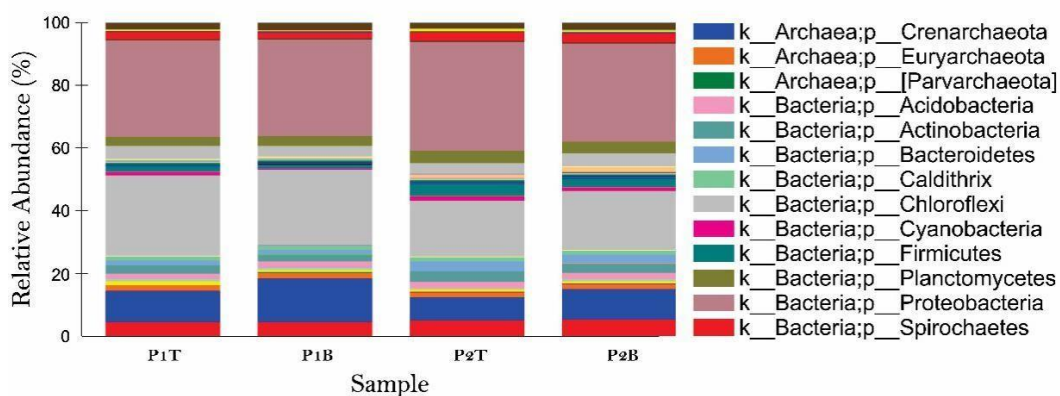


Figure 7. Abundância relativa dos principais grupos no nível de filo da comunidade microbiana nas quatro amostras de sedimentos no ecossistema de mangue

A detecção dos 22 filios presentes e identificados do Domínio das Bactérias demonstraram que os 10 filios mais presentes foram: *Proteobacteria* (31,8%), *Chloroflexi* (21,5%), *Planctomycetes* (3,3%), *Actinobacteria* (2,7%),

Spirochaetes (2,5%), *Bacteroidetes* (2,2%), *Firmicutes* (2,2%), *Acidobacteria* (2,0), *Caldithrix* (1,3%) e a *Cyanobacteria* (1,0) (Fig. 7). O filo *Proteobacteria* predominou em todas as 4 amostras, todavia as porcentagens foram maiores nas amostras P2T e P2B (34,54% e 31,22% do total de sequências de cada amostra, respectivamente) e menores nas amostras P1T e P1B (30,8% e 30,7% de todas as sequências geradas em cada amostra, respectivamente). *Chloroflexi* foi o segundo filo considerado mais abundante por todas as amostras, apresentando-se em maior proporção em P1T e P1B (25,5% e 23,9% de cada amostra, respectivamente) e menores proporções em P2T e P2B (17,6% e 18,9% para cada uma das amostras, respectivamente). As *Planctomycetes*, que foi o terceiro filo mais abundante, teve sua porcentagem mais expressiva nas amostras P2T e P2B (3,9% e 3,6%, respectivamente), e menor porcentagem em P1T e P1B (2,9% e 3,0%, respectivamente). *Actinobacteria* foi encontrada em maior quantidade em P2T e P2B, 3,3% e 2,9%, respectivamente, já nas amostras P1T e P1B em menor quantidade, 2,5% e 2,0%, respectivamente. *Spirochaetes* teve sua porcentagem maior nas amostras P2T e P2B, com uma diferença mínima, 2,8% e 2,9%, respectivamente, e menor em P1T e P1B, 2,4% e 1,9%, respectivamente (Fig. 7).

Os filios *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, ambos apresentaram maior abundância na amostra P2T (3,1% e 3,5%, respectivamente) e menor abundância na amostra P1B (1,6% e 1,2%, respectivamente). *Acidobacteria* (2,2%), *Caldithrix* (1,4%) e a *Cyanobacteria* (1,5%) tiveram maiores OTUs nas amostras P2B, P1B e P2T, respectivamente, enquanto que nas amostras P1T e P1B (1,9%), P2T (1,1%) e P1B (0,4%) obteve-se menores valores de OTUs (Fig. 7). Sendo assim, a abundância da diversidade microbiana de cada filo difere em porcentagem entre as 4 amostras estudadas. Contudo, nenhuma das amostras demonstrou ter uma composição mais distinta que outra. Além disso, é possível perceber que as amostras do P1 são mais similares entre si, assim como as amostras do P2, onde as amostras superfície e subsuperfície também são bastantes similares, porém há uma certa distinção sobre o perfil vertical do P1 em relação ao P2. Nota-se que o filo *Proteobacteria* apresenta maior abundância no P2, em ambas as amostras de superfície e subsuperfície, do que quando comparada ao P1, superfície e subsuperfície, todavia o segundo filo mais abundante apresenta o resultado inverso, tal filo encontra-se em maiores proporções no P1 (Fig. 7).

No filo *Proteobacteria* as três classes mais abundantes em todas as amostras foram as *Deltaproteobacteria* (26,5%), *Gammaproteobacteria* (2,6%) e *Alphaproteobacteria* (2,2%), porém não houve diferenças proporcionais significativas entre as mesmas. A classe *Deltaproteobacteria* teve maior presença na amostra P2T (29%) e menor abundância na amostra P1T (24,4%), as *Gammaproteobacteria* apresentou maior abundância no P1T (3,6%) e menor destaque no P2B (1,5%), já as *Alphaproteobacteria* foram detectadas com maior abundância na amostra P2T (2,9%) e menor no P2B (1,5%) (Fig. Sup. 8).

De acordo com o filo *Chloroflexi*, *Dehalococcoidetes* (12,5%) e *Anaerolineae* (7,7%) foram as duas principais classes detectadas nas 4 amostras do estudo, divergindo proporcionalmente entre elas. Contudo, as *Dehalococcoidetes* apresentou maior proporção na amostra P1B (14,6%) e menor na amostra P2T (10%) e a classe *Anaerolineae* foi encontrada em maior abundância no P1T (9,9%) e menor no P2B (6,4%) (Fig. Sup. 8).

Dentro da classe *Deltaproteobacteria* as ordens *Desulfobacterales* (7,1%), *Desulfarculales* (6,6%) e *Syntrophobacterales* (4,7%) foram as principais. Sendo que as *Desulfobacterales* tiveram maior porcentagem na amostra P2T (10,1%), menor no P1T (4,8%), as *Desulfarculales* também apresentou maior porcentagem no P2T (7,4%) e menor porcentagem na amostra P1B (5,5%), e por fim as *Syntrophobacterales*, seguiu o mesmo padrão das *Desulfarculales*, foram mais abundantes na amostra P2T (5,9%) e menos abundante no P1B (3,8%) (Fig. Sup. 9).

Na classe *Dehalococcoidetes* as *Dehalococcoidales* (10,1%) foi a ordem mais abundante, destacando-se em maior proporção na amostra P1B (11,8%) e em menor proporção no P2T (8,3%) (Fig. Sup. 9).

O Domínio Archaea apresentou maior proporção do filo *Crenarchaeota* em todas as amostras (10,2%), seguido do *Euryarchaeota* (1,8%) e *Parvarchaeota* (0,1%), respectivamente. O filo *Crenarchaeota* se mostrou mais expressivo na amostra P1B (13,7%) e menor na amostra P2T (7,4%), o filo *Euryarchaeota* apresentou o mesmo padrão na amostra P1B (2,1%) e menor porcentagem em ambas as amostras, P2T e P2B (1,5%), já o filo *Parvarchaeota* demonstrou-se praticamente inexpressiva, com 0,1%, surgindo apenas na amostra P2B (Fig. 7).

O resultado da análise de coordenadas principais (PCoA) gerou uma explicação de 100,0 % do total da variância amostrada dos sítios. Sendo que 73.75 %, 18.07 % e 8.18 % explicando na PC 1, 2 e 3, respectivamente. É

importante notar essa porcentagem de variação indicada nos eixos, uma vez que o eixo vertical representa uma menor porcentagem do que o eixo horizontal. Com

o gráfico obtido é possível observar que houve diferenças entre os pontos de coleta, onde as estruturas da comunidade bacteriana de Mata Atlântica geraram grande dissimilaridade entre as comunidades bacterianas dos sedimentos de solo do sul da Bahia (Fig. 10).

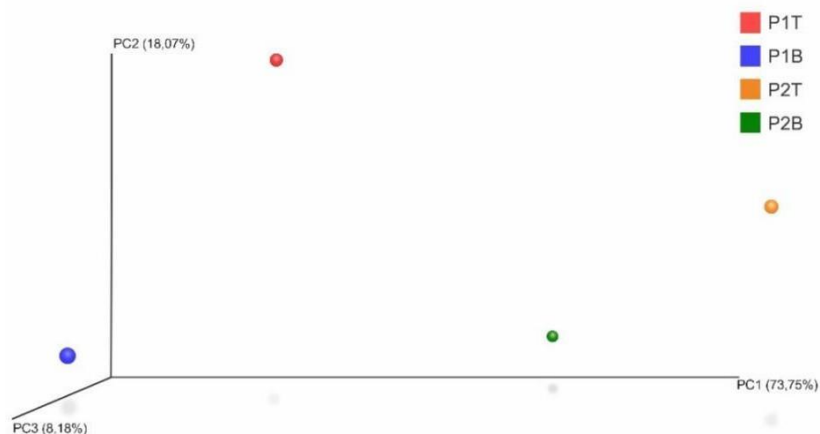


Figure 10. Principal coordinate analysis results with weighted QIIME in the four sediment samples in the mangrove

Através do resultado gerado das curvas de rarefação pode-se observar que com o aumento do número de sequências as curvas tornaram-se mais planas, o que sugere que o sequenciamento foi suficiente para cobrir o total das espécies bacterianas presentes nas amostras coletadas, admitindo-se que as 4 amostras conseguiram atingir o platô. A curva de rarefação mostra a maior riqueza de espécies na amostra P1B, com variação entre as quatro amostras de mangue, e a menor unidade taxonômica operacional foi demonstrada pelo P2B (Fig. 6).

De acordo com o diagrama de Venn, utilizado para agrupar elementos de um conjunto, a cobertura e a riqueza da diversidade foram calculadas para cada conjunto de dados. A amostra P1T demonstrou a maior riqueza de exclusivas (6,7% - 63 OTUs) em comparação com as outras amostras ao nível de 97% de similaridade (Fig. 11), e a amostra P1B foi a que apresentou menor riqueza (2,3% - 22 OTUs). Os resultados mostraram que 531 OTUs (56,2 %) foram compartilhadas por todas as amostras e o número de OTUs exclusivas totalizou 132 (14%).

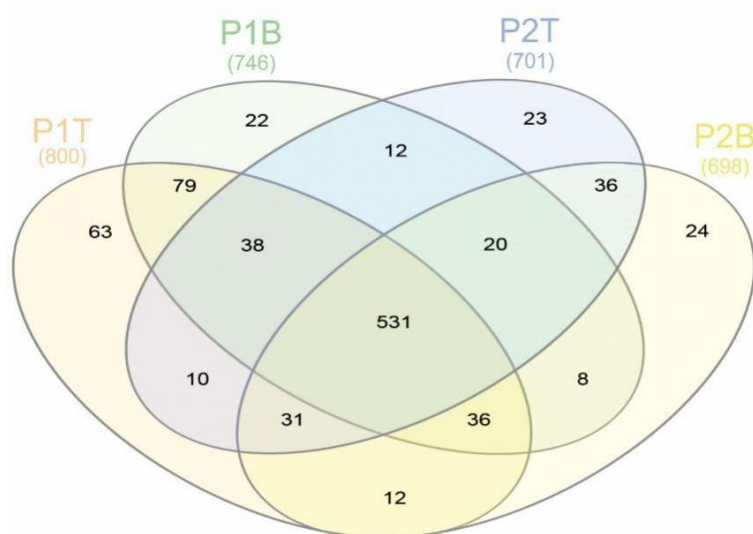


Figure 11. Venn diagram of 16S rRNA gene sequences from soil sediments of the State of Bahia, totaling 945 Operational Taxonomic Units (OTUs)

Estrutura da comunidade microbiana autóctone presente na superfície (Top) e subsuperfície (Bottom) do sedimento de mangue da Mata Atlântica

O número de OTUs contendo as amostras superficiais (Top) e subsuperficiais (Bottom) de sedimento variou entre 5155.100 e 5550.600, respectivamente, usando o nível de corte à distância de 3% (Tabela 2). O índice de riqueza de chao1 revelou que a camada subsuperficial apresenta maior riqueza em relação a camada superficial da região do referente estudo. Contudo, o valor de Shannon estimou a diversidade microbiana da camada superficial como maior. A curva de rarefação indicou que são camadas distintas, além de revelar que a curva não conseguiu atingir o platô (Fig. 12).

Sample ID	seqs/sample	chao1 ave	observed_otus Ave	Shannon
T	19500.0	9017.778	5155.100	5.95
B	19500.0	10217.460	5550.600	5.07

Tabela 2. Sequências das 2 amostras (Superfície e Inferior) e índices de diversidade do estudo

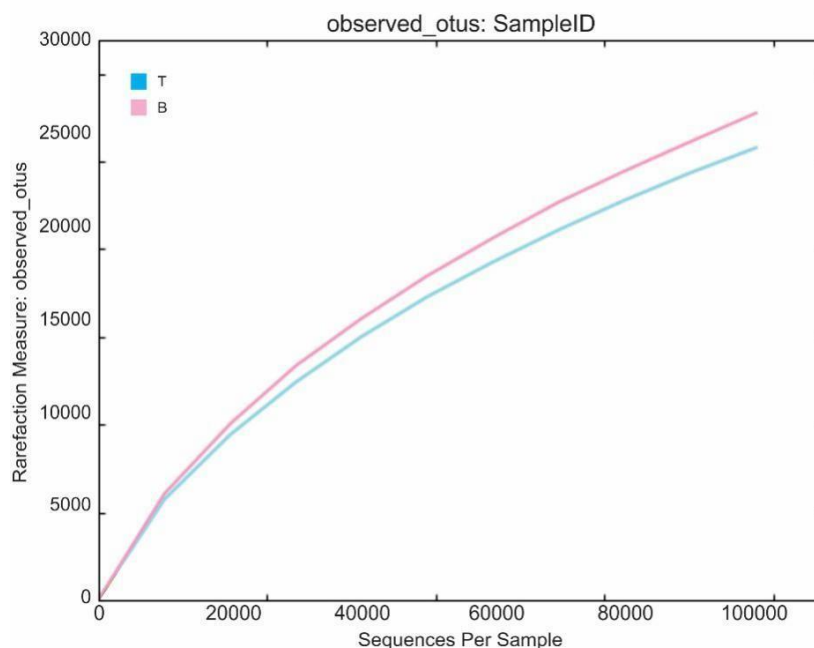


Figura 12. Curva de rarefação para OTUs da comunidade microbiana das duas amostras de sedimento (Superfície e Inferior) do ecossistema manguezal

As OTUs geradas pelas sequências parciais do gene 16S rRNA da região V4 detectou 73 grupos referentes ao nível taxonômico de filo, sendo 25 identificados, onde dessas: 3 pertencem ao Domínio Archaea: *Crenarchaeota*; *Euryarchaeota* e *Parvarchaeota* e, 22 filas fazem parte do Domínio Bactéria: *Acidobacteria*; *Actinobacteria*; *Armatimonadetes*; *Bacteroidetes*; *Caldithrix*; *Chlamydiae*; *Chlorobi*; *Chloroflexi*; *Cyanobacteria*; *Elusimicrobia*; *Fibrobacteres*; *Firmicutes*; *Fusobacterix*; *Gemmatimonadetes*; *Lentisphaerae*; *Nitrospirae*; *Planctomycetes*; *Poribacteria*; *Proteobacteria*; *Spirochaetes*; *Tenericutes*; e *Verrucomicrobia* (Fig. 13).

A camada superficial e subsuperficial foram compostas pelos 10 principais filas do Domínio bactéria: *Proteobacteria* (60,8%), *Chloroflexi* (9,9%), *Planctomycetes* (3,9%), *Bacteroidetes* (3,1%), *Acidobacteria* (2,3%), *Cyanobacteria* (2,2%), *Actinobacteria* (2,1%), *Firmicutes* (2,0%), *Spirochaetes* (1,3%) e *Gemmatimonadetes* (1,1%). O filo *Proteobacteria* foi predominante em ambas as camadas, ganhando maior destaque na camada subsuperficial (42,2%) e menor na camada superior (33,9%). Assim, no filo *Proteobacteria*, as três classes mais representativas foram as *Gammaproteobacteria* (29,1%), *Alphaproteobacteria* (18,5%) e a *Deltaproteobacteria* (12%), contudo as proporções variaram entre as amostras (Fig. 13).

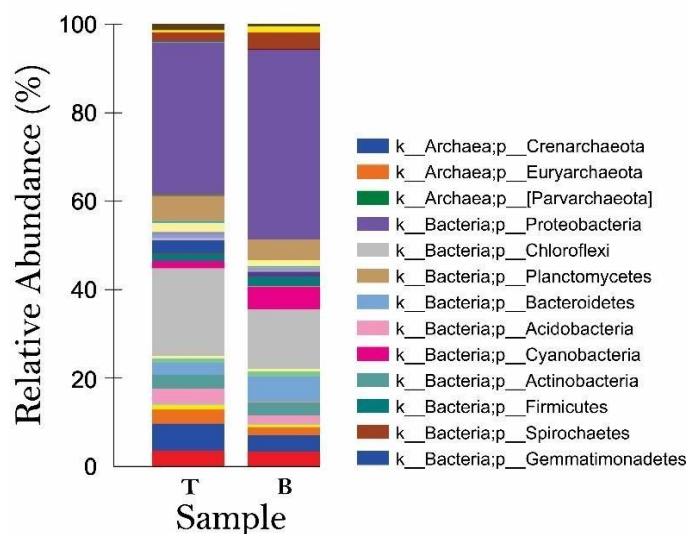


Figura 13. Abundância relativa de grupos principais no nível de filo da comunidade microbiana nas duas amostras de sedimentos (Superior e Inferior) no ecossistema de mangue

A classe, com maior abundância em todas amostras, *Gammaproteobacteria*, apresentou sua abundância relativa muito similares aos dois ambientes, sendo mais abundante na amostra B do que na amostra T (8,6% e 8,4%, no filo *Proteobacteria*, respectivamente). *Alphaproteobacteria* foi a classe que esteve presente em maior porcentagem em B (10,1%) e menor em T (7,4%). Já a classe *Deltaproteobacteria* apresentou maiores proporções para a amostra B (22,7%) e menores proporções em T (18%) (Fig. Sup. 14).

O filo de segunda maior abundância, representado pelo *Chloroflexi* obteve maior porcentagem na amostra T (19,5%) e menor porcentagem na amostra B (13,3%) (Fig. 13). *Chloroflexi* foi representado pelas classes: *Anaerolineae* (7,2%) e *Dehalococcoidetes* (1,8%), sendo a *Anaerolineae* mais abundante na amostra superficial (10,6%) e menos abundante na amostra subsuperficial (8,1%) e a classe *Dehalococcoidetes* também apresentou maior porcentagem na amostra superficial com 6,7%. Já na camada subsuperficial esse valor foi menor, com 4,3% (Fig. Sup. 14).

O *Planctomycetes*, terceiro maior filo, apresentou maior abundância no T (6%) e menor no B (4,7%) (Fig. 13). Logo, a classe *Planctomycetia* é a que apresenta maior valor percentual (2,2%) no filo *Planctomycetes*, sendo distribuído entre a amostra de subsuperfície (3,2%), que representa o maior valor de abundância, e a amostra de

superfície (2,6%), com menor porcentagem (Fig. Sup. 14).

Bacteroidetes foi o filo que predominou na amostra B (5,4%) com o dobro do valor da abundância que apresentou na amostra T (2,5%). A *Acidobacteria* foi mais abundante na amostra alagada (3,5%) e menos abundante na área sem interferência marinha (1,9%). *Cyanobacteria* apresentou abundância três vezes maior na amostra B (5,1%) que na amostra T (1,6%). *Actinobacteria* não apresentou uma diferença tão significativa, sendo mais abundante em T (3,1%) e menos abundante em B (2,9%) (Fig. 13).

No Domínio Archaea as amostras de superfície e subsuperfície gerou maior proporção dos filos *Crenarchaeota* em todas as amostras (1,9%), seguido do *Euryarchaeota* (1,1%) e *Parvarchaeota* (0,1%), respectivamente. Onde destes, o *Crenarchaeota* foi dominante na amostra de superfície (6,1%) e menos dominante na amostra de subsuperfície (3,6%). Esse mesmo comportamento se repete no segundo filo mais abundante das Archaea, *Euryarchaeota*, maior porcentagem na área T (2,9%) e menor no B (1,7%). Os valores de *Parvarchaeota* foi muito irrisório, chegando a apenas 0,1% na amostra de região alagada (Fig. 13).

A respeito do resultado sobre a análise da componente principal (PCoA) gerou uma explicação de 85,74% do total da variância amostrada dos sítios. Sendo que 57,65 %, 18,56% e 9,53% explicando na PC 1, 2 e 3, respectivamente. Essa porcentagem de variação indicada nos eixos demonstra que o eixo vertical representa uma menor porcentagem do que o eixo horizontal. Com o gráfico obtido é possível observar que há diferença entre os pontos (área alagada e a área sem interferência marinha) de coleta, onde as estruturas da comunidade bacteriana dessa localidade são divergentes quanto a camada superficial e subsuperficial (Fig. 15), indicando diferenciação diante da estrutura microbiana a uma profundidade de 0-10 cm, comparada a estrutura microbiana a uma profundidade de 30-35 cm.

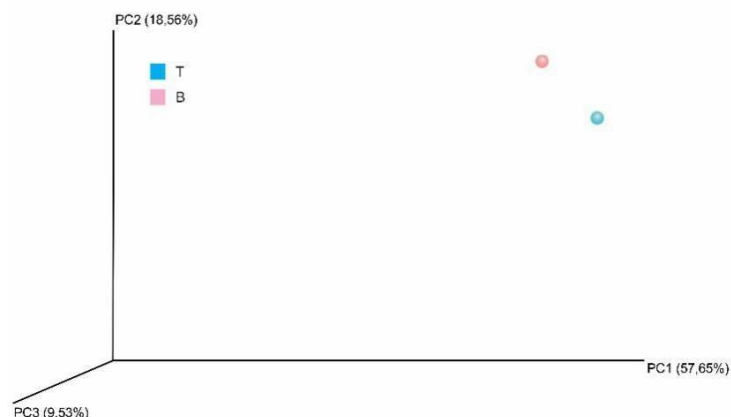


Figura 15. Resultado da Análise de coordenadas principais (PCoA) com QIIME ponderado nasduas amostras (Superfície e Inferior) no manguezal

Através do resultado gerado das curvas de rarefação observar-se que as amostras não conseguiram atingir o platô, o que sugere que o sequenciamento não foi suficiente para cobrir o total das espécies bacterianas presentes nas amostras coletadas. A curva de rarefação mostra a maior riqueza de espécies na amostra subsuperficial (30-35 cm), sendo a menor unidade taxonômica operacional demonstrada pela amostra superficial (0-10 cm) (Fig. 12).

De acordo com o resultado do diagrama de Venn, utilizado para agrupar elementos de um conjunto, a cobertura e a riqueza da diversidade foram calculadas para cada conjunto de dados. A amostra PT demonstrou maior número de OTUs (18,3 % - 197 OTUs), com quase o triplo da riqueza de OTUs exclusivas em comparação a outra amostra, ao nível de 97% de similaridade, portanto a amostra PB apresentou menor riqueza (6,1 % - 66 OTUs). Os resultados mostraram que 813 OTUs (75,5 %) foram compartilhadas pelas duas amostras e o número de OTUs exclusivas totalizou 263 (24,4 %) (Fig. 16).

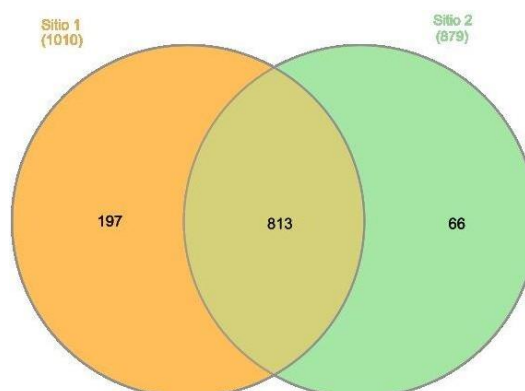


Figura 16. Diagrama de Venn das sequências do gene 16S rRNA (Superior e Inferior) de sedimentos do solo da Bahia, totalizando 1076 Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs)

Determinação dos componentes orgânicos: Matéria Orgânica (MO) e Carbono Orgânico Total (TOC) em sedimento

Os sedimentos do rio Santarém presentes nas regiões de área alagada (P1) e sem interferência marinha (P2), de acordo com as camadas superficiais (T) e subsuperficiais (B) apresentaram o teor de matéria orgânica variando entre 4,14% (P1B) e 1,4% (P2T). Os valores de carbono orgânico total variaram de 36,37 mg/l (P1B) e 59,58 mg/l (P2T), resultados presentes na Tabela 3. Portanto, nota-se que as camadas subsuperficiais apresentam maior porcentagem de MO e menores valores de TOC, quando comparados as camadas superficiais. O P1 apresentou valores relativamente próximos de ambos componentes orgânicos, sendo que os valores se mostraram inversamente proporcionais: na camada superficial observa-se menor teor de MO, porém maior valor de TOC, já na camada subsuperficial esses resultados se mostraram contrários. No P2 os componentes orgânicos apresentaram diferenças significativas, porém o padrão desses valores da camada superficial e subsuperficial se manteve como no P1: menor MO, maior TOC (superficial) e maior MO, menor TOC (subsuperficial) (Tabela 3) (Quadro sup. 3).

Amostras	M.O %	T.O.C (mg/l)
P1T	3,71	39,91
P1B	4,14	36,37
P2T	1,4	59,58
P2B	3,59	50,56

Tabela 3. Amostras com os valores de MO e TOC

Análise de HTP (Hidrocarbonetos Totais do Petróleo)

Os resultados indicadores de hidrocarboneto alceno revelaram que o perfil cromatográfico das amostras dos sedimentos obteve baixa abundância molecular dos carbonos n-C₈ a n-C₄₀, com exceção das amostras P2T e P2B, assim como os isoprenóides pristano e fitano, sendo tais grupos pertencentes aos biomarcadores do petróleo. Porém, o C₃₃ é o carbono que se destaca com abundância molecular três vezes maior que o valor dos demais na amostra P1T (Fig. Sup.17), na amostra P1B o carbono C₃₅ apresentou o mesmo destaque (Fig. Sup.18), já nas amostras P2T e P2B outros carbonos tornaram-se mais evidentes (Fig. Sup.19 e 20).

Sobre os isoprenóides, pristano e o fitano, obteve-se valores <1 em todas as amostras, assim como o valor da relação pristano/fitano também gerou resultados <1. Para a relação de n-C₁₇/Pristano e n-C₁₈/Fitano os maiores valores encontrados apresentaram n-C₁₇/Pristano <1 e a n-C₁₈/Fitano >1, 0,24 mg/Kg e 2,30 mg/Kg, respectivamente, referentes a amostra P1T, estes resultados podem ser complementados pelo valor encontrado em UCM, 180,43 mg/Kg, na amostra P2B que é a mais alta em relação as demais (Quadro Sup. 4, 5, 6 e 7).

DISCUSSÃO

Os resultados da estrutura e diversidade microbiana revelaram que o ambiente da APA do Pratigi, não apresenta características de região completamente pristina, havendo indícios de contaminação por hidrocarbonetos do petróleo. Portanto, o ambiente que tínhamos como área de referência de comunidades microbianas, já não apresenta tal perfil.

Nos últimos anos, muitos trabalhos sobre estrutura e diversidade microbiana tem ganhado destaque em ecossistemas de manguezais. De acordo com os estudos de Liu et al. (2019), Zhang et al. (2017) e Zhang et al. (2018) foi revelado uma maior abundância do filo *Proteobacteria*, bem como foi apresentado nos resultados do levantamento realizado em sedimento da APA do Pratigi, sul da Bahia – Brasil. Todavia, o trabalho de Liu et al. (2019) revelou que a porcentagem mais alta desse filo chegou a 53,53% e nos resultados do estudo de Zhang et al. (2018) esse mesmo filo revelou um valor de abundância de 85%, sendo que no presente estudo este mesmo filo chegou a 60,8%, gerando uma porcentagem intermediária aos trabalhos citados.

O filo *Chloroflexi*, segundo mais abundante no referente estudo, foi encontrado em menores abundâncias nos estudos citados anteriormente, chegando a 16,3% no ambiente de estudo de Liu et al. (2019) e 4,6% por Zhang et al. (2018), no atual estudo a porcentagem também apresentou valores intermediários a esses trabalhos, com 9,9%. Estudos anteriores demonstram que a presença expressiva desses micro-organismos (*Proteobactéria* e *Chloroflexi*) indica que houve a presença do contaminante e, portanto, configura-se com características de solo degradado, que também pode indicar a ocorrência de micro-organismos autóctones no sedimento do manguezal, que apresentem a capacidade de degradar compostos do hidrocarboneto (Zhang et al., 2017; Liu et al., 2019; Zhang et al., 2018; Nunes, 2006). Isto pode ser confirmado por estudos anteriores que demonstram a ocorrência de micro-organismos autóctones, em ecossistemas manguezais, com capacidade e potencial de metabolizar hidrocarbonetos (YU et al., 2005; BRITO et al., 2006; LANG et al., 2016).

Nota-se que o filo *Proteobacteria* apresenta maior abundância no P2, em ambas as amostras, de superfície e subsuperfície, do que quando comparada ao P1, superfície e subsuperfície, todavia o o segundo filo mais abundante, *Chloroflexi*, apresenta o resultado inverso, onde as maiores proporções encontram-se no P1. Tal

resultado também pode ser observado em Liu et al., (2019).

O destaque ao nível de alta abundância do filo *Proteobacteria* foi observado tanto nesse estudo como corroborado os trabalhos de Liu et al., (2019), Zhang et al. (2018), Zhang et al. (2017) e Nunes (2006), portanto nos leva a crer que é um grupo bacteriano cosmopolita em ecossistemas manguezais, até mesmo porque dentro do Domínio bactéria, as *Proteobacteria* são um dos maiores filios (Garrity et al., 2004).

As *Proteobacterias* são bactérias comuns em ambientes marinhos podendo ser aeróbicas, anaeróbicas, autotróficas ou heterotróficas (Margulis; Schwartz, 1998), além de ser um grupo eficiente na degradação de hidrocarbonetos, como também de componentes aromáticos, halifáticos e estruturas moleculares (Atlas, 1981), o trabalho de Hayes e Lovely (2002) também sugere que algumas *Proteobacterias* tenham função sulfato-redutoras e, portanto, importância na ciclagem do S no solo do ambiente de manguezal. Este mesmo filo é representado por 5 classes: *Alphaproteobacterias*, *Betaproteobacterias*, *Gammaproteobacterias*, *Epsilonproteobacterias* e as *Deltaproteobacterias*, sendo as *Deltaproteobacterias* a classe mais abundantes no sedimento da região de coleta.

Micro-organismos redutores de sulfato tem importante papel na degradação anaeróbica da matéria orgânica em solos marinhos (Clark et al., 1998) que é mediada pela classe *Deltaproteobacteria*, na qual abarca micro-organismos redutores de sulfato, especificamente as *Desulfobacterales*. No atual estudo, essa ordem de bactéria foi a mais dominante em todas as amostras e o mesmo resultado pode ser observado no trabalho de Liu et al. (2019) e Fan et al., 2012, o que sugerem que as *Desulfobacterales* contribuiu para a degradação do sulfato em ecossistemas manguezais, assim como também são abundantes em solos poluídos, onde podem estar associados com a degradação de hidrocarbonetos (Leloup et al., 2009; Orphan et al., 2001). Os resultados do estudo de Taketani et al (2009) e Taketani et al (2010) relatam a estimulação desse grupo sob a presença de contaminação por óleo, sugerindo que ambientes de manguezal apresentam além dos elevados teores de matéria orgânica, altos índices de poluentes. Porém não apenas as *Desulfobacterales* tendem a apresentar essas funções em ecossistema manguezal, como também as ordens *Desulfarculales* e *Syntrophobacterales*, e são a segunda e terceira ordens mais abundantes, respectivamente, encontradas no sedimento do mangue do rio Santarém.

Segundo Zhang et al., 2017, em seu trabalho, foi realizado um comparativo da comunidade microbiana em dois ambientes, degradado e saudável, sendo que no

ambiente de solo degradado, houve maior ocorrência dos grupos *Proteobacteria*, *Acidobacteria* e *Bacteroidetes*. Contudo, em solo saudável estavam presentes em maior abundância os filos *Actinobacteria* e *Firmicutes*.

Em relação ao filo *Chloroflexi* são conhecidos como aeróbios facultativos, porém não geram oxigênio durante o processo de fotossíntese, sendo assim realizam fotossíntese anoxigênica. Também são bactérias que apresentam a capacidade de decompor a matéria orgânica, além de consumir carboidratos em ambientes contaminados (Yamada, 2005). De acordo com Wrighton (2005), esse grupo pode estar associado com a redução de compostos poluidores do petróleo. Assim como o referente estudo, Nunes (2006) também encontrou esse grupo de micro-organismos em todas as suas amostras. O grupo *Anaerolinea* é composto por bactérias anaeróbicas, heterotróficas e termofílicas (Janssen, 2006), tal classe foi encontrada na maioria das amostras de Nunes (2006).

Os grupos de bactérias pertencentes a classe dos *Dehalococoides* foram identificados como capazes de transformar etenos halogenados e compostos aromáticos em condições anóxicas (Maymo-Gatell et al. 1997; Adrian et al. 2000). Culturas mistas enriquecidas com cepas de *Dehalococoides* tem sido utilizadas na biorremediação de locais impactados (Adrian, 2009). Vários estudos demonstram a distribuição desses micro-organismos presentes em distintos sedimentos marinhos de diferentes localidades do mundo (Adrian, 2009).

A presença desse composto no ambiente pode ser justificado devido a localização da área de estudo, já que o manguezal do rio Santarém está situado na Baía de Camamu (BC), visto que encontra-se sob influência dos dois sentidos da deriva litorânea (Norte e Sul), segundo Bittencourt et al. (2000). Portanto, a contaminação da região da coleta pode ser um indicativo que foi originada da área ao norte e/ou ao sul da costa brasileira. Muito embora, a Baía de Todos os Santos (BTS) encontre-se próximo da BC, ela não é a única causa da perturbação sofrida nessa região. Além da plataforma da costa leste do estado da Bahia sofrer forte influência da deriva litorânea (padrão de dispersão do sedimento), também recebe ventos de diferentes regiões e correntes marítimas advindas do sul-equatorial, e da corrente norte do Brasil (Dominguez et al., 2012), onde a área de estudo situa-se na zona de convergência desses eventos, sofrendo influência de várias direções.

Alguns atributos físico-químicos como pH, matéria orgânica, temperatura, umidade, quantidade de nutrientes disponíveis, vegetação, luminosidade podem

influenciar diretamente nas atividades microbianas, bem como na estrutura e diversidade da comunidade microbiana de solo (Shingh et al., 2006). Solos de ecossistema manguezal são bastante peculiares, principalmente por apresentar baixo teor de oxigênio, portanto os organismos que conseguiram se adaptar a tais condições, a exemplo de vários micro-organismos, podem se desenvolver sob condições anóxicas, além do alto nível de salinidade, elevado potencial redox, alta quantidade de matéria orgânica e sulfato (Liu et al., 2019). Contudo, a estrutura da comunidade microbiana pode ser altamente modificada devido a presença de poluentes ambientais. Na qual, as alterações nas comunidades estão associadas às suas capacidades funcionais e, principalmente, por apresentarem adaptações a diferentes habitats, que os permite ter grande valor para biorremediação de ecossistemas modificados.

A abundância da diversidade microbiana das quatro amostras estudadas apresentou distintas proporções para cada filo, porém em nenhuma das amostras foi observada uma composição dissimilar em relação a outra, o que pode indicar que o ambiente estava direcionando-se para condições mais estáveis e tornando-se praticamente uniforme.

Também pode ser observado que as amostras do P1 são mais similares entre si, assim como é observado nas amostras do P2, porém há uma certa distinção sobre o perfil vertical do P1 em relação ao P2. A similaridade entre as camadas do P1 podem ser explicadas devido a ressuspensão dos sedimentos de fundo com as margens proporcionado pela misturas das águas que ocorre nessa região alagada dos manguezais, já que estão sob influência da maré. Também é importante salientar que nas camadas superficiais e mais profundas do P1 apresentam alto teor de matéria orgânica, principalmente na profundidade de 30-35 cm, resultado esse que não se aplica ao estudo de Nunes (2006). Esse resultado também demonstra que embora outros estudos mostrem que a maior atividade biológica ocorre em camadas mais superficiais de 0-20 cm, devido a maior concentração de MO (Moreira; Siqueira, 2006; Nunes, 2006), os resultados presentes nesse trabalho revelam que a estrutura e diversidade de micro-organismos foram muito parecidos e quase uniforme em todos os pontos (P1 e P2), sendo que a camada subsuperficial do P1 foi que apresentou maior riqueza e diversidade, de acordo com os índices de diversidade, o que pode ser explicado pelo maior teor de MO.

Cury (2002); Sparling (1992) e Nunes (2006) em seus trabalhos verificaram que

a quantidade de carbono orgânico segue os mesmos padrões que o teor de MO, sendo sua quantidade mais elevada nas camadas mais superficiais e estabelece uma relação diretamente proporcional aos resultados obtidos pela MO. Esses resultados refutam os encontrados nesse estudo. No P2 foi observado o mesmo padrão visto no P1, onde o perfil do P2, superfície e subsuperfície, apresentaram estrutura e diversidade microbiana muito similares, muito embora o teor de MO tenha sido maior na camada subsuperficial do que na superfície. Esses resultados apresentados também refutam o que foi encontrado nos trabalhos de Cury (2002) e Nunes (2006), nos quais a estruturada comunidade de Bacteria e Archaea presentes em solo de mangue não apresentaram muita similaridade entre as camadas do mesmo ponto, o que os levaram a supor que o padrão de distribuição das comunidades de micro-organismos do mangue poderiam estar ligado a disponibilidade de carbono, oxigênio e nutrientes.

Os pontos P1 e P2 apresentam pequenas diferenças quanto a abundância dos filos, fato esse que pode ser explicado devido as divergências geoquímicas entre as áreas, já que o P1 é uma região sempre alagada, com baixa disponibilidade de O₂, além de ser uma região influenciada pelos ambientes marinhos e terrestres, local este que segundo Liu et al., (2019), sugere ser o ambiente composto por uma comunidade única, e isso pode ser uma explicação para o triplo do aumento no número de OTUs representado no diagrama de Venn. Diferentemente do que é visto no P2, representante da área sem interferência marinha, portanto, considerado um ambiente com maior incidência de luminosidade, maior influência de gases e menor umidade. De acordo com as diferentes características entre as áreas, é sabido que fatores abióticos influenciam na estrutura e diversidade da comunidade autóctone, tornando-os mais bem adaptados às condições ambientais específicas do micro-habitat.

A porcentagem referida aos filos pertencentes ao Domínio Archaea descaram o *Crenarcheota* como mais abundante, porém considerado o grupo mais restrito e constituído de organismos termófilos extremo que participam do metabolismo do enxofre (Sekiguchi, 2006). O filo *Euryarchaeota* é um grupo bastante diversificado filogeneticamente, incluindo organismos halofílicos, termófilos e metanogênicos, importantes na degradação de compostos orgânicos (Pesaro, Widmer, 2002; Sekiguchi, 2006). Estudo sobre contaminação de petróleo em sedimentos que contenham comunidade Archaea, demonstra que micro-organismos classificados como parte desse domínio, possuem papéis relevantes na biodegradação desse

composto, além do composto apresentar efeito negativo sobre as comunidades, podendo servir como indicadores de locais impactados por petróleo.

Observa-se também que a abundância do grupo Archaea, em especialo filo *Crenarchaeota*, apresentou maiores percentuais nas camadas mais profundas e menores valores nas camadas mais superficiais. Esse resultado pode ser explicado pela alta capacidade dos micro-organismos do Domínio Archaea se adaptarem as condições anóxicas do meio (Ovreas et al., 1997).

Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (HTP)

Os Hidrocarbonetos Totais do Petróleo são utilizados para investigar a presença de contaminantes e o grau de concentração no ambiente, bem como podem ajudar a compreender os parâmetros da ocorrência da contaminação e estimar o tempo de exposição do contaminante no solo. Os HTPs também podem ser caracterizados como uma faixa de carbono que podem variar de C6 a C35, indicando uma complexa variedade de substâncias (Kolesnikovas et al., 2009). Existem três faixas de TPH, que podem ser definidas a partir do tamanhoda cadeias, como: C6 - C12 (faixas de gasolina), C12-C22 (faixa de diesel) e C22-C35 lubrificante (faixa de óleo); sendo que todas as variações são passíveis de determinação de metas de remediação baseadas em risco (Kolesnikovas et al., 2009).

Os hidrocarbonetos do petróleo incluem os n-alcenos, isoalcenos, cicloalcenos e os aromáticos, sendo os alcenos saturados e de cadeia ramificada os de maior predominância. Cadeias formadas por esses tipos de hidrocarbonetos apresentam em sua fórmula valores, normalmente, de 1 a 40 átomos de quantidades de carbono, porém pode ser encontrado valores com até 78 átomos (Ludwig, 1965). O grupo ramificado com maior importância são os isoprenóides, que apresentam mais que 13 átomos de carbono em sua cadeia, a exemplo do pristano (19) e fitano (20) que são os mais abundantes (Albaigés, 1980).

Todavia, pristano e fitano não fazem parte da biota terrestre, sendo produtos de alteração geológica do fitol, por este motivo são considerados mais resilientes a degradação nos ambientes de manguezal, portanto carbonos que apresentaram valores reduzidos foram considerados de degradação preferencial frente os n-alcenos (TAKETANI et al., 2009; PETERS; MOLDOWAN 1993; CELINO et al., 2008). Valores

altos da razão pristano/fitano indicam presença de óleo degradado, enquanto que valores baixos indicam que o óleo foi recentemente introduzido no ambiente, ou seja, ainda não ocorreu biodegradação (MARIANO et al., 2006; COIMBRA, 2006; KRONBAUER, 2014).

Além de que a relação pristano/fitano com valores obtidos para essa razão maiores que 1, entre 3 e 5, indica que predominantemente originou-se de fonte biogênica (Steinhauer & Boehm, 1992). Entretanto, valores abaixo ou próximo de 1, indica, juntamente com outros parâmetros tais como a distribuição de n- alcanos e o IPC, uma provável contaminação por petróleo (Cripps, 1989).

A relação de n-C17/Pristano e n-C18/Fitano desse estudo apresentou o valor de n-C18/Fitano maior que 1, porém segundo o trabalho de Castro, et al. (2015), sobre coleta no Rio Madeira VII, ambas as relações apresentaram valores >1, o que pode indicar a ocorrência de emissão recente de óleo nessa área. O valor de UCM ajuda a complementar os resultados das relações de n- C17/Pristano e n-C18/Fitano. Sendo assim, o valor de UCM demonstra que esse óleo, possivelmente, recém introduzido está em processo de degradação. Isso porque UCM é formado por uma mistura complexa de isômeros, portanto, a detecção dessa substância no cromatograma se refere a resíduos de degradação do petróleo ou resistentes a degradação (Readman et al., 2002). Assim, de acordo com Coimbra (2006) a detecção de UCM no ambiente comprova a origem petrogênica do contaminante.

Ainda sobre os resultados obtidos dos hidrocarbonetos totais presente no sedimento em questão, também foi utilizada a relação $HTP / (COT \times 10^{-4}) < 70$ considerada na literatura para classificar o ambiente como poluído ou não (Bernard et al, 1996). E de acordo com os resultados apresentados da relação, o ambiente é classificado como não poluído, já que nenhuma gerou quociente superior a 70.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento desse estudo teve o intuito de acessar a diversidade genética microbiana da Área de Proteção Ambiental, localizado dentro do bioma Floresta Atlântica, no Pratiga, afim de contribuir com um estudo referencial para posteriores trabalhos que venham ser realizados na mesma localidade, principalmente por se tratar de uma área com tamanha relevância e estratégico para medidas de conservação. Porém, a partir dos resultados obtidos do estudo, podemos perceber que já existe indícios de contaminação por petróleo, todavia não foi possível investigar a origem da perturbação e nem o tempo ao qual a área está exposta, recente ou histórica. Trabalhos referenciados ao longo do texto demonstram as diferentes interferências atmosféricas as quais o estuário está suscetível e que influenciam nos padrões de dispersão dos sedimentos, portanto a BTS pode ser um fator de risco para a região da APA, como também materiais advindos do sul do Estado da Bahia. Sendo assim, faz-se necessário o monitoramento e avaliações constantes para prever estratégias de controle e tomadas de decisões frente um impacto causado por composto indesejado.

Conclui-se que, para inferirmos com maior segurança, mais estudos são necessários, a fim de estabelecer um comparativo do levantamento dos dados coletados nesse estudo, com dados atualizados, para que assim seja possível observar as mudanças ocorridas no espaço de tempo e as possíveis alterações dos resultados apresentados nas análises.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIAN, Lorenz. ERC-group microflex: microbiology of Dehalococcoides-like Chloroflexi. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 8, n. 3, p. 225-229, 2009.

ALBAIGES, J. Identification and geochemical significance of long chain acyclic isoprenoid hydrocarbons in crude oils. **Physics and Chemistry of the Earth**, v.12, p. 19-28, 1980.

ALONGI, D. M. The dynamics of benthic nutrient pools and fluxes in tropical mangrove forests. **J. Mar. Res.** 54, 123-148 (1996).

AMORIM, F. N. et al. Coastal and shelf circulation in the vicinity of Camamu Bay(14S), Eastern Brazilian Shelf. *Continental Shelf Research*, Oxford, v. 31, n. 2, p.108-119, 2011.

ATLAS, Ronald M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological reviews**, v. 45, n. 1, p. 180, 1981.

BERNARD, D.; PASCALINE, H.; JEREMIE, J.-J. Distribution and origin of hydrocarbons in sediments from lagoons with fringing mangrove communities. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, n. 10, p. 734-739, 1996.

BITTENCOURT, A.C.S.P., DOMINGUEZ J.M.L., MARTIN L., SILVA I.R. 2000. Patterns of sediment dispersion coastwise the State of Bahia – Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 72: 271-287.

BRITO, Elcia Margareth S. et al. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. **Research in microbiology**, v. 157, n. 8, p. 752-762, 2006.

CAMPANILI, M.; SCHAFFER, W. B. Mata Atlântica: manual de adequação ambiental – Brasília: MMA/SBF, 2010.

CAPORASO, J. Gregory et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 108, n. Supplement 1, p. 4516-4522, 2011.

CAPORASO J.G., LAUBER C.L., WALTERS W.A., BERG-LYONS D., HUNTLEY J., FIERER N., OWENS S.M., BETLEY J., FRASER L., BAUER M., GORMLEY N., GILBERT J.A., SMITH G., KNIGHT R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 6:1621-1624. 2012.

CELINO, J. J. et al. Fonte e distribuição de hidrocarbonetos do petróleo nos sedimentos da Baía de Todos os Santos, Bahia. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 12, n. 1, p. 31-38, 2008.

CLARK, Malcolm W. et al. Redox stratification and heavy metal partitioning in Avicennia-dominated mangrove sediments: a geochemical model. **Chemical Geology**, v. 149, n. 3-4, p. 147-171, 1998.

COIMBRA, Mauricio Antônio Covre. **Avaliação dos resultados analíticos de hidrocarbonetos como instrumento jurídico em caso de derrames de petróleo: mangue de Bertioga**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CRIPPS, G. C. Baseline levels of hydrocarbons in seawater of the Southern Ocean: natural variability and regional patterns. **Marine Pollution Bulletin**, v. 24, n. 2, p. 109-114, 1992.

CURY, Juliano de Carvalho. **Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo**. 2002. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DE CASTRO, L. M. et al. APLICAÇÃO DE ÍNDICES DE DIAGNÓSTICO DE HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS NA AVALIAÇÃO DE IMPACTO AMBIENTAL EM UM DOS PRINCIPAIS AFLUENTES DA MARGEM DIREITA DO RIO AMAZONAS. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 3, p. 345-350, 2015.

DOMINGUEZ J.M.L. & BITTENCOURT A.C.S.P. 2012. Zona Costeira. In: Barbosa J.S.F. Geologia da Bahia: pesquisa e atualização. V. 2, Série publicações especiais. Salvador: CBPM. 643 p.

EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2 ed. 2003. EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. 3 ed. 2017

FAN, Lan-Feng et al. Diversity and composition of sulfate- and sulfite-reducing prokaryotes as affected by marine-freshwater gradient and sulfate availability. **Microbial ecology**, v. 63, n. 1, p. 224-237, 2012.

FEDE, K.L.; et al. Characterization of dilution enrichment cultures obtained from size-fractionated soil bacteria by BIOLOG^R community-level physiological profiles and restriction analysis of 16S rRNA genes. **Soil Biology & Biochemistry**: 1555-1562. 2001.

GARRITY, George M.; BELL, Julia A.; LILBURN, Timothy G. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. **Springer, New York, Berlin, Heidelberg**, 2004.

GRAYSTON, S.J.; et al. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**: 533-551. 2001

HALLIBURTON, AD. *Basic Petroleum Geology and Log Analysis*. Halliburton Company. 2001

HAYES, L. A.; LOVLEY, D. R. Specific 16S rDNA sequences associated with naphthalene degradation under sulfate-reducing conditions in harbor sediments.

Microbial ecology, v. 43, n. 1, p. 134-145, 2002.

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).

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMbio). **Atlas dos Manguezais do Brasil / Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.** Brasília, 176 p. 2018

JANSSEN, Peter H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16SrRNA and 16S rRNA genes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 3, p. 1719-1728, 2006.

KOLESNIKOVAS, Celso; DE OLIVEIRA, Everton; DUARTE, Uriel. Avaliação de risco toxicológico para hidrocarbonetos totais de petróleo em forma fracionada aplicada à gestão e monitoramento de água subterrânea em um complexo industrial. **Águas Subterrâneas**, v. 23, n. 1, 2009.

KRONBAUER, Denise Prado et al. Determinação de propriedades petrofísicas de rochas reservatórios usando modelos de redes de poros. 2014.

LACERDA, L. D. Brazil, In: **Principles for a code of conduct for the management and sustainable use of mangrove ecosystems**, CenTer/ISME/World Bank, *no prelo*. 2005.

LANG, Firmin Semboung et al. Characterization and evaluation of the potential of a diesel-degrading bacterial consortium isolated from fresh mangrove sediment. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 2, p. 58, 2016.

LEGENDRE, Pierre; LEGENDRE, Louis. Ecologia numérica. 3rd ed inglês. **Desenvolvimentos em modelagem ambiental**, v. 24, 2012.

LELOUP, Julie et al. Sulfate-reducing bacteria in marine sediment (Aarhus Bay, Denmark): abundance and diversity related to geochemical zonation. **Environmental microbiology**, v. 11, n. 5, p. 1278-1291, 2009.

LIU, MIN et al. Microbial community structure of soils in Bamenwan mangrove wetland. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 8406, 2019.

LUDWIG, F. John. Analysis of microcrystalline waxes by gas-liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 37, n. 13, p. 1732-1737, 1965.

MACHADO, W.; TANIZAKI, K. F.; LACERDA, L. D. Metal accumulation on the fineroots of *Rizophora mangle* L. **ISME/Glomis Eletronic Journal**, v. 4, n. 2, 2 p. 2004

MARGULIS, Lynn; SCHWARTZ, Karlene V.; GOULD, Stephen Jay. **Five kingdoms: an illustrated guide to the phyla of life on earth**. New York: WH freeman, 1998.

MARIANO, Adriano Pinto. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. 2006.

MONTEIRO, L.H.U. **Estudo das áreas de mangues entre os estados Piauí Pernambuco com um enfoque para o estado do Ceará nos anos de 1978 e 1999/2004 utilizando sensoriamento remoto**. Dissertação de Mestrado pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 98 f, 2005.

NUNES, Gisele Lopes. **Diversidade e estrutura de comunidades de Bacteriae Archaea em solo de mangue contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

OCT - ORGANIZAÇÃO DE CONSERVAÇÃO DA TERRA. 2012, Disponível em: <<http://www.oct.org.br/>>. Acesso em 30/07/2019.

ORPHAN, V. J. et al. Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 4, p. 1922-1934, 2001.

OVREÅS, L. et al. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 9, p. 3367-3373, 1997.

PESARO, Manuel; WIDMER, Franco. Identification of novel Crenarchaeota and Euryarchaeota clusters associated with different depth layers of a forest soil. **FEMS microbiology ecology**, v. 42, n. 1, p. 89-98, 2002.

PETERS, Kenneth E.; MOLDOWAN, J. Michael. O guia de biomarcadores: interpretação de fósseis moleculares em petróleo e sedimentos antigos. 1993.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLOCKNER, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acid Res.**, 41, pp. D590-D596. 2013

RANJARD, L. & RICHAUME, A. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. **Research Microbiology** 152: 707-716. 2001

READMAN, J. W. et al. Petroleum and PAH contamination of the Black Sea. **Marine pollution bulletin**, v. 44, n. 1, p. 48-62, 2002

SEKIGUCHI, Yuji. Yet-to-be cultured microorganisms relevant to methane fermentation processes. **Microbes and Environments**, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2006.

SESSITSCH, A.; et al. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Applied and Environmental Microbiology** 67: 4215-4224. 2001.

SPARLING, Graham P. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. **Soil Research**, v. 30, n. 2, p. 195-207, 1992.

STEINHAUER, Margarete S.; BOEHM, Paul D. The composition and distribution of saturated and aromatic hydrocarbons in nearshore sediments, river sediments, and coastal peat of the Alaskan Beaufort Sea: implications for detecting anthropogenic hydrocarbon inputs. **Marine Environmental Research**, v. 33, n. 4, p. 223-253, 1992

TAKETANI, Rodrigo Gouvêa et al. Characterisation of the effect of a simulated hydrocarbon spill on diazotrophs in mangrove sediment mesocosm. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, n. 3, p. 343-354, 2009.

TAKETANI, Rodrigo Gouvêa et al. Diversity and identification of methanogenic archaea and sulphate-reducing bacteria in sediments from a pristine tropical mangrove. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, n. 4, p. 401-411, 2010.

WRIGHTON, Kelly Catherine. **The Search for Bacteria Involved in Anaerobic Petroleum Degradation: A Thesis**. 2005. Tese de Doutorado. California Polytechnic State University.

YAMADA, Takeshi et al. Diversity, localization, and physiological properties of filamentous microbes belonging to Chloroflexi subphylum I in mesophilic and thermophilic methanogenic sludge granules. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 11, p. 7493-7503, 2005.

YU, K. S. H. et al. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. **Marine pollution bulletin**, v. 51, n. 8-12, p. 1071-1077, 2005.

ZHANG, Hongchun et al. Microbial taxa and functional genes shift in degraded soil with bacterial wilt. **Scientific reports**, v. 7, p. 39911, 2017.

ZHANG, Xiaoying et al. Composition and functional diversity of microbial community across a mangrove-inhabited mudflat as revealed by 16S rDNA gene sequences. **Science of the Total Environment**, v. 633, p. 518-528, 2018.

ZHANG, Wen et al. Microbial diversity in polluted harbor sediments II: Sulfate-reducing bacterial community assessment using terminal restriction fragment length polymorphism and clone library of *dsrAB* gene. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 76, n. 3, p. 682-691, 2008.

ANEXO

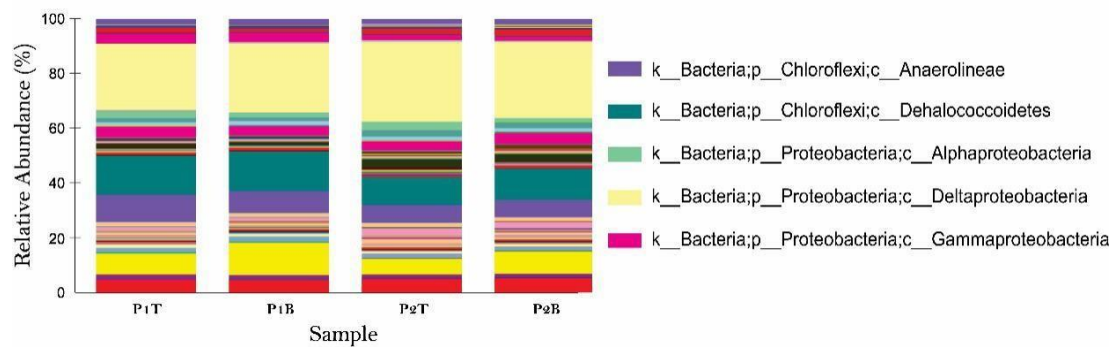


Fig. Sup. 8- Abundância relativa dos principais grupos no nível de classe da comunidade microbiana nas quatro amostras de sedimentos no ecossistema de mangue

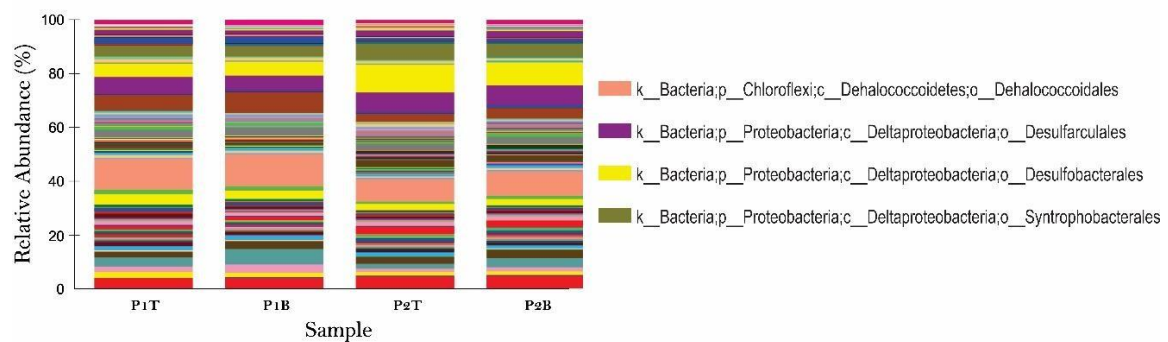


Fig. Sup. 9- Abundância relativa dos principais grupos no nível de ordem da comunidade microbiana nas quatro amostras de sedimentos no ecossistema de mangue

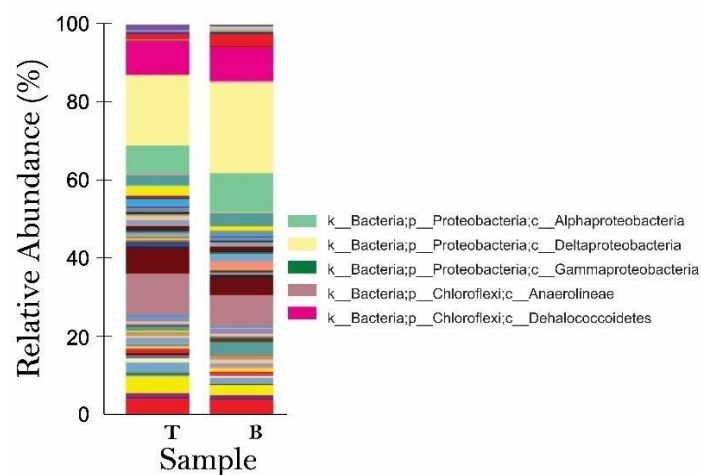


Fig. Sup. 14. Abundância relativa dos principais grupos no nível de classe da comunidade microbiana nas duas amostras de sedimento (Superfície e Inferior) no ecossistema de mangue

aj-Analyzer multi N/C 2100; multiwin 4.09; Serial No: N5-946/P

Analyses Table

Analyses Table: Mahysa

Sample ID	Time of analyses	Method	TOC	IC	TC/NPOC	Sample volume
BRANCO290719	29/07/2019 15:41:14	TOC Diff	0!	1,22mg/l = 89,85%	22,45µg/l = 664,70%	500,0µl
P1T-2907	29/07/2019 16:14:31	TOC Diff	39,91 mg/l	1,75mg/l = 12,25%	41,66mg/l = 0,33%	500,0µl
P1B-2907	29/07/2019 16:48:12	TOC Diff	36,37 mg/l	6,23mg/l = 12,06%	42,60mg/l = 10,98%	500,0µl
P2T-2907	29/07/2019 17:29:09	TOC Diff	59,58 mg/l	2,50mg/l = 59,26%	62,08mg/l = 3,93%	500,0µl
P2B-2907	29/07/2019 18:07:22	TOC Diff	50,56 mg/l	1,27mg/l = 56,44%	51,83mg/l = 0,96%	500,0µl

Quadro Sup. 3- Valores obtidos das análises de TOC

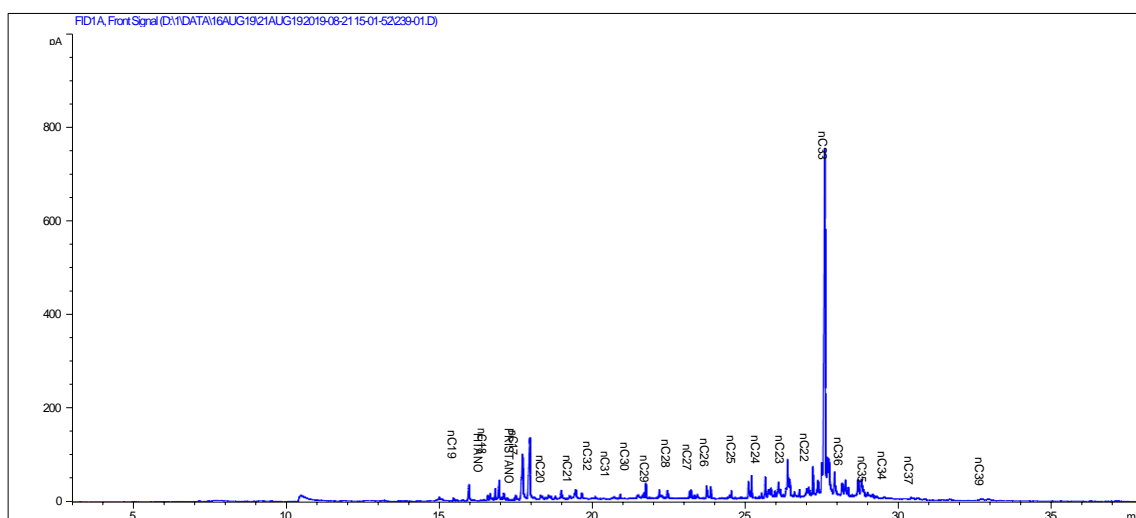


Fig. Sup.17. Perfil cromatográfico dos HTPs (n-C8 a n-C40) de sedimento (P1T) de manguezal do rio Santarém, sul do Estado da Bahia; onde o eixo y, representa a abundância e o eixo x, o tempo de retenção em minutos.

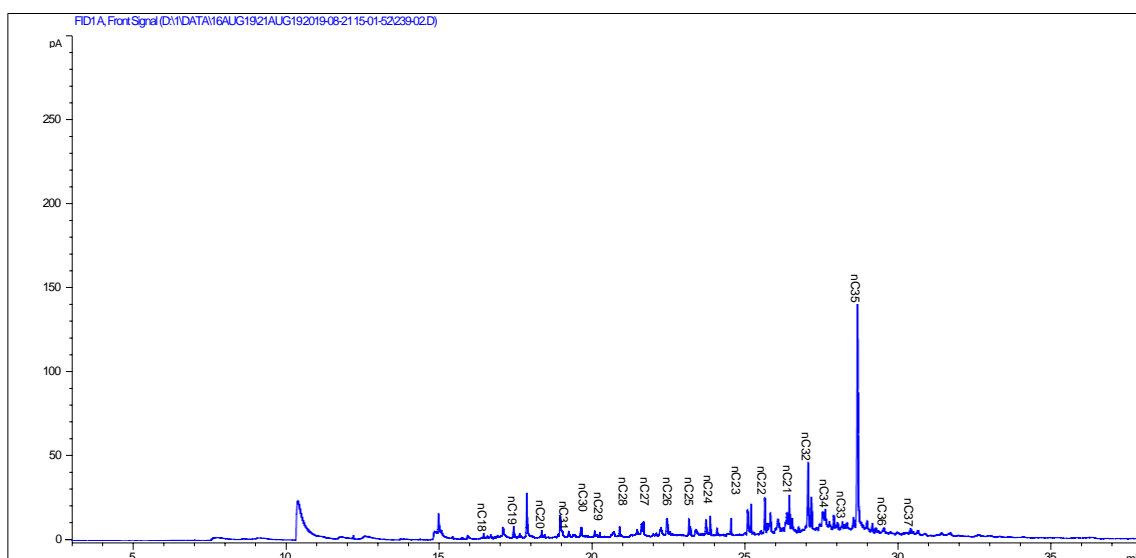


Fig. Sup.18. Perfil cromatográfico dos HTPs (n-C8 a n-C40) de sedimento (P1B) de manguezal do rio Santarém, sul do Estado da Bahia; onde o eixo y, representa a abundância e o eixo x, o tempo de retenção em minutos.

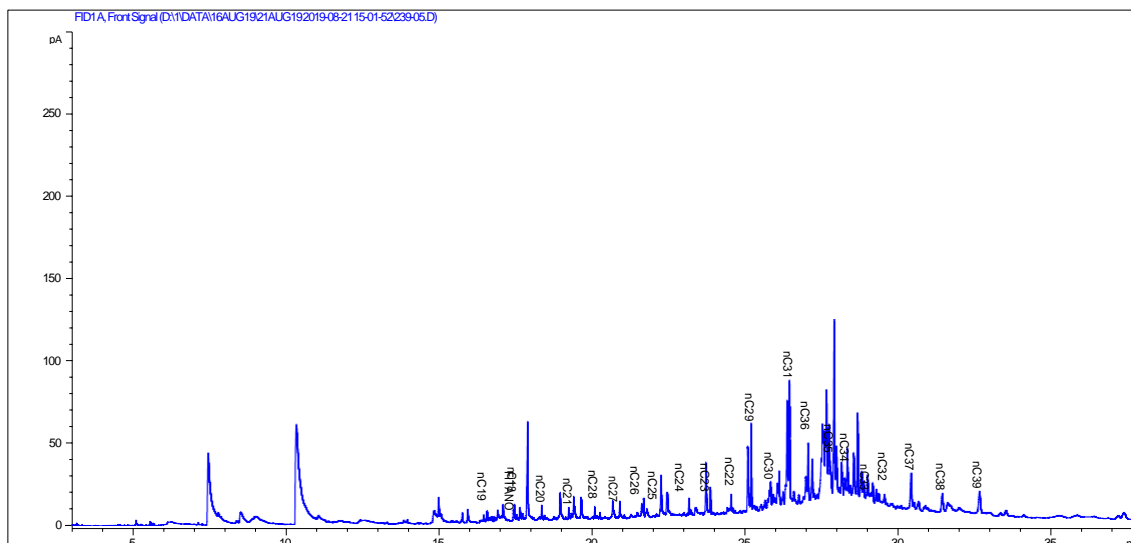


Fig. Sup.19. Perfil cromatográfico dos HTPs (n-C8 a n-C40) de sedimento (P2T) de manguezal do rio Santarém, sul do Estado da Bahia; onde o eixo y, representa a abundância e o eixo x, o tempo de retenção em minutos.

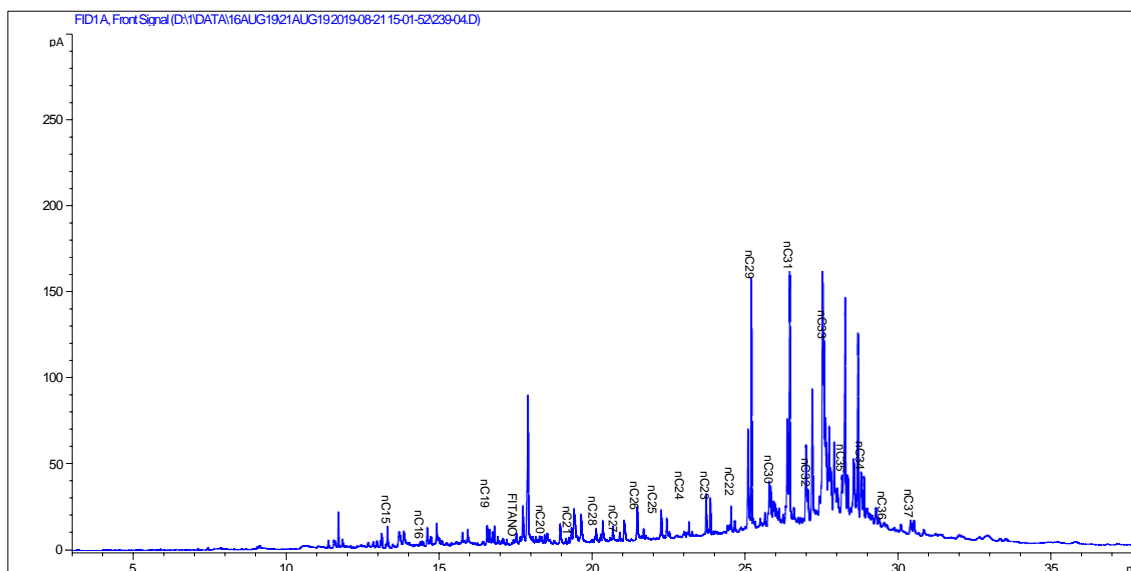


Fig. Sup.20. Perfil cromatográfico dos HTPs (n-C8 a n-C40) de sedimento (P2B) de manguezal do rio Santarém, sul do Estado da Bahia; onde o eixo y, representa a abundância e o eixo x, o tempo de retenção em minutos.

ALCANO ou PARÂMETRO	Concentração		LQM mg/Kg
	mg/Kg	µg/Kg	
PRISTANO	0,09	90,40	0,07
FITANO	0,31	313,23	0,09
HTP	166,38	166384,39	N.A.
UCM	68,02	68022	N.A.
PRISTANO/FITANO	0,29		N.A.
PRISTANO/n-C ₁₇	0,24		N.A.
FITANO/n-C ₁₈	2,30		N.A.

Quadro Sup.4- Valores obtidos da amostra de sedimento (P1T)

ALCANO ou PARÂMETRO	Concentração		LQM mg/Kg
	mg/Kg	µg/Kg	
PRISTANO	<LQM	<LQM	0,04
FITANO	<LQM	<LQM	0,06
HTP	30,16	30160,39	N.A.
UCM	10,99	10987,90	N.A.
PRISTANO/FITANO	N.A.		N.A.
PRISTANO/n-C ₁₇	N.A.		N.A.
FITANO/n-C ₁₈	N.A.		N.A.

Quadro Sup.5- Valores obtidos da amostra de sedimento (P1B)

ALCANO ou PARÂMETRO	Concentração		LQM mg/Kg
	mg/Kg	µg/Kg	
PRISTANO	<LQM	<LQM	0,05
FITANO	0,14	138,48	0,06
HTP	95,48	95484,64	N.A.
UCM	53,02	53023,58	N.A.
PRISTANO/FITANO	N.A.		N.A.
PRISTANO/n-C ₁₇	N.A.		N.A.
FITANO/n-C ₁₈	1,30		N.A.

Quadro Sup.6- Valores obtidos da amostra de sedimento (P2T)

ALCANO ou PARÂMETRO	Concentração		LQM mg/L
	mg/L	µg/L	
PRISTANO	<LQM	<LQM	0,14
FITANO	0,73	725,11	0,18
HTP	295,57	295570,63	N.A.
UCM	180,43	180434,82	N.A.
PRISTANO/FITANO	N.A.		N.A.
PRISTANO/n-C ₁₇	N.A.		N.A.
FITANO/n-C ₁₈	N.A.		N.A.

Quadro Sup.7- Valores obtidos da amostra de sedimento (P2B)

CAPÍTULO II –

COMUNIDADE MICROBIANA DE SEDIMENTO
DEMANGUEZAL DA FLORESTA ATLÂNTICA DO
BAIXO SULDA BAHIA EXPOSTA A PERTURBAÇÃO
POR HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO

INTRODUÇÃO

Com o passar dos anos o conceito de perturbação passou a ser entendido como uma desestabilização no equilíbrio da estrutura e composição de comunidades ou ecossistemas, provocados por eventos de caráter natural ou antropogênico, a exemplo da fragmentação de habitat, ventos fortes, enchentes, mineração e o refino do petróleo. Dessa forma, tais eventos propiciam a remoção dos organismos, ou interfere nas relações entre os mesmos, pelo processo de competição, seja ela por falta de recursos alimentares ou de habitat, ou ainda por mudanças químicas, físicas e biológicas do ambiente (Wan et al., 2014; Berga et al., 2012). Dessa forma, as perturbações podem provocar alterações na estrutura e composição das comunidades.

Danos ambientais causados pela contaminação antrópica é uma preocupação global, principalmente quando se trata de substâncias poluidoras persistentes e que apresentam maior efeito cumulativo, seja no ambiente ou nos organismos (Bellotto et al., 2009). A maioria desses impactos são caracterizados pela presença de poluentes complexos, incluindo compostos inorgânicos, a exemplo dos metais pesados gerados por atividades de mineração e indústrias metalúrgicas, e orgânicos, como os hidrocarbonetos liberados no derramamento de petróleo (Jiao et al., 2016; Zagatto, 2006; Carrasco et al., 2003). Logo, os danos ambientais ocasionados por falha humana no vazamento de poluentes complexos provocam distúrbios preocupantes nos organismos.

Atualmente, já é sabido que as diversas formas microbianas são encontradas em diferentes nichos ecológicos, especialmente nos solos, onde estão presentes as maiores reservas dessa diversidade (Daniel, 2005). Além de apresentarem uma vasta diversidade genética, os micro-organismos desempenham papéis imprescindíveis nos ciclos biogeoquímicos (Rosa et al., 2003) e em diversas funções ecológicas indispensáveis no ambiente, a exemplo da capacidade de reciclar nutrientes, interagir com animais e plantas, produzir e consumir gases que afetam o clima terrestre, bioindicadores de qualidade ambiental e funcionam como destruidores de poluentes no processo de biorremediação (Fontana, 2010; Coetser e Cloete, 2005; Schweder et al., 2005; von Mering et al., 2007). Onde, tal processo tem como principal foco a recuperação de ambientes contaminados por acidentais derramamentos de compostos indesejáveis, que participam como reagentes das vias metabólicas de determinadas espécies microbianas, espécies essas que auxiliam na redução ou

remoção do caráter tóxico desses compostos (Muteca, 2012). Logo, a ampla diversidade microbiana desempenha papéis fundamentais na manutenção e funcionamento dos ecossistemas que podem controlar o destino de substâncias poluentes após distúrbio, portanto desenvolvem atividades essenciais na produtividade, conservação e recuperação em ecossistemas de manguezais.

Ambientes estuarinos são caracterizados por corpos d'água que ocorrem na transição do ambiente continental e marinho, portanto é um ambiente sujeito a regime de marés. Essas características fazem com que esses ambientes sejam mais suscetíveis a perturbações provocadas por derramamento de petróleo. Além da presença de uma alta diversidade de nichos de muitas espécies que caracteriza esse ecossistema como mais produtivo do mundo (Rocha, 2008). Consequentemente, a posição geográfica desses ecossistemas os tornam mais propícios aos impactos por substâncias tóxicas de petróleo, onde a ampla diversidade existente nesses ambientes estão mais vulneráveis à exposição por essa perturbação.

Diante do contexto abordado, nosso estudo buscou avaliar as mudanças na estrutura da comunidade microbiana autóctone, ao longo do tempo, de manguezal situado em região de Mata Atlântica do Rio Santarém, após condição de estresse sob efeito do petróleo. Onde, tais resultados trazem um relevante peso nos estudos ecológicos mediante a criação de estratégias para recuperação de áreas degradadas. Portanto, o trabalho foi desenvolvido com o propósito de acessar grupos microbianos autóctones que apresentem potencial biodegradador do petróleo e, futuramente, gerar um painel de biomoléculas e genes de interesse ambiental.

HIPÓTESE E PREVISÃO

A estrutura e a diversidade das comunidades microbianas serão afetadas negativamente na ocorrência de um derramamento de petróleo. Logo, o número de espécies encontradas após a adição de petróleo se reduzirá quando comparado ao número de espécies encontradas antes do distúrbio.

OBJETIVOS

Objetivo Geral: Avaliar a perda da diversidade alfa da comunidade microbiana autóctone de sedimento de manguezal sob efeito de um impacto provocado pela adição do petróleo.

Objetivo Específicos:

- Estudar os Domínios Bacteria e Archaea, após contaminação por petróleo, através dos marcadores filogenéticos, obtendo sequências de 16S rRNA para procariotos;
- Avaliar o efeito da exposição do petróleo sob as comunidades microbianas autóctones, através da construção de um experimento de perturbação, realizado em laboratório, utilizando a plataforma de segunda geração Illumina (MiSeq);
- Determinar a abundância relativa e a taxonomia das comunidades que persistiram ou surgiram a partir das novas condições impostas após a adição do petróleo;

MATERIAS E MÉTODO

Área de Estudo

O trabalho foi desenvolvido com amostras de sedimento coletados em um ecossistema manguezal do rio Santarém, localizado no Ecopolo III da APA do Pratigi, entre as coordenadas -13.721829 e -39.033586, área de Mata Atlântica, e situado no município de Ituberá - Baixo sul da Bahia, acesso pela estrada BA-

250. Com 171 mil hectares, a APA do Pratigi possui grandes remanescentes florestais e apresenta elevado valor de conservação, sendo, portanto, considerada um hotspot ambiental (OCT, 2012).

O Ecopolo III possui um dos mais extensos remanescentes florestais contínuos da Bahia. Próximo à planície costeira predomina estuários com restingas e manguezais, gerando áreas com diferentes tipos de solo e sendo considerado o ambiente mais diverso, por se tratar de um ambiente estuarino e, portanto, é o Ecopolo mais influenciado pela maré e mais suscetível aos impactos ambientais que podem ser ocasionados pelo derramamento de hidrocarboneto (OCT, 2012).

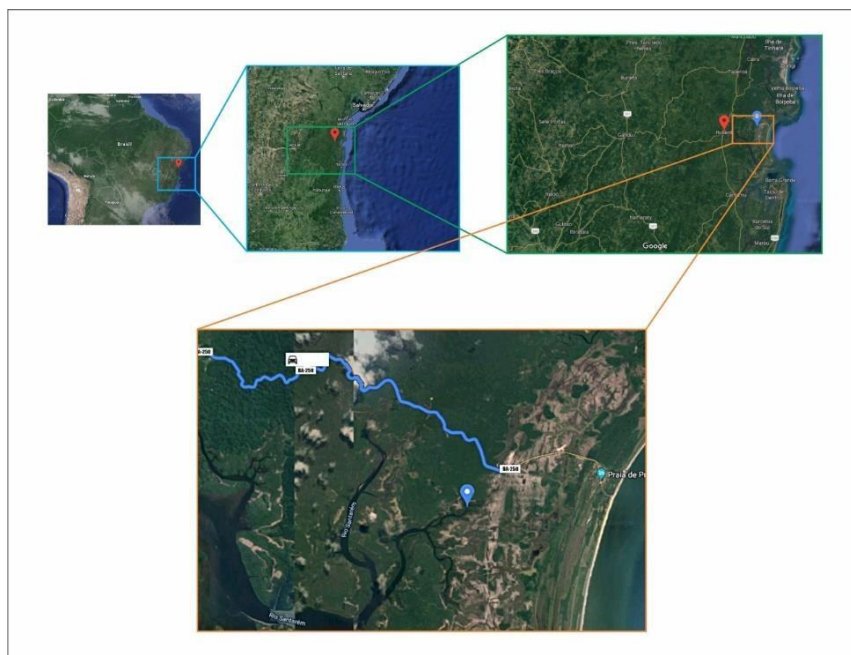


Figura 1. Imagens do google maps representando a área de coleta

Coleta do Inóculo

As amostras de sedimentos que foram coletadas em um manguezal do rio Santarém, pertencente a região de Mata Atlântica, no dia 05 de setembro do ano de 2018, foram submetidas ao experimento de perturbação microbiana. Tal experimento foi realizado utilizando a coleta das camadas superficiais, com profundidade de 0-10 cm (top), armazenadas em recipientes apropriados para estudos geoquímicos. Posteriormente, em laboratório, foi desenvolvida a montagem do experimento, sendo este realizado logo após a coleta. A área foi amostrada em dois pontos diferentes, o P1, identificado como região de área alagada e o P2, região sem interferência marinha. Os dois pontos de coleta foram divididos em 3 subamostras, para compor uma amostra composta, e esses pontos foram marcados a uma distância máxima de 3 m entre elas. Ao fim, as amostras foram agrupadas formando um pool de cada sítio.



Figura 2. Foto representando os dois pontos de coleta (Costa, 2018)

Experimento de Perturbação Microbiana

Em laboratório, logo após a coleta dos pontos amostrados, foi construído o experimento de perturbação que consistiu na elaboração de um sistema em triplicata, no qual foram acrescentados a tubos de ensaio médios e estéreis, uma parcela de 5 cm das amostras de sedimento e a elas foram adicionados 100 µl de óleo, assim como também foi utilizado nessa proporção em Rytönen *et al.* 1997. O óleo coletado em Miranga e datado de 2017 foi uma doação do Laboratório de Estudo do Petróleo (Lepetro). Ao final do experimento fez-se uso do detergente Dextran para higienização de todos os tubos utilizados, não restando resquícios do material.

Após montagem do experimento, o mesmo foi mantido dentro da capela durante 30 dias, para evitar a contaminação por outros organismos. Sendo que, dentro desse mês foram retiradas pequenas alíquotas nos períodos de 7, 15 e 30 dias após a adição do petróleo, a fim de avaliar o comportamento da diversidade alfa, quanto as mudanças sofridas na estrutura e diversidade dos grupos microbianos autóctones nos diferentes tempos (t1; t2 e t3, respectivamente) aos quais foram expostas ao composto de hidrocarbonetos (Fig. 3).

Delineamento Experimental

Amostras do Experimento de Perburbação Microbiana

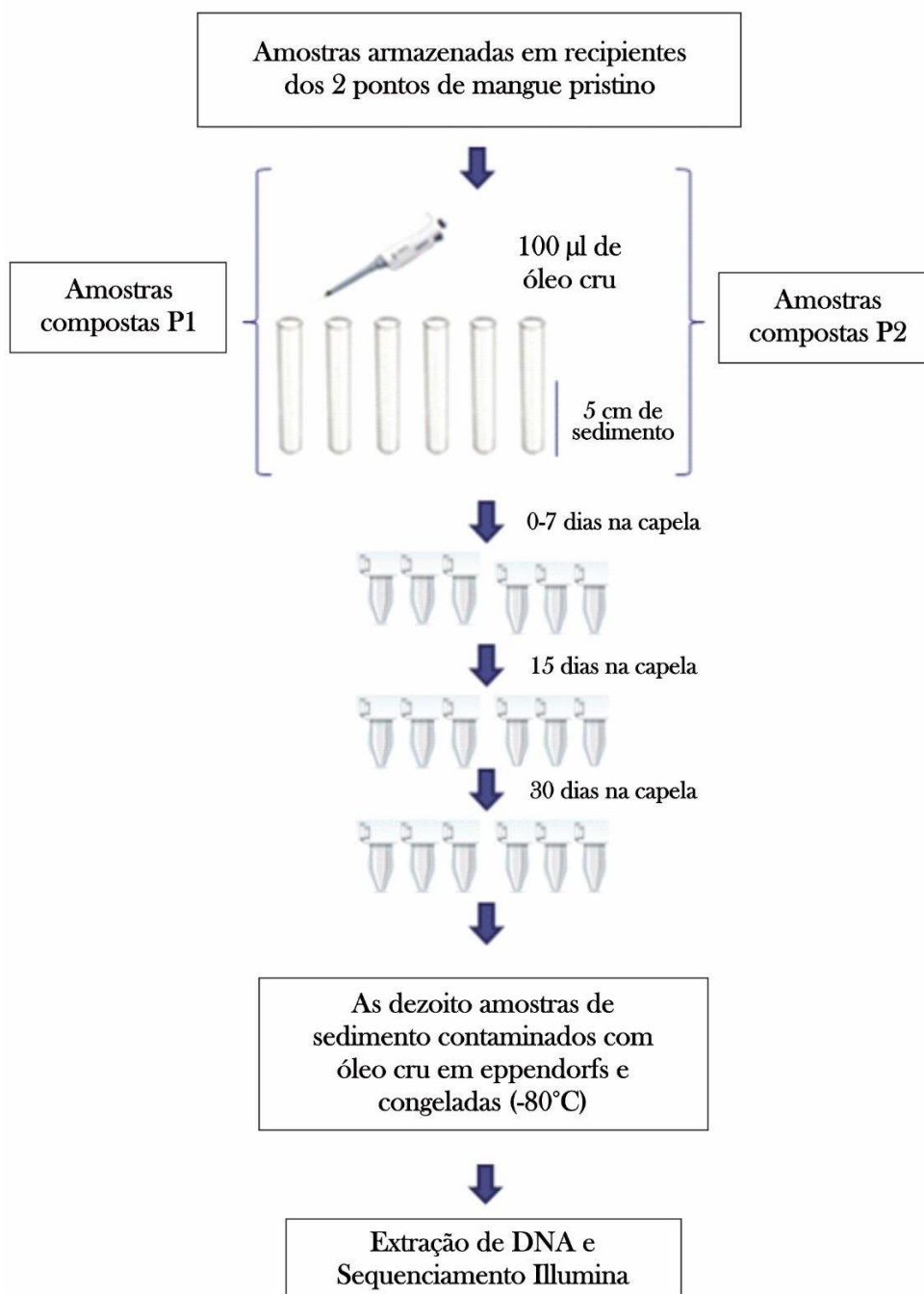


Figura 3. Delineamento experimental

Extração do DNA total e Sequenciamento Illumina Miseq

No total foram amostrados 6 pontos: 3 (Ecopolo III – P1: t1; t2 e t3) e 3 (Ecopolo III - P2: t1; t2 e t3), todavia foram realizados os pools das subamostras. A extração do DNA genômico total de sedimento do ambiente estuarino e a purificação foram realizadas com o Miniprep Quick-DNA fecal/ Soil Microbe[®] Kit – Zymo Research, de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e quantificação do DNA extraído foram avaliadas por espectrofotometria usando Nanodrop 2000 (Thermo), utilizados 20ng de DNA como modelo para 18 ciclos de amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores da região V4 (Quadro 1) do gene 16S ribossomal (Caporaso et al., 2012) e GoTaq Master Mix (Promega). Os produtos da PCR foram quantificados através do kit Qschr dsDNA HS (Invitrogen) e sequenciados no Kit de Sequenciamento 300V2 (Illumina) em uma Illumina MiSeq (Illumina). As sequências foram analisadas utilizando o QIIME

1.9.1 - Quantitative Insights Into Microbial Ecology, considerando 97% de similaridade com o banco de dados 16S SILVA (Quast et al., 2013).

Quadro 1. Informações sobre a região V4 do gene 16S ribossomal (Caporaso et al., 2012)

Região	Tamanho do fragmento	Primer	Sequência do Primer (5' - 3')
V4	292 bp	515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
		806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT

Bioinformática e Análises dos dados

Os *amplicons* das amostras de sedimentos foram submetidos a uma série de análises utilizando o programa computacional QIIME (versão 1.9.1). Este programa consiste de um pipeline para análise comparativa de comunidades microbianas em vários ambientes. A principal função desta ferramenta de bioinformática é a classificação das sequências dentro de unidades taxonômicas (por vezes até o nível de espécies), análise filogenética, análise de biodiversidade e estatística (Caporaso et al., 2011).

A Análise de Coordenadas Principais (Principal Coordinates Analysis – PCoA) foi realizada com a finalidade de demonstrar a similaridade ou distância relativa entre grupos de amostras, com base na heterogeneidade na composição das comunidades (beta diversidade) (LEGENDRE, 2012). Esta análise permite compreender as variações na estrutura da comunidade microbiana, permitindo uma visão mais robusta da distribuição das amostras a partir da matriz de OTUs, no software QIIME (v1.9.1).

Para estimar a diversidade alfa foram utilizados três métricas: Chao1, que estima a riqueza de espécies; OTUs observadas, que estimam a quantidade de unidades taxonômicas operacionais encontradas em cada amostra; e índice de Shannon, que estima a diversidade de espécies. As curvas de rarefação foram geradas com base no número de OTUs observadas em cada tratamento. O diagrama de Venn foi gerado a partir de uma ferramenta da web.

RESULTADOS

Efeito do Petróleo sob à diversidade dos grupos microbianos de sedimentos de mangue da Mata Atlântica

As sequências efetivas foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) considerando 97% de similaridade através do banco de dados SILVA. O número de OTUs das 6 amostras representando os diferentes tempos (t1= 7 dias; t2= 15 dias e t3= 30 dias) variou no intervalo de 2447.800 para 4399.300, usando nível de corte de 3% (Tabela 1), sendo a amostra P2t1 contendo o menor número de OTUs e a amostra P1t2 o maior número de OTUs, ou seja a P1t2 apresentou a maior riqueza e diversidade em relação as demais amostras, confirmando esse resultado com o valor revelado no índice de diversidade chao1 e Shannon, já a amostra P2t1 obteve os menores índices de diversidade em relação aos demais tempos (Tabela 1).

Comparando o ambiente autóctone com o mesmo após exposição ao óleo, notou-se uma redução drástica do número de sequências/amostra, na qual obteve-se cerca de 100.000 sequências geradas pelo ambiente autóctone, porém, aproximadamente, 20.000 sequências foram geradas após contaminação, onde posterior a condição de simulação do impacto, apenas 20% do ambiente anterior conseguiu ser representado. Também, ainda sobre os resultados da comparação dos ambientes, é perceptível a redução da porcentagem das Archaea e, conseqüente aumento da porcentagem de bactérias nas amostras. A curva de rarefação das 6 amostras representadas revela que o platô não foi alcançado, indicando que a quantidade de sequências foi insuficiente para demonstrar a diversidade total (Fig. 4).

SAMPLE ID	SEQS/SAMPLE	CHAO1 AVE	OBSERVED_OTUS AVE.	SHANNON
P1T1	19500.0	9589.651	4354.000	5.22
P1T2	19500.0	9955.081	4399.300	5.34
P1T3	19500.0	6684.959	3695.400	4.71
P2T1	19500.0	2954.565	2447.800	3.01
P2T2	19500.0	5663.635	3743.000	4.77
P2T3	19500.0	6413.320	3761.900	4.77

Tabela 1. Sequências das amostras contaminadas por hidrocarbonetos e índices de diversidade do estudo

As OTUs geradas pelas sequências parciais do gene 16S rRNA da região V4 detectou 73 grupos referentes ao nível taxonômico de filo, sendo 25 identificados, onde dessas, 3,1 % pertencem ao Domínio Archaea: *Crenarchaeota*; *Euryarchaeota* e *Parvarchaeota* e, 22 filios (94,6 %) fazem partedo Domínio Bactéria: *Acidobacteria*; *Actinobacteria*; *Armatimonadetes*; *Bacteroidetes*; *Caldithrix*; *Chlamydiae*; *Chlorobi*; *Chloroflexi*; *Cyanobacteria*; *Elusimicrobia*; *Fibrobacteres*; *Firmicutes*; *Fusobacterix*; *Gemmatimonadetes*; *Lentisphaerae*; *Nitrospirae*; *Planctomycetes*; *Poribacteria*; *Proteobacteria*; *Spirochaetes*; *Tenericutes*; e *Verrucomicrobia* (Fig. 5).

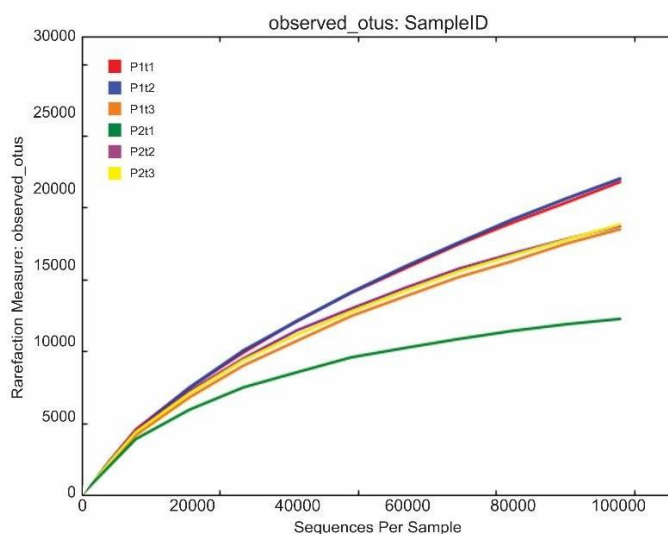


Figura 4. Curvas de rarefação para OTU da comunidade microbiana das amostras de sedimentos contaminados por hidrocarbonetos do ecossistema de mangue

- Os 10 filos mais representativos do Domínio bactéria foram:
- *Proteobacteria* (60,8%), *Chloroflexi* (9,9%), *Planctomycetes* (3,9%),
 - *Bacteroidetes* (3,1%), *Acidobacteria* (2,3%),
 - *Cyanobacteria* (2,2%), *Actinobacteria* (2,1%), *Firmicutes* (2,0%),
 - *Spirochaetes* (1,3%) e *Gemmatimonadetes* (1,1%).

Todavia, o filo *Proteobacteria* foi o mais predominante em todos os tempos avaliados e nos diferentes ambientes (alagado e sem interferência marinha), sendo a maior porcentagem representada na amostra P1t2 (71,6%) e menor porcentagem observada na amostra P2t1 (61,6%), porém nota-se que na área alagada o referente filo manteve-se em maior abundância quando comparado a área sem interferência marinha, sendo os valores de 69%, 71,6% e 69,3%, referem-se as amostras P1t1, P1t2 e P1t3, respectivamente, enquanto que os percentuais 61,6%, 68,8% e 70% equivalem as amostras P2t1, P2t2 e P2t3, respectivamente (Fig. 5). Assim, no filo *Proteobacteria*, as três classes mais representativas foram as *Gammaproteobacteria* (29,1%), *Alphaproteobacteria* (18,5%) e a *Deltaproteobacteria* (12%), contudo as proporções variaram entre as amostras (Fig. Sup. 6).

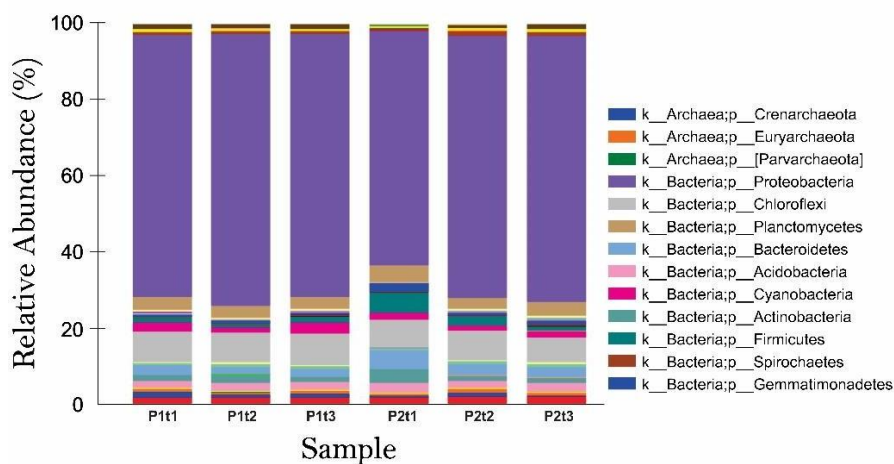


Figura 5. Abundância relativa dos principais grupos no nível de filo da comunidade microbiana nas amostras de sedimentos contaminados por hidrocarbonetos do ecossistema de mangue

A classe, com maior abundância em todas amostras, *Gammaproteobacteria*, esteve presente em maior abundância nas amostras P1t3 e P2t1 (40,2% e 42,1%, no filo Proteobacteria, respectivamente) e menor abundância na amostra P2t2 (24,7%). *Alphaproteobacteria* foi a classe que esteve presente em maior porcentagem em P2T2 (33,4%) e menor em P1t3 e P2t1 (16,5% e 15,1%, respectivamente). Já a classe *Deltaproteobacteria* apresentou maiores proporções nas amostras P1t1 e P1t2 (11,2%

e 11,3%, respectivamente), além de menores proporções em P2t1 (4,2%) (Fig. 6).

O segundo filo mais abundante, *Chloroflexi*, teve sua maior representação na amostra P1t3 (8,5%) e menor abundância na amostra P2t3 (6,8%), apresentando a mesma característica demonstrada com as *Proteobacterias*, encontrando-se em maiores valores nos diferentes tempos da área alagada (t1= 7,9%; t2=8% e t3= 8,5%) e menores valores nos diferentes tempos da área que não sofre interferência da maré (t1= 7,4%; t2= 7,7% e t3= 6,8%). Já o filo *Planctomycetes* apresentou valor de maior abundância na amostra P2t1 (4,5%) e menor abundância na amostra P2t2 (2,9%), contudo apresentou maior valor percentual no ambiente sem interferência marinha e menor no ambiente alagado (Fig. 5).

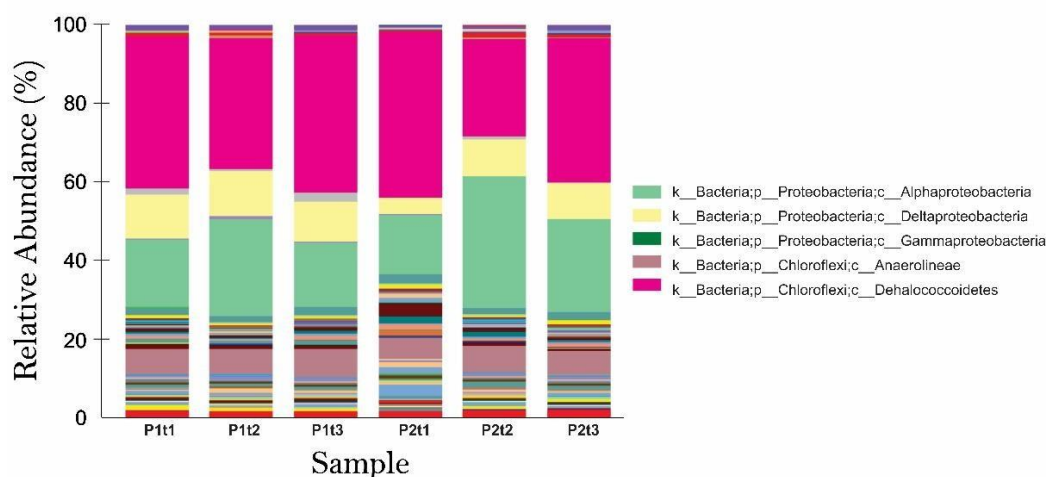


Figura 6- Abundância relativa dos principais grupos no nível de classe da comunidade microbiana nas amostras de sedimentos contaminados por hidrocarbonetos do ecossistema demangue

O filo *Chloroflexi* foi representado pelas classes: *Anaerolineae* (7,2%) e *Dehalococcoidetes* (1,8%), sendo a *Anaerolineae* mais abundante na amostra P1t3 (7,4%) e menos abundante na amostra P2t1 (5,5%), já a classe *Dehalococcoidetes* apresentou maiores porcentagens nas amostras de área alagada, onde P1t1, P1t2 e P1t3 geraram as seguintes proporções, 1,2%, 0,8% e 0,7% (Fig. 5). Na área sem interferência marinha esses valores demonstraram estar abaixo e até não apresentar a ocorrência dessa classe em uma das amostras, como o caso do P2t1= 0% (P2t2= 0,6% e P2t3= 0,4%). Logo, a classe *Planctomycetia* é a que apresenta maior valor percentual (2,2%) no filo *Planctomycetes*, sendo distribuído entre as diferentes amostras. Portanto, a maior abundância está presente na amostra P1t1, P1t3, P2t1 e

P2t3 (2%, 2,1%,2,4% e 2%, respectivamente) e em menor abundancia nas amostras P1t2 e P2t2(1,6% e 1,8%, respectivamente) (Fig. 6).

Bacteroidetes foi o filo que apresentou maior representatividade na amostra P2t1 (4,9%) e menor na amostra P1t2 (2,1%). Portanto, a classe mais abundante desse filo foi o *Bacteroidia* (1,3%), onde desse percentual, a amostra P2t2 (1,7%) foi mais representativa e os menores valores de abundancia foram observados nas amostras P1t2, P1t3 e P2t1 (0,8%, 0,8% e 0,6%). Já a *Acidobacteria* foi maior na amostra P2t1 (2,8%) e menor na amostra P1t1 (1,7%). A *Cyanobacteria* teve sua maior porcentagem na amostra P1t3 (2,8%) e menor porcentagem nas amostras P1t2 e P2t2 (1,2% e 1,3%, respectivamente). O filo *Actinobacteria* na amostra P2t1 (3,6%) foi mais representativo do que na amostra P1t3 (1,1%), onde teve menor representatividade (Fig. 5).

Sobre o Domínio Archaea, nas amostras de superfície e subsuperfície, a maior proporção foi do filo *Crenarchaeota* em todas as amostras (1,9%), seguido do *Euryarchaeota* (1,1%) e *Parvarchaeota* (0,1%), respectivamente. O filo *Crenarchaeota* se mostrou mais expressivo nas amostras P1t1, P1t2, P1t3 e P2t2 (1,5%, 1%, 1,1% e 1%, respectivamente) e menos abundante nas amostras P2t1 e P2t3 (0,5% e 0,3%, respectivamente). O *Euryarchaeota* apresentou proporções não muito diferenciadas, sendo maior nas amostras P1t3 e P2t2 (0,9%, em ambas) e menores proporções em P1t2 e P2t1 (0,6% e 0,5%), já o filo *Parvarchaeota* demonstrou-se praticamente inexpressiva, com 0,1%, surgindo apenas nas amostras P1t1, P2t2 e P2t3 (Fig. 5).

Sobre o resultado da análise de coordenada principal (PCoA) foi gerada uma explicação de 85,74% do total da variância amostrada dos sítios. Sendo que 57,65 %, 18,56% e 9,53% explicando na PC 1, 2 e 3, respectivamente. É importante notar essa porcentagem de variação indicada nos eixos, uma vez que o eixo vertical representa uma menor porcentagem do que o eixo horizontal. Com o gráfico obtido é possível observar que houve diferenças entre os pontos de coleta, onde as estruturas da comunidade bacteriana de Mata Atlântica que foram contaminadas com petróleo geraram algumas dissimilaridades entre os diferentes tempos aos quais foram submetidas (Fig. 7).

Através do resultado gerado das curvas de rarefação observar-se que as amostras não conseguiram atingir o platô, o que sugere que o sequenciamento não foi suficiente para cobrir o total das espécies bacterianas presentes nas amostras

coletadas. A curva de rarefação mostra a maior riqueza de espécies na amostra P1t2 (15 dias após perturbação da área alagada), sendo a menor unidade taxonômica operacional demonstrada pela amostra P2t1 (7 dias após perturbação de área sem interferência marinha) (Fig. 4).

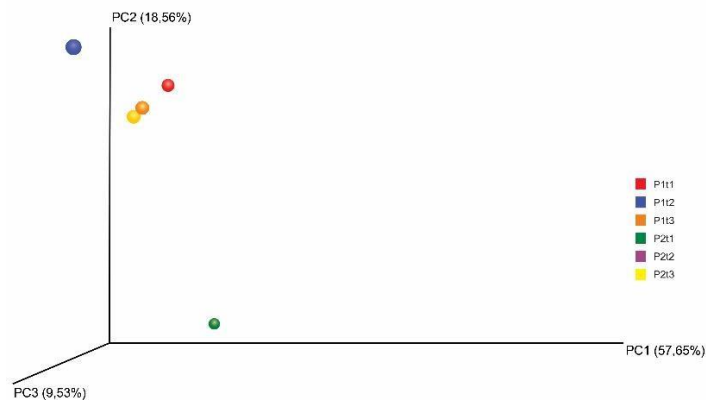


Figura 7. Resultado da Análise de coordenadas principais (PCoA) com QIIME ponderado em amostras de sedimentos contaminados por hidrocarbonetos do ecossistema de mangue

Os resultados dos diagramas de Venn das amostras das comunidades do sítio 1 e 2 demonstram que a cobertura e a riqueza das diversidades foram calculadas para cada conjunto de dados. Sendo que, a amostra P1t2, do sítio 1, apresentou maior riqueza comparada a representação dos outros tempos juntos, gerando 131 OTUs (13%), a amostra P1t1 apresentou menos que o dobro do valor de OTUs geradas em 15 dias de contaminação (6,2% - 63 OTUs), já o P1t3 obteve grande perda no número de OTUs, representando apenas 1% (10 OTUs) quando comparado as outras amostras ao nível de 97% de similaridade. Os resultados geraram 593 OTUs (58,8%) compartilhadas nos três diferentes tempos de exposição ao hidrocarboneto e o número de OTUs exclusivas totalizou 204 (20,2%) (Fig. 8).

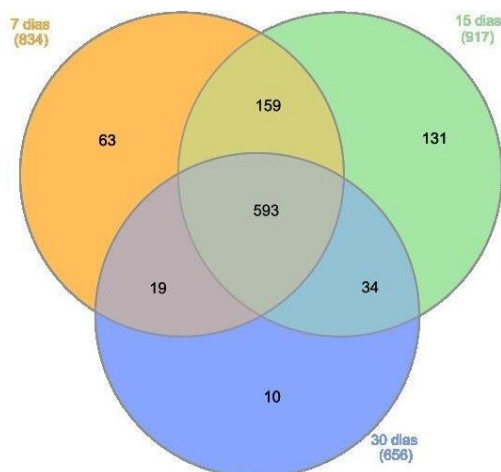


Figura 8. Diagrama de Venn das sequências do gene 16S rRNA de sedimentos do solo contaminado da Bahia, totalizando 1009 Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs)

Contudo, a partir dos resultados obtidos pelo diagrama de Venn do sítio2, observa-se a queda no número de OTUs, desde o t1 até o t3, sendo a cobertura e a riqueza das diversidades calculadas para cada conjunto de dados. Portanto, a amostra P2t1 representou a maior riqueza, com 56 OTUs (6,8 %), a amostra P2t2 gerou 45 OTUs (5,4 %) comparado ao nível de 97% de similaridade das outras amostras, e na amostra P2t3 observou-se a menor quantidade de OTUs (1,3 % -11). Sendo que 563 OTUs (68,1 %) foram compartilhadas nos três diferentes tempos de exposição ao hidrocarboneto e o número de OTUs exclusivas totalizou 112 (13,6 %) (Fig. 9).



Figura 9. Diagrama de Venn das sequências do gene 16S rRNA de sedimentos do solo contaminado da Bahia, totalizando 827 Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs)

DISCUSSÃO

Efeito do Petróleo sob à diversidade dos grupos microbianos de sedimentos demangue da Mata Atlântica

A partir dos resultados obtidos da estrutura e diversidade da comunidade microbiana autóctone após o experimento de contaminação por hidrocarbonetos do petróleo da Bacia do Recôncavo, nota-se que houve perdas significativas de células bacterianas ao longo do tempo e provocada, estritamente, pelo contato direto do contaminante sob os grupos.

De acordo com o que pode ser observado em todas as amostras, há o aumento expressivo do grupo taxonômico *Proteobacteria*, onde esse corresponde a mais de 60 % em cada uma das amostras. Este filo já havia se destacado, em todas as amostras, no estudo de sedimento do ambiente autóctone, sendo sua maior representação na área que não recebe influência do mar (34,54 %), porém após adição do hidrocarboneto o percentual do grupo dobrou e passou a ser mais representativo na área alagada. Ao que tudo indica, esse grupo de micro-organismos pode estar relacionado com a degradação de compostos do hidrocarboneto, já que ocorrem preferencialmente em áreas impactadas e, principalmente, por demonstrar maior destaque quando em contato com o contaminante. Tal observação já tem sido relatada por diferentes estudos em várias áreas de ambiente marinho e com histórico de contaminação Liu et al., (2019), Zhang et al. (2018), Zhang et al. (2017) e Nunes (2006).

No filo *Proteobacteria* é encontrado micro-organismos aeróbicos, anaeróbicos, autotróficos ou heterotróficos, além de ser um grupo comum em ambientes marinhos (Margulis; Schwartz, 1998), o que ajuda a justificar o fato de estarem presentes em abundância nesses ambientes, já que se trata de um grupo bastante diversificado. A presença desse grupo em manguezais também pode indicar que é bem adaptado às áreas lamacentas, pois estudos sugerem que alguns grupos, pertencentes a esse filo, tem função sulfato-redutoras (Hayese Lovely (2002), sem contar com que é um grupo caracterizado como eficiente na degradação de hidrocarbonetos, e também de componentes aromáticos, halifáticos e estruturas moleculares (Atlas, 1981). A ocorrência desses micro-organismos em valores bastantes abundantes e em diferentes localidades do globo terrestre levam vários estudos a acreditarem que se

trata de um grupo bacteriano cosmopolita em ecossistemas manguezais e, principalmente por dentro do Domínio bactéria, as *Proteobacterias* representam um dos maiores filos (Garrity et al., 2004).

Ambientes de planícies lamacentas não são estáveis, principalmente porque são regiões que estão expostas à inundações contantes da maré, o que faz com que os fatores ambientais tornem-se bastante variáveis, a exemplo da salinidade, disponibilidade de nutrientes. Por outro lado, os micro-organismos presentes nas zonas de contato do ambiente costeiro e marinho, em situação de maré baixa, são mais estáveis, e isso se justifica porque, na maior parte do tempo, ficam submersos, sendo expostos apenas brevemente em época de maré extremamente baixa, já em condições de maré alta a situação torna-se oposta (Zhang et al., 2018). Talvez, por as áreas alagadas apresentarem grupos mais estáveis, sugere-se que também sejam representados por comunidades únicas e, por esta razão nessa localidade obtiveram-se maiores índices de diversidade do que quando comparado a área que não tem influência da maré.

A área sem interferência do mar, já por apresentar menor riqueza, sofre maior impacto quando exposto ao contaminante, o fato de apresentar menor riqueza pode indicar que o local apresenta condições ambientais mais extremas para o desenvolvimento de grupos bacterianos, como o menor teor de matéria orgânica, baixa quantidade de nutrientes, menor umidade. Logo, poucos grupos de micro-organismos conseguem sobreviver a essas condições e ainda à exposição por óleo. Os hidrocarbonetos do petróleo são poluentes orgânicos altamente persistentes, com características recalcitrantes e apresentam altos níveis de toxicidade (ZHANG et al., 2011; CHANDRA et al., 2013; MECKENSTOCK et al., 2016; VARJANI, 2017). No entanto, as bactérias, juntamente com os fungos, apresentam maior utilidade na remoção de locais impactados, e isso se deve a maior abundância dos grupos, a grande diversidade genética de espécies, mobilidade metabólica, assim como a capacidade de adaptação às condições adversas do meio (ALONGI, 1988; KATAOKA, 2001; HOLGUIN et al., 2001; TIAN et al., 2008; ABATENH et al., 2017).

A partir dos resultados gerados sobre as porcentagens dos Domínios Bactéria e Archaea, percebe-se que após exposição ao hidrocarboneto, às novas condições geradas são desfavoráveis para o crescimento das Archaea, enquanto que as bactérias adaptam-se melhor e ocupam o espaço que antes

fora preenchido pelas Archaea. De acordo com MELO, (2010) as bactérias são organismos mais eficientes na eliminação de compostos orgânicos presentes em sedimento. Diante desse contexto, as Archaea podem funcionar como bioindicadoras de ambientes contaminados.

O filo *Proteobacteria* foi representado com maior abundância das classes *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Alphaproteobacteria* no ambiente autóctone, porém em condição pós impacto por hidrocarbonetos, esse cenário apresentou outra conformação, na qual as *Gammaproteobacteria* e *Alphaproteobacteria* passaram a ser mais representativas que a *Deltaproteobacteria*. Isso sugere que algumas cepas do grupo *Gammaproteobacteria* tenham maior importância funcional para a degradação do composto, principalmente como bactérias primárias, já que se nutrem, exclusivamente, de hidrocarbonetos (RAHMAN et al. 2003; YAKIMOV et al., 2007; BROOIJMANS et al., 2009; LANG et al., 2016). Algumas bactérias tem uma frequência em trabalhos de biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo, como é o caso das *Firmicutes*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Betaproteobacteria* e *Bacteroidetes* (ROY et al., 2018).

Segundo o trabalho de Zhang et al., 2017, no qual foi realizado um comparativo da comunidade microbiana em dois ambientes, degradado e saudável, no ambiente de solo degradado, houve maior ocorrência dos grupos *Proteobacteria*, *Acidobacteria* e *Bacteroidetes*. Contudo, em solo saudável estavam presentes em maior abundância os filios *Actinobacteria* e *Firmicutes*.

O filo *Chloroflexi* se manteve como o segundo mais abundante no ambiente após simulação da contaminação ambiental, muito embora sua expressividade tenha sido diminuída a, praticamente, menos da metade. Além disso, a classe *Anaerolineae* superou a abundância do grupo *Dehalococcoide*, classe essa que, de acordo com o trabalho de Adrian (2009), cepas de culturas mistas tinham sido utilizadas em estudo de biorremediação de locais impactados. Talvez as cepas do grupo *Dehalococcoide* presentes na área de estudo não sejam tão eficientes para esse processo. Portanto, alterações na abundância dos grupos microbianos podem ser observadas em regiões de solos contaminados quando comparados a ambientes de solos saudáveis, já que alguns grupos que apresentem determinadas funções podem compensar a

ausência ou redução de outros, para dar continuidade aos processos biológicos (Kennedy, 1999) .

Por meio dos resultados obtidos no diagrama de Venn, nota-se que tanto no sítio 1, como no 2, ocorre uma redução acentuada das células bacterianas ao final de 30 dias de adição do petróleo, sendo que após esse período a estrutura e diversidade das comunidades microbianas do sedimento de manguezal é afetado quase que completamente. Demonstrado que em um curto período de tempo pode haver uma dinâmica compensatória em alguns grupos e efeito negativo sobre a comunidade microbiana. Em vista disso, é notória a influência negativa das atividades antrópicas na conservação microbiana, ocasionando a redução da diversidade de espécies, sendo que são grupos pertencentes à base da cadeia trófica, associados a processos ecológicos do solo e, portanto, responsáveis pela reciclagem de materiais orgânicos objetivando a geração de nutrientes para o solo e outros organismos (Zilli et al., 2003). Assim, a saúde do solo está intimamente relacionada com a rica diversidade microbiana existente, contudo, os solos degradados por hidrocarbonetos tendem a ser seriamente comprometidos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados do comparativo entre os ambientes, anterior a contaminação e o impactado, é possível perceber e avaliar o efeito negativo e de empobrecimento que o petróleo oferece ao meio ambiente, principalmente sob as comunidades microbianas e, de efeito rápido, ocorrendo mudanças logo no primeiro impacto. Portanto, os hidrocarbonetos ofereceram uma redução significativa na estrutura da comunidade microbiana autóctone, sendo assim, nossa hipótese conseguiu ser respondida satisfatoriamente.

Contudo, locais perturbados com compostos poluentes também podem ser considerados boa fonte de obtenção de organismos para estudos de biorremediação, uma vez que o ambiente impactado atue como um meio seletivo para o surgimento desses micro-organismos, bem como os que permanecem nestes locais apresentam capacidade de adaptação as novas condições ambientais e ao poluente, que pode ser utilizado como fonte de nutrientes para o crescimento desses grupos em específico.

REFERÊNCIAS

- ABATENH, E. et al. Application of microorganisms in bioremediation-review. **Journal of Environmental Microbiology**, v. 1, n. 1, 2017.
- ADRIAN, Lorenz. ERC-group microflex: microbiology of Dehalococcoides-like Chloroflexi. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 8, n. 3, p. 225-229, 2009.
- ALONGI, Daniel M. Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. **Microbial ecology**, v. 15, n. 1, p. 59-79, 1988.
- ATLAS, Ronald M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological reviews**, v. 45, n. 1, p. 180, 1981.
- BELLOTTO, Valéria R.; KUROSHIMA, Kátia Naomi; CECANHO, Fernanda. Poluentes no ambiente estuarino e efeitos da atividade de dragagem. **Estuário do Rio Itajaí-Açu, Santa Catarina: caracterização ambiental e alterações antrópicas. Itajaí: UNIVALI, Cap**, v. 7, p. 105-126, 2009.
- BERGA, Mercè; SZÉKELY, Anna J.; LANGENHEDER, Silke. Effects of disturbance intensity and frequency on bacterial community composition and function. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36959, 2012.
- BROOIJMANS, Rob JW; PASTINK, Margreet I.; SIEZEN, Roland J. Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew. **Microbial biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 587-594, 2009.
- CAPORASO, J. Gregory et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 108, n. Supplement 1, p. 4516-4522, 2011.
- CAPORASO, J. Gregory et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME journal**, v. 6, n. 8, p. 1621, 2012.
- CARRASCO, M. et al. Assessment of urban and industrial contamination levels in the bay of Cádiz, SW Spain. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 3, p. 335- 345, 2003.
- COETSER, S. E.; CLOETE, T. E. Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. **Crit Rev Microbiol**, v. 3, n.4, p.213 – 32, 2005.
- CHANDRA, Subhash et al. Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. **Annals of microbiology**, v. 63, n. 2, p. 417-431, 2013.
- DANIEL, Rolf. The metagenomics of soil. **Nature reviews microbiology**, v. 3, n.6, p. 470, 2005.

FONTANA, N. N. Avaliação de três diferentes meios de cultura para a quantificação de microrganismos do solo em sistema de plantio direto e convencional. 2010. 42 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Ambiental) - Faculdade Dinâmica das Cataratas (UDC). Foz do Iguaçu – PR, 2010.

GARRITY, George M.; BELL, Julia A.; LILBURN, Timothy G. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. **Springer, New York, Berlin, Heidelberg**, 2004.

HAYES, L. A.; LOVLEY, D. R. Specific 16S rDNA sequences associated with naphthalene degradation under sulfate-reducing conditions in harbor sediments. **Microbial ecology**, v. 43, n. 1, p. 134-145, 2002.

HOLGUIN, Gina; VAZQUEZ, Patricia; BASHAN, Yoav. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and fertility of soils**, v. 33, n. 4, p. 265-278, 2001.

JIAO, Shuo et al. Microbial succession in response to pollutants in batch-enrichment culture. **Scientific reports**, v. 6, p. 21791, 2016.

KATAOKA, Hisashi; KIYOHARA, Satoshi. **Modified fish oil type material containing highly unsaturated fatty acid and/or esters thereof, and a composition containing said material**. U.S. Patent n. 6,235,331, 22 maio 2001.

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, p. 65-76, 1999.

LANG, F. S. et al. Characterization and evaluation of the potential of a diesel-degrading bacterial consortium isolated from fresh mangrove sediment. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 2, p. 58, 2016.

LEGENDRE, Pierre; LEGENDRE, Louis. Ecologia numérica. 3rd ed inglês. **Desenvolvimentos em modelagem ambiental**, v. 24, 2012.

LIU, MIN et al. Microbial community structure of soils in Bamenwan mangrove wetland. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 8406, 2019.

MARGULIS, Lynn; SCHWARTZ, Karlene V.; GOULD, Stephen Jay. **Five kingdoms: an illustrated guide to the phyla of life on earth**. New York: WH freeman, 1998.

MECKENSTOCK, Rainer U. et al. Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 26, n. 1-3, p. 92-118, 2016

MELO, L. DE A. L. **Potencial de degradação do petróleo por fungos isolados de sedimentos de manguezal impactado**. Recife, Pernambuco, 2010. 58 p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

MUTECA, F. L. L. Biorremediação de solo contaminado com óleo cru proveniente de Angola. Dissertação de mestrado, RJ, 2012.

NUNES, Gisele Lopes. **Diversidade e estrutura de comunidades de Bacteriae Archaea em solo de mangue contaminado com hidrocarbonetos de petróleo.** 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

OCT - ORGANIZAÇÃO DE CONSERVAÇÃO DA TERRA. 2012, Disponível em: <<http://www.oct.org.br/>>. Acesso em 30/07/2019.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLOCKNER, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acid Res.**, 41, pp. D590-D596. 2013.

RAHMAN, I. A. et al. Adsorption characteristics of malachite green on activated carbon derived from rice husks produced by chemical-thermal process. **Bioresource technology**, v. 96, n. 14, p. 1578-1583, 2005.

ROCHA, L. L. Estudo de comunidades bacterianas de solo do manguezal da Barra Grande, Icapui – CE e seleção de cepas com potencial para degradar petróleo. Dissertação de mestrado, Fortaleza-CE, 2008.

ROSA, Rogério da Silva et al. Importância da compreensão dos ciclos biogeoquímicos para o desenvolvimento sustentável. **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS-São Carlos-SP-2003**, 2003.

ROY, A. et al. Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. **Bioresource technology**, v. 253, p. 22-32, 2018.

Rytönen J., Itävaara M., Paulsen J. E. The Improvement of oil biodegradation on the shoreline. In: Proceedings of the 7th International Offshore and Polar Engineering Conference, Honolulu, USA, 2(1):25-30. 1997

SCHWEDER, T. *et al.* Screening for new metabolites from marine microorganisms. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v.96, p.1-48, 2005.

TIAN, Bo et al. Analyzing the habitat suitability for migratory birds at the Chongming Dongtan Nature Reserve in Shanghai, China. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 80, n. 2, p. 296-302, 2008

VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource technology**, v. 223, p. 277-286, 2017.

VON MERING, C. *et al.* Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments. **Science**, v.315, n.10, Feb, p.1126-30, 2007.

WAN NF, JIANG JX, LI B. Modeling ecological two-sidedness for complex ecosystems. **Ecol Model** 287:36–43. doi:10.1016/j.ecolmodel.2014.04.011. 2014.

YAKIMOV, Michail M.; TIMMIS, Kenneth N.; GOLYSHIN, Peter N. Obligate oil-

degrading marine bacteria. **Current opinion in biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 257-266, 2007.

ZAGATTO, P.A. Ecotoxicologia. Capítulo 1. In: ZAGATTO, P.A. & BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. Rima. São Carlos. SP. 1-13p. 2006.

ZHANG, Zhengzhi et al. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 5, p. 4111-4116, 2011.

ZHANG, Hongchun et al. Microbial taxa and functional genes shift in degraded soil with bacterial wilt. **Scientific reports**, v. 7, p. 39911, 2017.

ZHANG, Xiaoying et al. Composition and functional diversity of microbial community across a mangrove-inhabited mudflat as revealed by 16S rDNA gene sequences. **Science of the Total Environment**, v. 633, p. 518-528, 2018.

ZILLI, Jerri Édson et al. Diversidade microbiana como indicador de qualidade dosolo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.