

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA TERRA
CENTRO DE ESTUDOS DO MAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS COSTEIROS E OCEÂNICOS – PGSISCO

CATHERINE GERIKAS RIBEIRO

**DIVERSIDADE PROCARIÓTICA EM SEDIMENTOS DE DOIS
MANGUEZAIS, COM DISTINTOS NÍVEIS DE POLUIÇÃO, NO
COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, PARANÁ,
BRASIL**

PONTAL DO SUL

2010

CATHERINE GERIKAS RIBEIRO

**DIVERSIDADE PROCARIÓTICA EM SEDIMENTOS DE DOIS
MANGUEZAIS, COM DISTINTOS NÍVEIS DE POLUIÇÃO, NO
COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, PARANÁ,
BRASIL**

Dissertação apresentada ao Centro de Estudos do Mar como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Sistemas Costeiros e Oceânicos, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dr^a. Hedda Elisabeth Kolm
Co-orientadora: Dr^a. Maria Berenice Reynaud Steffens

PONTAL DO SUL

2010

R484d Ribeiro, Catherine Gerikas (1982-)
Diversidade procariótica em sedimentos de dois manguezais,
com distintos níveis de poluição, no Complexo Estuarino de Paranaguá,
Paraná, Brasil / Catherine Gerikas Ribeiro. – Pontal do Paraná,
2011.
108 f.; 29 cm.

Orientadora: Profª Drª. Hedda Elisabeth Kolm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em
Sistemas Costeiros e Oceânicos, Centro de Estudos do Mar, Setor de
Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

1. Diversidade procariótica. 2. Manguezais. 3. Bactéria.
4. Archaea. 5.16S rRNA. I. Título. II. Hedda Elisabeth Kolm
III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 589.9



**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS
COSTEIROS E OCEÂNICOS**

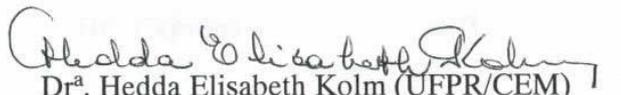
Centro de Estudos do Mar - Setor Ciências da Terra - UFPR
Avn. Beira-mar, s/nº - Pontal do Sul - Pontal do Paraná - Paraná - Brasil
Tel. (41)3455-3620 - Fax (41)3455-3623 - www.cem.ufpr.br/pgsisco - E-mail: pgsisco@ufpr.br

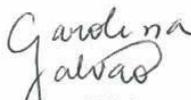
TERMO DE APROVAÇÃO

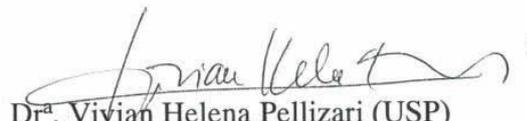
Catherine Gérikas Ribeiro

“Diversidade de Bactéria e Archaea em sedimentos de mangue da Baía de Paranaguá”.

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Sistemas Costeiros e Oceânicos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:


Dr.^a Hedda Elisabeth Kolm (UFPR/CEM)
Orientadora e Presidente


Dr.^a Carolina Weigert Galvão (UEPG)
Membro Examinador


Dr.^a Vivian Helena Pellizari (USP)
Membro Examinador

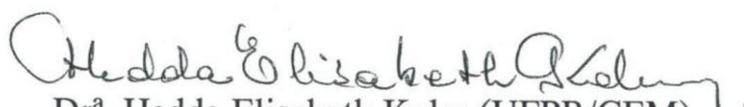
Pontal do Paraná, 22 de março de 2010.

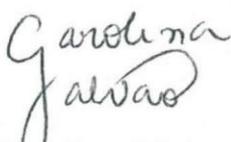
“Diversidade de Bactéria e Archaea em sedimentos de mangue da Baía de Paranaguá”

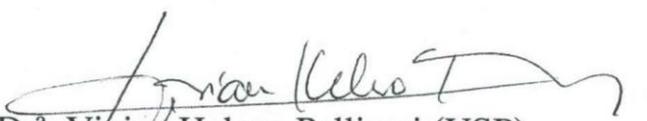
POR

Catherine Gériques Ribeiro

Dissertação nº 57 aprovada como requisito parcial do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:


Dr^a. Hedda Elisabeth Kolm (UFPR/CEM)
Orientadora e Presidente


Dr^a. Carolina Weigert Galvão (UEPG)
Membro Examinador


Dr^a. Vivian Helena Pellizari (USP)
Membro Examinador

Pontal do Paraná, 22 de março de 2010.



"...and her face brightened up at the thought that she was now the right size for going through the little door into that lovely garden..."

*Lewis Carroll,
Alice's Adventures in Wonderland*

À minha mãe, Darcy Gériques, e ao meu pai, Maurício Pereira Ribeiro, por todo amor e ensinamentos compartilhados durante todos esses anos

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha querida orientadora prof^a. Dr^a. Hedda Elisabeth Kolm por todo apoio, disposição e carinho durante todos esses anos, sempre pronta a permitir vôos intelectuais ou a chamar os pés ao chão, quando necessário.

À minha estimada co-orientadora prof^a. Dr^a. Maria Berenice Reynaud Steffens por acolher minha vontade de ingressar na biologia molecular e por todo apoio técnico, intelectual e emocional durante essa jornada.

Ao prof. MSc.Rafael Mazer Etto, pelo apoio total que sem o qual este trabalho não seria possível. Agradeço de todo o coração por estar sempre perto e sempre disposto a discutir tanto a parte da biologia molecular quanto outros assuntos que engrandeceram não só esta dissertação, mas todo um modo de visão do mundo que nos rodeia.

À prof^a. Dr^a. Carolina Weigert Galvão pelo carinho com que me acolheu desde o primeiro momento em seu laboratório assim como na convivência cotidiana, e à Isabelinha por ter iluminado com seu sorriso minha passagem por Ponta Grossa.

Ao prof. Dr. Leonardo Cruz pela ajuda na elaboração do presente trabalho.

À doutoranda Maria Isabel Stets, que me ensinou muito e continua me ensinando com sua conduta profissional, dedicação e amizade.

Ao mestrando Fernando Gomes, meu IC-mor, querido amigo, companheiro de tantas histórias, e ainda há tantas a serem vividas. Agradecida não só pelo apoio nas técnicas laboratoriais, mas por todos os momentos de convivência, onde aprendi a ser uma pessoa melhor.

Aos demais colegas de laboratório - tanto de Curitiba quanto de Ponta Grossa - com quem tive o prazer de conviver, em especial à Lívia, Maiara, Fernanda e Solane.

Ao Núcleo de Fixação de Nitrogênio da Universidade Federal do Paraná e ao Laboratório de Ecologia Molecular e Reparo de DNA da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelo apoio imprescindível à execução deste trabalho.

Ao prof. Dr. Ricardo Ayub pelo apoio nas análises moleculares.

Ao Laboratório de Geoquímica Orgânica e Poluição Marinha do CEM/UFPR, em especial á Mariana Horigome Tatsumi, pela determinação de hidrocarbonetos alifáticos nas amostras de sedimento, e ao CNPq pelo apoio financeiro para realização desta.

Aos Laboratórios de Biogeoquímica e de Sedimentologia do Centro de Estudos do Mar (UFPR) pelas análises químicas e granulométricas.

À prof^a. Dr^a Carolina Weigert Galvão e à prof^a. Dr^a Vivian Helena Pellizari pela participação da banca avaliadora.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Agradeço àqueles que não estão diretamente ligados à conclusão desta pesquisa, mas a quem certamente eu devo minha evolução pessoal durante a elaboração da mesma:

À minha família, da qual eu tenho tanto orgulho. Não existiriam palavras para discorrer o quanto sou agradecida por toda uma vida de incentivo e amor. A vocês eu espero poder retornar toda a felicidade que eu tenho por fazer parte deste clã. Desculpem-me por estar sempre longe, mas meu coração está sempre junto de vocês.

Aos meus amigos da graduação/mestrado, em especial:

À Mylene, querida amiga, por tudo. Terei que usar um “tudo”, já que agradecer por esses anos de convivência dobrariam o número de páginas da dissertação. Em especial eu sou grata pelo Miguel, o afilhado mais lindo do mundo.

Ao Wagner, pelo carinho e pelas discussões, abstrações e maravilhosas idéias que iluminam nossas carreiras científicas.

À Lívia e ao Leonardo pela imprescindível ajuda e aventuras pelos manguezais paranaenses e pela grande amizade.

Aos meus amigos de Ponta Grossa, que enriqueceram não só minha passagem por esta cidade, mas toda a minha vida, em especial:

Ao Wanderley, vizinho querido, por todo apoio e incentivo, pelas conversas, pelas músicas e pelas viagens culinárias.

Ao pessoal que conheci no Observatório Astronômico, umas das escolhas de rumo mais gratificantes que poderiam acontecer:

À Twigy querida, pelos shows, pelos não-shows, pelas conversas, pelo companheirismo e pelas deliciosas jantas, compartilhadas por quem também sou absolutamente grata pela amizade: Jonathan e Vinícius. A saudade que sentirei de vocês não pode ser descrita.

Saindo do núcleo acadêmico, gostaria de agradecer em especial à Rafaela Travensolli, por compartilhar da sabedoria que transcende.

À música e à beleza inerentes à natureza.

In lak'ech

Hala Ken

Eu sou outro você

Você é outro eu

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
SUMÁRIO	v
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 MANGUEZAIS.....	2
2.2 PROCARIOTOS PRESENTES EM MANGUEZAIS.....	4
2.2.1 Diversidade.....	4
2.2.2 Funções ecológicas.....	6
2.3 FILOGENIA DE PROCARIOTOS.....	9
3 OBJETIVOS	15
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4 ÁREA DE ESTUDO	16
5 MATERIAIS E MÉTODOS	19
5.1 AMOSTRAGEM DE SEDIMENTOS NOS MANGUEZAIS DO CEP.....	19
5.2 ANÁLISE DE HIDROCARBONETOS.....	21
5.3 QUANTIFICAÇÃO DE NITRATO E FOSFATO.....	22
5.4 TEOR DE MATÉRIA ORGÂNICA.....	22
5.5 TEOR DE CARBONATO DE CÁLCIO.....	23
5.6 ANÁLISES GRANULOMÉTRICAS.....	23
5.7 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO, SALINIDADE E TEMPERATURA.....	23
5.8 SEPARAÇÃO DE PROCARIOTOS ADERIDOS AO SEDIMENTO PARA CONTAGEM DE PROCARIOTOS HETEROTRÓFICOS TOTAIS E CÁLCULO DA BIOMASSA PROCARIÓTICA.....	24
5.9 QUANTIFICAÇÃO DE PROCARIOTOS HETEROTRÓFICOS TOTAIS E CÁLCULO DA BIOMASSA PROCARIÓTICA.....	24
5.10 QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E <i>Escherichia coli</i>	25
5.11 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DO SEDIMENTO.....	25

5.12 MANIPULAÇÃO DE DNA.....	26
5.13 TÉCNICA DE ARDRA.....	27
5.13.1 Amplificação do gene 16S rRNA.....	27
5.13.2 Digestão em gel de poliacrilamida.....	28
5.14 BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS.....	28
5.14.1 Amplificação do gene 16S rRNA.....	28
5.14.2 Clonagem.....	29
5.14.3 Extração do DNA plasmidial em placas de 96 poços.....	31
5.14.4 Sequenciamento dos clones.....	32
5.14.5 Análise das sequências do gene 16S rRNA.....	33
6 RESULTADOS.....	34
6.1 PARÂMETROS AMBIENTAIS.....	34
6.1.1 Porcentagem de carbonato de cálcio e matéria orgânica.....	34
6.1.2 Porcentagens de cascalho, areia, silte e argila.....	36
6.1.3 Porcentagem de fosfato.....	36
6.1.4 Porcentagem de nitrato.....	37
6.1.5 Potencial Hidrogeniônico (pH)	39
6.1.6 Temperatura.....	40
6.1.7 Salinidade.....	41
6.1.8 Hidrocarbonetos.....	42
6.2 PARÂMETROS BIOLÓGICOS.....	45
6.2.1 Contagem de procariotos heterotróficos totais.....	45
6.2.2 Biomassa procariótica.....	46
6.2.3 Coliformes totais.....	47
6.2.4 <i>Escherichia coli</i>	48
6.2.5 Extração do DNA das amostras de solo.....	49
6.2.6 Amplificação do gene 16S rRNA.....	50
6.2.7 ARDRA.....	51
6.2.8 Bibliotecas do gene 16S rRNA.....	54
6.2.9 Identificação por seqüenciamento do gene 16S rRNA.....	54
6.2.9.1 Baías das Laranjeiras.....	54
6.2.9.2 Baía de Paranaguá.....	57
7 DISCUSSÃO.....	59

7.1 PARÂMETROS AMBIENTAIS.....	59
7.2 ARDRA.....	63
7.3 BIBLIOTECA METAGENÔMICA - <i>BACTERIA</i>	65
7.4 BIBLIOTECA METAGENÔMICA - <i>ARCHAEA</i>	68
7.5 A DIVERSIDADE PROCARIÓTICA COMO FERRAMENTA PARA CONSERVAÇÃO.....	70
8. CONCLUSÕES.....	71
9 REFERÊNCIAS.....	72
10 ANEXOS.....	82
11 APÊNDICES.....	92

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ORGANIZAÇÃO DA TAXONOMIA EM TRÊS DOMÍNIOS.....	11
FIGURA 2	MAPA DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DO 16S rRNA DE <i>E. coli</i> , MOSTRANDO A VARIABILIDADE/CONSERVAÇÃO NAS POSIÇÕES DE NUCLEOTÍDEOS.....	14
FIGURA 3	MAPA DO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, COM DESTAQUE DOS PONTOS DE AMOSTRAGENS.....	16
FIGURA 4	COLETA DE SEDIMENTO NA BAÍA DE LARANJEIRAS, INDICANDO PONTOS AMOSTRAIS.....	20
FIGURA 5	COLETA DE SEDIMENTO NA BAÍA DE PARANAGUÁ.....	21
FIGURA 6	DIFERENÇA SIGNIFICATIVA NA PORCENTAGEM DE CARBONATO DE CÁLCIO ENTRE AS ESTAÇÕES DAS BAÍAS DAS LARANJEIRAS E PARANAGUÁ PELO TESTE-t.....	34
FIGURA 7	DIFERENÇA SIGNIFICATIVA NA PORCENTAGEM DE MATÉRIA ORGÂNICA ENTRE AS ESTAÇÕES DAS BAÍAS DAS LARANJEIRAS E PARANAGUÁ PELO TESTE-t.....	35
FIGURA 8	DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ($p=0,000015$) PARA PORCENTAGEM DE FOSFATO ENTRE AS ESTAÇÕES DAS BAÍAS DE LARANJEIRAS E PARANAGUÁ PELO TESTE-t.....	37
FIGURA 9	DIFERENÇA NÃO SIGNIFICATIVA PARA PORCENTAGEM DE NITRATO ENTRE AS ESTAÇÕES DAS BAÍAS DAS LARANJEIRAS E PARANAGUÁ PELO TESTE-t.....	38
FIGURA 10	DIFERENÇA NÃO SIGNIFICATIVA DO pH ENTRE AS ESTAÇÕES DAS BAÍAS DAS LARANJEIRAS E PARANAGUÁ PELO TESTE-t.....	39
FIGURA 11	DIFERENÇA SIGNIFICATIVA PARA TEMPERATURA ENTRE AS ESTAÇÕES DAS BAÍAS DAS LARANJEIRAS E PARANAGUÁ PELO TESTE-t.....	40
FIGURA 12	DIFERENÇA NÃO SIGNIFICATIVA PARA SALINIDADE ENTRE AS ESTAÇÕES DAS BAÍAS DAS LARANJEIRAS E PARANAGUÁ PELO TESTE-t.....	41
FIGURA 13	CROMATOGRAMAS DA FRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS DE DUAS AMOSTRAS COLETADAS NA BAÍA DAS LARANJEIRAS.....	43

FIGURA 14	CROMATOGRAMAS DA FRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS DE DUAS AMOSTRAS COLETADAS NA BAÍA DAS PARANAGUÁ.....	44
FIGURA 15	DIFERENÇA NÃO SIGNIFICATIVA DE PROCARIOTOS HETEROTRÓFICOS TOTAIS ENTRE SEDIMENTOS DA BAÍA DAS LARANJEIRAS E DE PARANAGUÁ PELO TESTE-t.....	45
FIGURA 16	DIFERENÇA NÃO SIGNIFICATIVA DE BIOMASSA PROCARIÓTICA ENTRE SEDIMENTOS DAS BAÍAS DAS LARANJEIRAS E DE PARANAGUÁ PELO TESTE-t.....	46
FIGURA 17	A DIFERENÇA SIGNIFICATIVA DE COLIFORMES TOTAIS ENTRE SEDIMENTOS DAS BAÍAS DAS LARANJEIRAS E DE PARANAGUÁ PELO TESTE-t.....	47
FIGURA 18	DIFERENÇA SIGNIFICATIVA DE <i>Escherichia coli</i> ENTRE SEDIMENTOS DAS BAÍAS DAS LARANJEIRAS E DE PARANAGUÁ PELO TESTE-t.....	48
FIGURA 19	EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL.....	49
FIGURA 20	EXEMPLO DE PRODUTO DE PCR OBTIDO.....	51
FIGURA 21	ARDRA – <i>BACTERIA</i>	52
FIGURA 22	ARDRA – <i>ARCHAEA</i>	53
FIGURA 23	PORCENTAGENS RELATIVAS AOS NÍVEIS TAXONÔMICOS FILO E CLASSE PARA A BAÍA DAS LARANJEIRAS (DOMÍNIO <i>BACTERIA</i>).....	55
FIGURA 24	PORCENTAGENS RELATIVAS AOS NÍVEIS TAXONÔMICOS FILO E CLASSE (DOMÍNIO <i>ARCHAEA</i>) PARA BAÍA DAS LARANJEIRAS E BAÍA DE PARANAGUÁ.....	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	DIVERSIDADE E ABUNDÂNCIA PROCARIÓTICA EM DIFERENTES AMBIENTES.....	5
TABELA 2	CULTURABILIDADE ESTIMADA EM COMPARAÇÃO COM À CONTAGEM TOTAL DE CÉLULAS EM DIVERSOS AMBIENTES.....	12
TABELA 3	INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES 16S rRNA.....	27
TABELA 4	ESTIRPE E PLASMÍDEO UTILIZADOS PARA LIGAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO.....	30
TABELA 5	RESULTADO DOS VALORES DE CARBONATO DE CÁLCIO E MATÉRIA ORGÂNICA, EXPRESSOS EM PORCENTAGEM.....	35
TABELA 6	RESULTADO DAS ANÁLISES PARA PORCENTAGEM DE CASCALHO, AREIA, SILTE E ARGILA.....	36
TABELA 7	VALORES DE FOSFATO E NITRATO EXPRESSOS EM PORCENTAGEM.....	38
TABELA 8	ÍNDICES DE DIAGNÓSTICO AMBIENTAL E NÍVEIS DE HIDROCARBONETOS.....	42
TABELA 9	QUANTIDADE DE DNA OBTIDA E SUA PUREZA.....	50

ABREVIATURAS

16S rRNA – *16S ribosomal Ribonucleic Acid*

ARDRA – *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*

BSA – *Bovine Serum Albumine*

CEP – Complexo Estuarino de Paranaguá

pb – pares de bases

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*

D. O. – Densidade Óptica

GPS – *Global Positioning System*

kb – kilo base

KoAc – Acetato de potássio

MO – Matéria Orgânica

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NMP – Número Mais Provável

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

RDP II – *Ribosomal Database Project II*

rpm – rotações por minuto

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate*

TAR – *terrestrial/aquatic ratio*

UCM – *Unresolved Complex Mixture*

PAHs – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

RESUMO

Os manguezais criam um ambiente ecológico único que abriga ricas assembléias de espécies, protegem e estabilizam linhas de costa, auxiliam na manutenção da qualidade da água, e dão suporte à pesca costeira. A destruição de habitats através de atividades antrópicas tem sido a causa primária da perda destes ecossistemas. As comunidades procarióticas presentes nos mesmos são pobremente caracterizadas, refletindo, em sua maioria, estudos baseados na contagem de micro-organismos sem identificação ou na identificação de organismos cultiváveis. As técnicas moleculares surgem como uma poderosa ferramenta para avaliação do impacto de atividades antrópicas na diversidade procariótica de manguezais, assim como de sua potencial modificação das funções ecológicas desempenhadas por estes ecossistemas únicos. O presente trabalho representa a primeira descrição da diversidade procariótica em manguezais do Estado do Paraná, utilizando-se técnicas moleculares. Amostras de sedimento foram coletadas em duas regiões distintas com diferentes níveis de contaminação (Baía de Paranaguá e Baía das Laranjeiras) do Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP). O DNA total dessas amostras foi extraído e usado como molde em reações de PCR com iniciadores universais para o gene 16S rRNA dos Domínios *Bacteria* e *Archaea*. Comparações das comunidades procarióticas foram feitas através de ARDRA e Sequenciamento. Foram realizadas análises de parâmetros ambientais bióticos e abióticos, sendo observadas diferenças significativas entre as regiões para os parâmetros carbonato de cálcio, matéria orgânica, fosfato, temperatura, coliformes totais e *Escherichia coli*, assim como diferenças nos níveis de contaminação por hidrocarbonetos. Através da técnica ARDRA não foram identificadas diferenças significativas nas comunidades arqueanas e bacterianas, sejam dentro de cada área ou entre as áreas amostradas. As influências antrópicas verificadas na Baía de Paranaguá parecem não ser suficientes para gerar distúrbios na diversidade da comunidade procariótica detectáveis pela resolução da técnica em questão. Comparações das sequências com o banco de dados do RDP dos clones de *Archaea* indicaram na Baía das Laranjeiras 48,3% de organismos pertencentes ao Filo Crenarchaeota e 51,7% ao Filo Euryarchaeota. Para o Domínio *Bacteria*, 61,1% foram representativas do Filo Cyanobacteria, sendo que destas 90,9% foram da Família Bacillariophyta. Outros Filos encontrados foram Proteobacteria, Bacteroidetes e Acidobacteria. Na comparação das sequências com o banco de dados do NCBI, na Baía das Laranjeiras, 83,3% pertencentes ao Domínio *Bacteria* e 93,1% de *Archaea*, estão relacionadas com sequências de organismos encontrados em regiões costeiras e oceânicas. A porcentagem de identidade flutuou entre 83% e 100% para *Bacteria* e entre 87% e 100% para *Archaea*. O presente trabalho indica que as técnicas moleculares são particularmente úteis na busca pelo conhecimento da estrutura das comunidades procarióticas e suas inter-relações com o ambiente.

Palavras-chave: diversidade procariótica; manguezais; *Bacteria*; *Archaea*; 16S rRNA.

ABSTRACT

Mangroves comprise a unique environment that is home to rich assemblages of species, protect and stabilize coastlines, maintain water quality, and support coastal fisheries. The destruction of habitats by human activities has been the primary cause of loss of these ecosystems. Prokaryotic communities present in mangroves are poorly characterized. For many decades, this characterization was made by studies based on the count of microorganisms without identification or on the identification of cultivable organisms. Molecular techniques has emerged as a powerful tool for assessing the impact of human activities on the prokaryotic diversity of mangroves, as well as their potential modification of the ecological functions performed by these unique ecosystems. This work represents the first description of prokaryotic diversity in mangroves of the State of Paraná, using molecular techniques. Sediment samples were collected in two distinct regions with different levels of contamination (Paranaguá Bay and Laranjeiras Bay) of the Estuarine Complex of Paranaguá (CEP). The total DNA in these samples were extracted and used as template in PCR, performed with universal primers for the 16S rRNA gene of the Domains *Bacteria* and *Archaea*. Comparisons of prokaryotic communities were made by ARDRA and sequencing. Analyses of environmental biotic and abiotic parameters were performed. Significant differences were observed between regions for the parameters: calcium carbonate, organic matter, phosphate, temperature, total coliforms and *Escherichia coli*, as well as differences in the levels of hydrocarbon contamination. No significant differences were found in the Achaean and bacterial communities by the ARDRA technique, within each area or between sampling sites. Anthropogenic influences found in Paranaguá Bay seem to be insufficient to generate disturbances in prokaryotic community detectable by resolution of this technique. Comparisons of the sequences with the RDP database of the *Archaea* clones indicated that Laranjeiras Bay harbored 48.3% of organisms belonging to Phylum Crenarchaeota and 51.7% to Phylum Euryarchaeota. For the Domain *Bacteria*, 61.1% of the sequences were identified as related to the Phylum Cyanobacteria, and of these 90.9% were related to the Family Bacillariophyta. There were also sequences related to the Phyla Proteobacteria, Bacteroidetes and Acidobacteria. Comparison with the database of NCBI showed that in the Laranjeiras Bay, 83.3% of the sequences belonging to the domain *Bacteria* and 93.1% of *Archaea* are related to sequences of organisms found in coastal and ocean regions. The identity percentage oscillated between 83% and 100% for *Bacteria* and between 87% and 100% for *Archaea*. This study indicates that molecular techniques are particularly useful in the study of the structure of prokaryotic communities and their interrelationships with the environment.

Keywords: prokaryotic diversity, mangrove, *Bacteria*, *Archaea*, 16S rRNA.

1 INTRODUÇÃO

Os manguezais possuem alto valor ecológico para a manutenção da qualidade da água, da biodiversidade marinha, assim como na exportação de matéria orgânica e nutrientes para ambientes adjacentes. As regiões costeiras bordejadas por manguezais vêm sofrendo uma grande pressão ambiental, principalmente em áreas estuarinas que apresentam atividades industriais, portuárias e forte urbanização. As comunidades procarióticas presentes nestes locais são pobremente caracterizadas, refletindo, em sua maioria, estudos baseados na contagem de micro-organismos ou na identificação de organismos cultiváveis. As técnicas moleculares surgem assim, no âmbito da microbiologia marinha, como uma poderosa ferramenta para a determinação da biodiversidade existente em manguezais, e para a avaliação do impacto de atividades antrópicas na diversidade microbiana dos mesmos, assim como de sua potencial modificação das funções ecológicas desempenhadas por estes ecossistemas únicos. O estudo da diversidade genética de micro-organismos constitui uma nova fronteira científica, capaz de produzir *insights* sobre a evolução, a regulação de processos globais, e a descoberta de novos genes de interesse biotecnológico.

No Brasil, entre os trabalhos que visam o estudo da diversidade de procariotos e os impactos provocados na estrutura procariótica por atividades antrópicas em manguezais podem ser destacados os de Piza *et al.*, (2004) sobre a diversidade bacteriana do estuário de Santos-São Vicente (SP), Gomes *et al.*, (2008), sobre a diversidade da comunidade bacteriana em sedimentos de manguezais da Baía de Guanabara (RJ) e Cury (2002), sobre diversidade genética e metabólica da comunidade procariótica em manguezais de São Paulo. O presente trabalho representa a primeira descrição e avaliação do impacto antrópico, na diversidade procariótica em manguezais do Estado do Paraná, através de técnicas moleculares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MANGUEZAIS

Os ecossistemas de manguezal são compostos por plantas que crescem na interface entre os continentes e os oceanos, em latitudes tropicais e subtropicais. Estes ambientes apresentam condições variáveis de salinidade, marés e temperaturas, assim como sedimentos anaeróbicos e lamosos. As árvores destes ecossistemas são providas de adaptações morfológicas e fisiológicas para suportar condições extremas (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001). Os manguezais criam um ambiente ecológico único que abriga ricas assembléias de espécies. Possuem um poderoso valor ecológico, seja protegendo e estabilizando linhas de costa, auxiliando na manutenção da qualidade da água, enriquecendo águas costeiras, fornecendo produtos comerciais ou dando suporte à pesca costeira através da sua função de berçário para variadas espécies (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001; KRUG *et al.*, 2007). Entre a grande variedade biótica encontrada nestes ambientes, pode-se destacar a presença e a importância das bactérias, arqueias e outros microorganismos para seu funcionamento e estruturação.

Segundo Krug *et al.*, (2007), entre os fatores naturais passíveis de causar alterações ecológicas em regiões de manguezais figuram a topografia, a hidrografia e o clima, atuando em diferenciações na salinidade e no regime de ondas, e fatores biológicos, como a presença de bioturbadores. A destruição de habitats através da intervenção humana tem sido a causa primária da perda de manguezais. Pressões ambientais como o desvio da água doce para irrigação, a especulação imobiliária, o uso destas regiões para aquicultura, a descarga de efluentes domésticos, industriais e resíduos sólidos, assim como a superexploração dos recursos naturais oriundos dos manguezais vêm destruindo extensivas áreas dos mesmos. Alguns estudos estimam a taxa de perda global em um milhão de hectares por ano, sendo que algumas regiões correm perigo de colapso total (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001).

A poluição nos ecossistemas de manguezal pode se apresentar de forma visível ou não. Por exemplo, a presença de óleo em uma área de manguezal, seja por impacto crônico ou agudo, pode ter efeitos visíveis, como manchas e desfoliação, podendo, porém, residir de forma menos aparente. Os sedimentos, por exemplo, podem conter uma contaminação significativa por hidrocarbonetos, muito tempo após um derrame, mesmo quando não há evidências de contaminação nas árvores e na água de entorno (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001; CURY, 2002).

As principais mudanças ocasionadas no Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP), e assim sendo, também nos manguezais da região, se deram principalmente nas últimas décadas. O CEP é dividido em duas seções, com atividades econômicas bem características. São dois eixos principais, localizando-se um na direção leste-oeste, onde estão situadas as baías de Paranaguá e Antonina, com extensa atividade antrópica (principalmente devido aos portos e cidades homônimas) e outro na direção norte-sul, onde estão localizadas as baías das Laranjeiras, Guaraqueçaba e Pinheiros, protegidas por várias unidades de conservação. Entre as atividades econômicas exercidas na região menos impactada podem ser listadas a pesca artesanal, agricultura de subsistência, caça e exploração florestal. Na área com maior antropização, contaminações devido às atividades industriais, aliadas à descarga de efluentes domésticos abundantes e à poluição por hidrocarbonetos devido à proximidade com o Porto de Paranaguá, tornam os manguezais próximos extremamente suscetíveis a mudanças ambientais. Até o momento, não se tem conhecimento sobre estudos que visem à avaliação do efeito do aporte de poluentes para a diversidade da comunidade procariótica residente nos manguezais paranaenses.

2.2 PROCARIOTOS PRESENTES EM MANGUEZAIS

2.2.1 Diversidade

Um dos aspectos ecológicos mais impressionantes dos micro-organismos é a sua ubiquidade. Organismos procarióticos habitam desde ambientes com condições ideais para a maioria das formas de vida do planeta, até locais extremamente salinos, quentes e ácidos (HORNBERGER *et al.*, 2004). Além da característica única de aproveitarem uma diversidade fantástica de nichos, os micro-organismos apresentam também uma abundância elevada, sendo considerados os organismos mais abundantes e diversos da Terra. Possivelmente, as maiores proporções de células bacterianas residem na sub-superfície oceânica e terrestre (WHITMAN *et al.*, 1998).

Ambientalmente, a densidade e a estrutura das comunidades microbianas marinhas estão relacionadas, basicamente, a fatores como turbulência, luz, temperatura, nutrientes, salinidade, pH, radiação solar, presença de macro-organismos, estrutura do solo, etc. Quase todo parâmetro ecofisiológico parece ter um impacto na diversidade das comunidades microbianas presentes em ambientes costeiros e oceânicos (HUNTER-CEVERA *et al.*, 2005).

Solos e sedimentos parecem constituir um dos maiores reservatórios de diversidade genética procariótica (TABELA 1), sendo considerados ambientes extremamente complexos. Esta complexidade é resultante da interação de diversos fatores, tais como pH, textura e estrutura do solo, umidade, variações climáticas e atividades bióticas (ROBE *et al.*, 2003).

TABELA 1 - DIVERSIDADE E ABUNDÂNCIA PROCARIÓTICA EM DIFERENTES HABITATS.

Habitat	Abundância (cel.cm ⁻³)	Diversidade*
Solo de floresta	4,8x10 ⁹	6000
Solo de floresta (isolados cultivados)	1,4x10 ⁷	35
Solo de pastoreio	1,8x10 ¹⁰	3500-8800
Solo arável	2,1x10 ¹⁰	140-350
Sedimento marinho prístino	3,1x10 ⁹	11400
Sedimento de cultivo de peixe	7,7x10 ⁹	50
Salina	6,0x10 ⁷	7

FONTE: Adaptada a partir de HORNER-DEVINE *et al.* (2004)

* Equivalentes genômicos (70% de homologia entre sequências)

A microbiota associada ao sedimento é essencial na ciclagem eficiente de nutrientes, no “*turn over*” da matéria orgânica e na manutenção da estrutura física do solo, processos estes determinantes para a produção primária e para o estoque de carbono em cada ecossistema (BRADFORD *et al.*, 2002). A diversidade microbiana presente em ambientes terrestres e oceânicos está longe de ser vislumbrada, sendo por vezes considerada “incontável” (HUGHES *et al.*, 2001). Regiões costeiras, que apresentam influência tanto de processos continentais quanto oceânicos podem, potencialmente, representar grandes depósitos de uma biodiversidade ainda desconhecida, podendo servir como bases comparativas para o estudo do efeito de mudanças antropogênicas em sistemas naturais e suas implicações na estrutura funcional dos ecossistemas. As características únicas presentes nestes ambientes fazem dos manguezais áreas excepcionais para estudos experimentais sobre biodiversidade e funcionamento de ecossistemas, fornecendo um ambiente ecológico singular para uma grande diversidade de comunidades bacterianas.

A biodiversidade microbiana presente em solos e sedimentos é, geralmente, determinada através de caracterização fenotípica. Porém, este tipo de abordagem só é possível para bactérias que possam ser isoladas e mantidas em cultura. Entretanto, a grande maioria (99,5% a 99,9%) das bactérias presentes no solo, observadas através de microscopia de epifluorescência, não pode ser isolada e cultivada (TORSVIK *et al.*, 1990). Sendo assim, o conhecimento da diversidade bacteriana do solo estudado, quando utilizados métodos tradicionais de cultura e identificação, encontra-se bastante aquém do valor real do ambiente (BARNS *et al.*, 1994).

Segundo Liang *et al.* (2007), embora muitos estudos realizados no final do séc. XX e início do séc. XXI tenham, coletivamente, promovido uma maior compreensão da composição filogenética da comunidade procariótica em sedimentos costeiros, investigações com este enfoque, realizadas em ecossistemas de manguezais, são extremamente escassas. Segundo Cury (2002), pesquisas que visem à aquisição de conhecimento sobre a atividade e a diversidade de *Bacteria* e *Archaea* em sedimentos de manguezais brasileiros são insuficientes, a despeito de sua potencial utilização na avaliação de impactos antropogênicos, contribuindo para a geração de índices de qualidade biológica de sedimentos, assim como para uma melhor compreensão destes ecossistemas únicos e suas respostas à pressões humanas.

Dentre os trabalhos sobre a diversidade procariótica em manguezais brasileiros podem ser destacados os de Brito *et al.* (2006), com o estudo de comunidades bacterianas hidrocarbonoclásticas e Gomes *et al.* (2008), com o estudo de comunidades bacterianas em sedimentos de manguezais próximos a áreas urbanas, ambos no Rio de Janeiro. No estuário Santos-São Vicente podem ser citados os trabalhos de Piza *et al.* (2004), em pesquisa sobre diversidade bacteriana e Saia *et al.* (2009), com o estudo de arqueias metanogênicas em sedimentos poluídos. Ainda no estado de São Paulo, pode ser citado o trabalho de Cury (2002) com o estudo de comunidades de *Bacteria* e *Archaea* em sedimentos de mangue contaminados por petróleo e Cury (2006), sobre a diversidade procariótica no complexo estuarino de Cananéia-Iguape.

2.2.2 Funções ecológicas

Os micro-organismos são essenciais nos ecossistemas de manguezal, principalmente no controle do ambiente químico dos mesmos. Como exemplo, as bactérias redutoras de sulfato controlam amplamente a dinâmica do ferro, do fósforo e do enxofre nestes ambientes, contribuindo para a formação de padrões de solo e vegetação (SHERMAN *et al.*, 1998 *apud* KATHIRESAN; BINGHAM, 2001). Sendo

assim, a análise da diversidade de micro-organismos promove uma melhor compreensão da estrutura microbiana de habitats específicos (BHARATHKUMAR *et al.*, 2007; LIANG *et al.*, 2007).

Microorganismos desenvolvem uma vasta gama de atividades nos manguezais, como fotossíntese, fixação de nitrogênio, metanogênese, produção de antibióticos e enzimas (DAS *et al.*, 2006), entre outras. Evidências indicam uma íntima relação micro-organismos-nutrientes-plantas, que atuaria como um mecanismo de reciclagem e conservação dos nutrientes no ecossistema de manguezal. As comunidades microbianas altamente diversas e produtivas presentes nos ecossistemas de manguezal tropicais e subtropicais continuamente transformam a matéria orgânica presente nos mesmos em fontes de nitrogênio, fósforo e outros nutrientes utilizados por plantas (HOLGUIN, *et al.*, 2001). Em estuários, uma grande parte do carbono fixado pela fotossíntese é provavelmente depositada nos sedimentos e mineralizada anaerobicamente por bactérias. A energia derivada destes processos dá suporte ao crescimento bacteriano que, por sua vez, disponibiliza produtos que vêm a suprir energia para invertebrados e peixes através teia alimentar detritívora.

Segundo Holguin *et al.* (2001), os micro-organismos são responsáveis pela maior parte do fluxo de carbono nos sedimentos de manguezais tropicais. Através do consumo de carbono orgânico dissolvido presente nas águas intersticiais, as populações bacterianas dos sedimentos de manguezais ajudam na manutenção desta forma de carbono e previnem contra a exportação do mesmo para ecossistemas adjacentes.

A interferência em sedimentos tropicais geralmente causa mudanças na composição e nos ciclos de crescimento da microbiota, levando à perda de nutrientes, e possível liberação de subprodutos tóxicos do metabolismo microbiano, como a liberação de ácido sulfúrico através da oxidação da pirita (FeS_2). Outros distúrbios comuns, como descarga de efluentes, derramamento de óleo, etc, podem levar à mudanças no sistema aeróbico-anaeróbico de decomposição para um sistema completamente anaeróbico, sendo este menos eficiente e mais lento na reciclagem de nutrientes, resultando no acúmulo e na liberação de sulfetos tóxicos (HOLGUIN, *et al.*, 2001).

Nos sedimentos de manguezais, a disponibilidade do ferro e do fósforo pode ser dependente da atividade das bactérias redutoras de sulfato. Sob condições anaeróbicas, o fosfato dissolvido reage com o oxihidróxido de ferro, criando um complexo insolúvel FeOOH-PO_4 (HOLGUIN, *et al.*, 2001). As bactérias redutoras do sulfato, sendo as principais decompositoras da matéria orgânica em sedimentos anaeróbicos, parecem exercer o papel majoritário na mineralização do enxofre orgânico e na produção de ferro e fósforo solúvel usado pelos organismos nos ecossistemas de manguezal. As bactérias redutoras de sulfato podem também contribuir para os ecossistemas através da fixação de N_2 (HOLGUIN, *et al.*, 2001).

Os micro-organismos marinhos são considerados os maiores pilares da vida do planeta. A diversidade microbiana constitui o mais extraordinário reservatório de vida da biosfera (JAIN *et al.*, 2005). O metabolismo único destes organismos constitui a peça-chave de muitas etapas dos ciclos biogeoquímicos, sendo estes indubitavelmente incompletos sem a função ecológica microbiana. Muitas pesquisas com enfoque na biogeografia de micro-organismos marinhos têm sido realizadas, porém a complexidade inerente aos processos, metabolismo e fisiologia destes organismos é tão vasta e pouco compreendida, que os esforços para elucidá-la mostram-se insuficientes (HUNTER-CEVERA *et al.*, 2005). A riqueza metabólica dos micro-organismos tem sido tradicionalmente explorada pelos seres humanos em processos como a fermentação, produção de antibióticos, vitaminas, entre outros. Mais recentemente, estes recursos bióticos têm recebido um novo foco de atenção, sendo utilizados para aplicações inovadoras, como na bioprodução de compostos, no monitoramento de níveis de poluição e na bioremediação ambiental. Segundo Albagli (1998), a biodiversidade apresenta um duplo significado: como elemento essencial de suporte à vida e como reserva de valor futuro. Para os avanços biotecnológicos a diversidade biológica e genética é matéria-prima básica para os avanços que se observam nessa área, sendo como consequência transformada de recurso natural em recurso informacional. Para valorar e preservar, é preciso conhecer. A conservação da diversidade biológica requer uma vasta compreensão sobre a distribuição das espécies e sobre seu balanço ecológico no ambiente.

Partindo-se do fato de que os micro-organismos constituem a vasta maioria da biomassa marinha, que são os responsáveis primordiais pela biosfera do globo, e

que regulam processos fundamentais de ciclagem de elementos, é de vital importância a busca pelo conhecimento sobre estas formas de vida, seus processos e interações, como forma de proteção da estrutura ambiental dos ecossistemas costeiros, seus recursos e serviços prestados. Segundo Jain *et al.* (2005), apesar do conhecimento já adquirido sobre o valor ambiental dos micro-organismos marinhos, a compreensão de sua diversidade e de muitos dos papéis-chave na sustentação da vida é ainda escassa.

2.3 FILOGENIA DE PROCARIOTOS

A diversidade procariótica não pode ser contada e catalogada utilizando-se os conceitos adotados para organismos eucariotos, sendo que dos 22 conceitos de espécie estabelecidos para eucariotos, nenhum pode ser aplicado para procariotos. Isto se deve ao fato de que organismos procariotos não apresentam características morfológicas para diagnóstico, proliferam assexuadamente e trocam informações genéticas de maneiras distintas às utilizadas por organismos mais complexos. Além disso, as propriedades metabólicas e fisiológicas dos procariotos são pobremente conhecidas, não permitindo assim uma definição acurada de características fenotípicas requeridas para a descrição de uma espécie (SMITH, 2006).

Segundo Sapp (2006), o conceito de “bactéria” permaneceu sem definição até a publicação, em 1962, do artigo “*The concept of a bacterium*” por Roger Y. Stanier e Cornelis B. van Niel. A dicotomia procariotos-eucariotos era então tida como principal distinção taxonômica e organizacional, com a presença de dois grandes super-reinos: *Prokaryotae* e *Eukaryotae*. No começo da década de 1970, Carl Woese focou seu trabalho na comparação de oligonucleotídeos do 16S RNA ribossômico. Woese e Fox declararam, em 1977, com o artigo “*Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms*”, a descoberta de uma nova forma de vida, a arqueobactéria, desafiando o paradigma de classificação procariotos-eucariotos (WOESE; FOX, 1977). Para enfatizar que procariotos não compartilhavam um ancestral comum, assim como contrariar a noção de que

arqueobactérias nada mais eram do que bactérias, Woese e colaboradores, em 1990, publicaram um artigo rebatizando este grupo como “Archaea”, fazendo assim uma proposta taxonômica formal de três domínios da vida: *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* (WOESE *et al.*, 1990; ALLERS; MEVARECH, 2008) (FIGURA 1).

De acordo com Vetriani *et al.*, (1998), dos três maiores Domínios evolucionários da vida na Terra, o *Archaea* é o menos compreendido em termos de diversidade, fisiologia, genética e ecologia. Estudos recentes indicam que a presença de arqueias não é exclusiva de ambientes com condições extremas, com altas temperaturas e níveis de salinidade e baixos níveis de pH. Com efeito, dados computados em bancos como o GenBank mostram que estes organismos estão presentes em quase todos os ambientes amostrados (ROBERTSON *et al.*, 2005). As arqueias correspondem a uma importante fração das populações microbianas de ecossistemas terrestres e marinhos, indicando um potencial impacto deste grupo nos ciclos de energia globais (SCHLEPER *et al.*, 2005).

Segundo DeLong (2003), arqueias bem conhecidas e cultivadas geralmente caem em agrupamentos majoritários que incluem halófilas, metanogênicas, termófilas extremas e termoacidófilas. O autor acima citado descreve ainda que um dos grandes grupos de arqueias, o das metanogênicas estritamente anaeróbicas, produz a maior parte do metano presente na atmosfera terrestre, e é um dos grupos considerados cosmopolitas. Porém, apesar da rápida expansão de dados disponíveis sobre arqueias cultiváveis, uma fração muito pequena da diversidade destes organismos está presente em coleções de cultivo. De acordo com Schleper *et al.* (2005), o fato de que a maior parte das arqueias não apresenta, atualmente, possibilidade de cultivo, têm como consequência a falta de informações sobre o metabolismo específico destes organismos. Assim o avanço recente dos estudos genômicos ambientais surge como uma ferramenta no estudo das populações de arqueias e sua função nos ecossistemas.

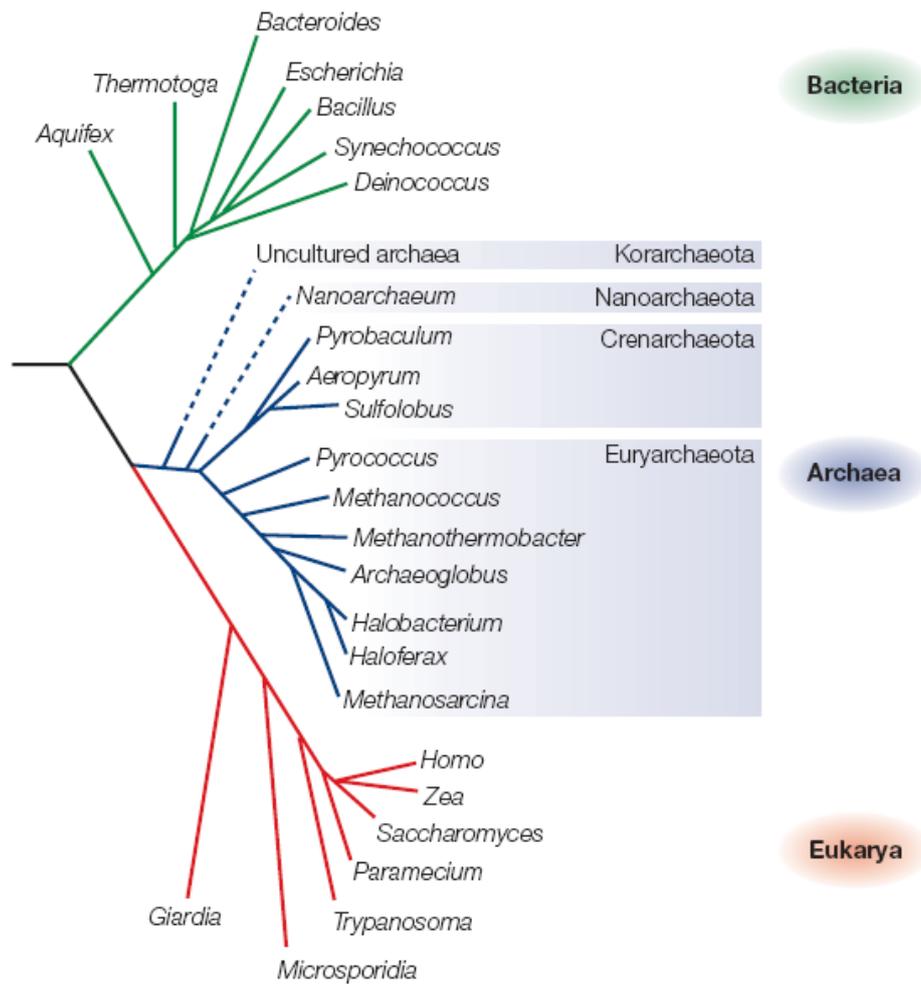


FIGURA 1 - ORGANIZAÇÃO DA TAXONOMIA EM TRÊS DOMÍNIOS. REPRODUZIDO A PARTIR DE ALLERS E MÉVARECH (2008).

O conhecimento da diversidade genética esteve, durante muitas décadas, baseado no estudo de micro-organismos cultiváveis, pouco representativos da comunidade total residente em determinado ambiente (TABELA 2). O método de extração e amplificação de genes via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) mudou drasticamente esta situação, revolucionando as pesquisas voltadas para a diversidade genética e permitindo a análise de grande parte dos micro-organismos não cultiváveis (AMANN *et al.*, 1995). A genômica ambiental microbiana é um campo em rápida expansão, que se utiliza de culturas puras e assembléias microbianas mistas naturais na investigação da diversidade e função dos micro-organismos no ambiente. O alto montante de seqüenciamentos de DNA e RNA de micro-organismos coletados do ambiente permitiu a aplicação direta de muitos conceitos

sobre a ecologia microbiana e os mecanismos intrínsecos dos processos biogeoquímicos. Segundo DeLong *et al.* (2007), através de métodos de clonagem e sequenciamento do DNA microbiano isolado diretamente do ambiente, uma visão sem precedentes do mundo natural pôde ser obtida, principalmente em ecossistemas marinhos.

TABELA 2 - CULTURABILIDADE ESTIMADA COMO UMA PORCENTAGEM DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS (UNIDADES FORMADORES DE COLÔNIA) EM COMPARAÇÃO À CONTAGEM TOTAL DE CÉLULAS

Habitat	Culturabilidade (%)
Água do mar	0,001 – 0,1
Água doce	0,25
Lago mesotrófico	0,1-1
Águas estuarinas não poluídas	0,1-3
Lodo	1-15
Sedimentos	0,25
Solo	0,3

FONTE: Adaptada a partir de AMANN *et al.*, 1995.

O gene 16S rRNA é amplamente aceito como o principal cronômetro molecular devido ao fato de ser funcionalmente constante, mostrar uma estrutura em mosaico de regiões conservadas e com variações (FIGURA 2), ocorrer em todos os organismos procarióticos, e permitir fácil sequenciamento devido ao seu comprimento (COENYE; VANDAMME, 2003). Devido ao fato de que regiões de rRNA são conservadas por todos os domínios filogenéticos, extensões “universais” de sequências podem ser identificadas (HEAD *et al.*, 1998). De acordo com Ahmad *et al.* (2009), o uso de métodos moleculares para a investigação de microorganismos presentes em ambientes naturais tem revolucionado a visão da biodiversidade e ecologia microbiana nos últimos anos, sendo atualmente considerados um dos primeiros passos no estudo microbiológico dos ambientes de interesse.

Inúmeras técnicas vêm sendo utilizadas no estudo da diversidade procariótica. Entre estas podem ser destacadas a DDGE (Eletroforese em Gel do Gradiente de Desnaturação), o AFLP (Polimorfismo do Comprimento de Fragmento Amplificado) e o T-RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição Terminal) e a ARDRA (Análise de Restrição com DNA Ribossomal Amplificado)

como estratégias para análise da impressão da comunidade procariótica. Podem ser citadas ainda a clonagem e sequenciamento e o pirosequenciamento como métodos de identificação das espécies presentes em determinado ambiente. No presente trabalho, para obtenção da impressão estrutural das comunidades, foi selecionada a técnica ARDRA. Segundo Wang et al. (2008), os perfis de ARDRA são baseados na peculiaridade das sequências do DNA ribossomal das espécies quanto a presença/ausência e posição de sítios de clivagem para enzimas de restrição ao longo do gene 16S rRNA. Os diferentes perfis de restrição para o gene 16S rRNA são utilizados para analisar e comparar a estrutura das comunidades procarióticas.

A biblioteca metagenômica, por sua vez, consiste na coleção resultante de bactérias transformadas com plasmídeos recombinantes contendo DNA inserto referente ao gene 16S rRNA originário das amostras ambientais, obtido através dos procedimentos descritos abaixo. Esta coleção representa a diversidade genética presente nos ambientes de coleta.

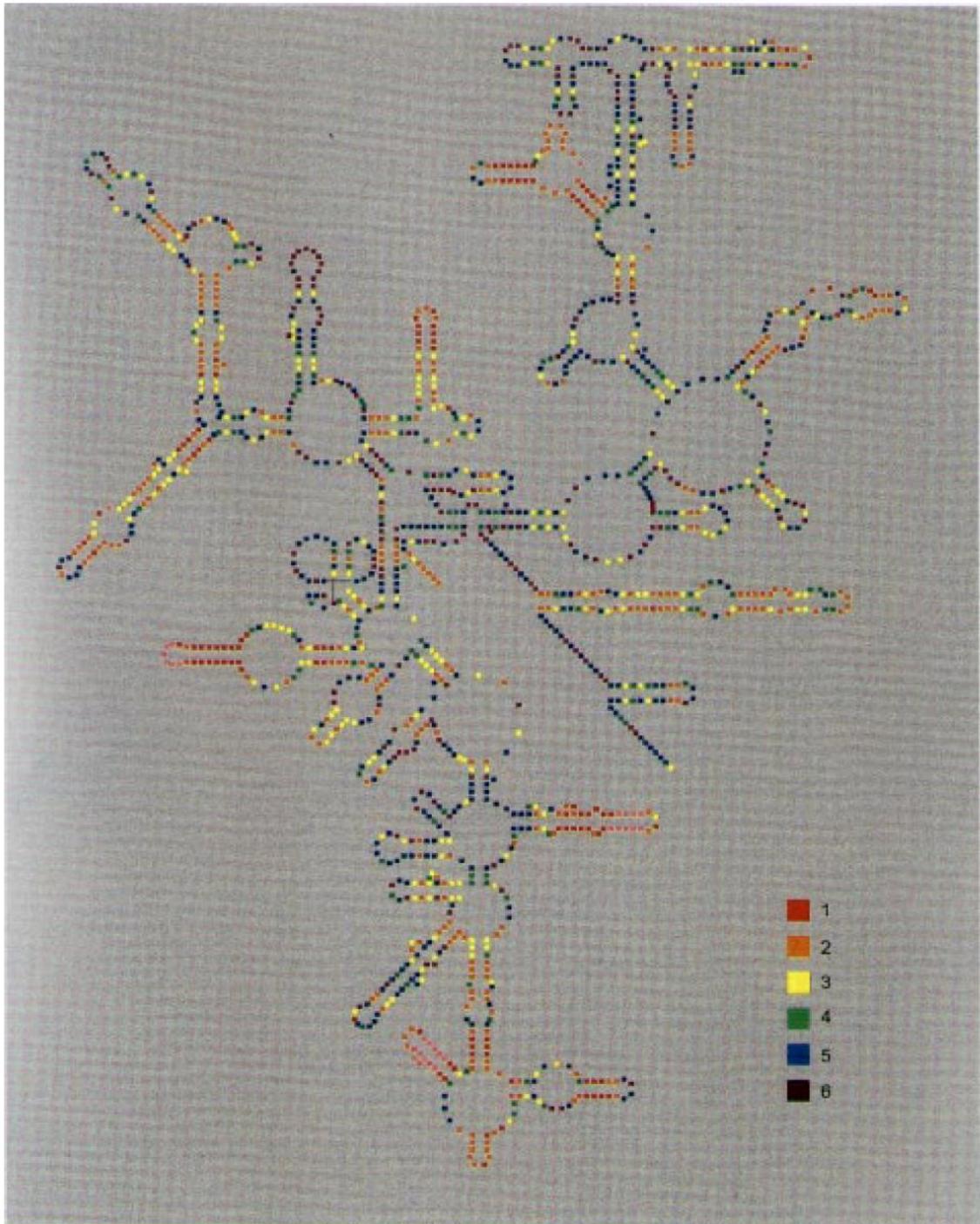


FIGURA 2 - MAPA DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DO 16S rRNA DE *E. coli*, MOSTRANDO A VARIABILIDADE/CONSERVAÇÃO NAS POSIÇÕES DE NUCLEOTÍDEOS. AS POSIÇÕES MAIS VARIÁVEIS SÃO MOSTRADAS EM VERMELHO, E AS MAIS CONSERVADAS EM AZUL. OS SÍTIOS QUE NÃO APRESENTAM NENHUMA VARIAÇÃO SÃO MOSTRADOS EM ROXO. MODELO REPRODUZIDO A PARTIR DE VAN der PEER *et al.* (1996).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar a diversidade de organismos pertencentes aos Domínios *Bacteria* e *Archaea* de amostras de sedimentos em dois pontos com distintos níveis de poluição por hidrocarbonetos, fósforo e efluentes domésticos, no Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP), Paraná, Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolamento do DNA de 10 amostras de sedimentos de manguezais do CEP, sendo 5 provenientes de manguezal potencialmente impactado e 5 amostras oriundas de ponto com menores índices de poluição;
- Amplificação dos genes do RNA ribossômico 16S de *Bacteria* e *Archaea*, através da utilização de oligonucleotídeos iniciadores universais;
- Comparação da estrutura das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* através de ARDRA (Análise de Restrição com DNA Ribossomal Amplificado);
- Construção e sequenciamento de bibliotecas de 16S rRNA visando a identificação dos principais grupos procarióticos.

4 ÁREA DE ESTUDO

O Brasil possui umas das maiores extensões de manguezais do mundo, abrangendo desde o Estado do Amapá até o Estado de Santa Catarina (KRUG *et al.*, 2007). A planície litorânea paranaense possui 105 Km de linha de costa, constituindo um dos menores litorais dos estados do Brasil (SANTOS, 2003). Entre as espécies arbóreas que constituem os manguezais paranaenses foram identificadas, por Bigarella (2001), as espécies *Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa* e *Avicennia schaueriana*, apresentando marcada heterogeneidade estrutural, formando tanto bosques mono como pluriespecíficos. A distribuição destas espécies é altamente variável e padrões de zonação são raramente distinguidos (LANA, 1998).

O Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP) é constituído por dois corpos d'água principais, as Baías de Paranaguá e Antonina na porção sul (eixo leste-oeste) e as Baías de Pinheiros, Laranjeiras e Guaraqueçaba na porção norte (eixo norte-sul) (FIGURA 3). Segundo Lana *et al.* (2001), o CEP é um complexo estuarino semi-fechado, localizado na planície costeira do Estado do Paraná (25°30'S, 48°25'W). O clima da área é classificado como subtropical úmido mesotérmico (Cfa), com precipitação média anual de 2500 mm e umidade do ar em torno de 85%. As marés são semidiurnas com desigualdades diurnas e apresentam uma amplitude média de 2,2 metros (MARONE; JAMIYANAA, 1997).

A região da Baía de Laranjeiras (eixo norte-sul) é considerada bem preservada, com extensas áreas de Mata Atlântica e manguezais, tendo como principais atividades econômicas a pesca e o turismo sazonal. O eixo leste-oeste, por sua vez, abriga os dois portos de maior atividade do estado, as cidades de Paranaguá e Antonina, assim como atividades industriais.

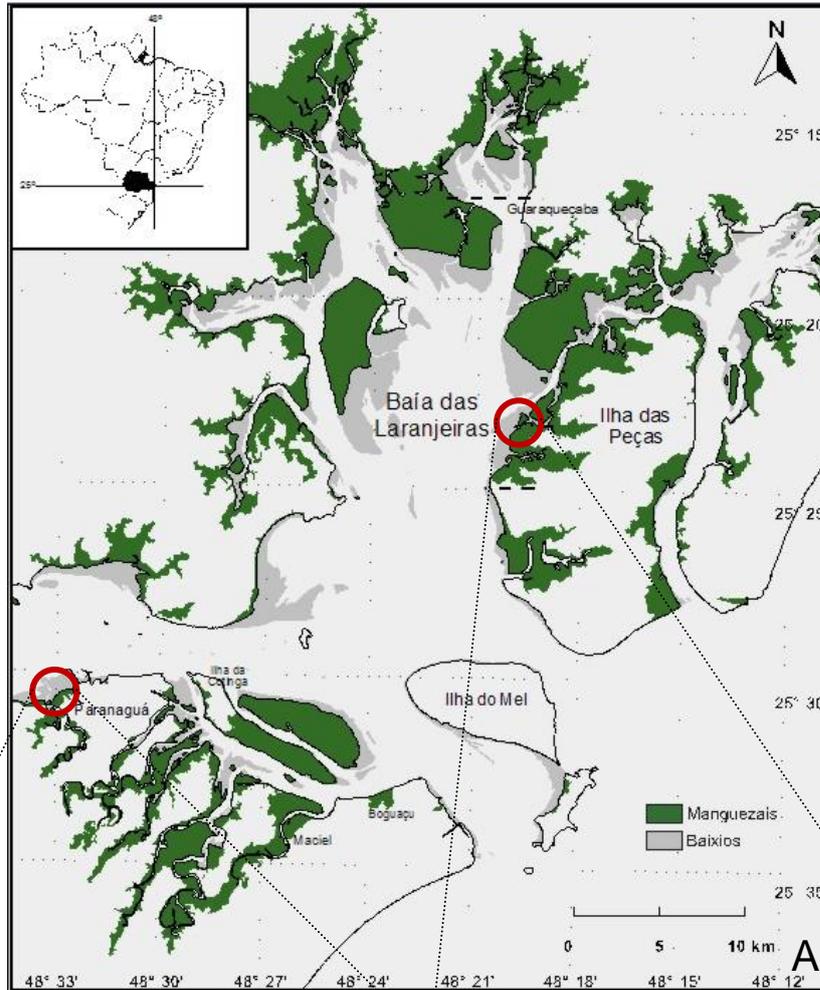


FIGURA 3 – A) MAPA DO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, COM DESTAQUE DOS PONTOS DE AMOSTRAGENS; B) IMAGEM DE SATÉLITE DO LOCAL DE AMOSTRAGEM EM PARANAGUA; C) IMAGEM DE SATÉLITE DO LOCAL DE AMOSTRAGEM EM LARANJEIRAS: DIFERENÇAS NO NÍVEL DE INFLUÊNCIA ANTRÓPICA (©2009Google GeoEye).

O Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP) é considerado um dos menos poluídos do sudeste do Brasil. Porém, alguns problemas ambientais vêm surgindo nas últimas décadas, principalmente devido às atividades exercidas no Porto de Paranaguá, o terceiro porto mais importante do País. A Baía de Paranaguá está constantemente exposta à degradação ambiental por derrames de óleo, resíduos de grãos, produtos químicos, além dos efeitos potencialmente deletérios ocasionados pelas dragagens efetuadas periodicamente nos canais de acesso ao Porto de Paranaguá. Outro problema que vem se agravando nos últimos anos é devido ao aporte de efluentes domésticos *in natura*, na baía, por meio de 4.163 ligações diretas (FUNPAR, 1997), além das ligações indiretas.

O CEP abriga várias unidades de conservação ambientais e federais, como a Área de Proteção Ambiental de Guaraqueçaba, a Estação Ecológica de Guaraqueçaba, o Parque Nacional do Superagüi, a Estação Ecológica Ilha do Mel, entre outras (NIMAD, 1994).

Estudos microbiológicos da região têm sido focados principalmente no ambiente aquático, como Kolm *et al.* (2002) que, amostrando um transecto leste-oeste ao longo do CEP, indicam uma maior concentração de poluição por *Escherichia coli* na região próxima ao Porto de Paranaguá.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 AMOSTRAGEM DE SEDIMENTOS NOS MANGUEZAIS DO CEP

As amostras de sedimento foram coletadas em duas regiões distintas do Complexo Estuarino de Paranaguá, com diferentes níveis de contaminação. Como “pouco impactado” foi considerado o manguezal na porção leste da Baía das Laranjeiras, conforme ilustrado na FIGURA 4 (a;b;c;d;e), e como “muito impactado” foi considerado o manguezal próximo ao píer da FOSPAR (FIGURA 5). Foram coletadas cinco amostras em cada área, com intuito de aumentar o poder das análises estatísticas e a representatividade dos parâmetros microbiológicos amostrados. Todas as amostras foram coletadas em regiões acima da linha de baixa-mar de quadratura, retirando-se, para as análises, a camada superior de sedimento, até 1 cm (FIGURAS 4 e 5), visando a coleta de uma porção do sedimento sujeita a mudanças ambientais recentes. Os pontos de coleta foram marcados com auxílio de GPS, sendo: Laranjeiras 25°22'40,9" S; 48°19'17,3" W e Paranaguá 25°22'41,1" S; 48°19'17,5" W. As coletas foram realizadas com material esterilizado, transferidas para tubos do tipo Falcon de 50 mL e acondicionadas em gelo para transporte até o laboratório. As amostras destinadas às análises de procariotos heterotróficos totais, biomassa procariótica, coliformes totais e *Escherichia coli* foram processadas imediatamente após a chegada no laboratório. As amostras destinadas às técnicas moleculares foram congeladas a -20°C e processadas em menos de 24 horas.



FIGURA 4 - COLETA DE SEDIMENTO NA BAÍA DE LARANJEIRAS, INDICANDO PONTOS AMOSTRAIS.



FIGURA 5 - COLETA DE SEDIMENTO NA BAÍA DE PARANAGUÁ. AS FOTOS DE CADA PONTO DE AMOSTRAGEM NÃO PUDERAM SER OBTIDAS POR RAZÕES LOGÍSTICAS.

5.2 ANÁLISE DE HIDROCARBONETOS

Para tratamento prévio as amostras foram liofilizadas e maceradas, e cerca de 20 g do sedimento seco foram extraídos em Soxlet com uma mistura de 50% em volume de n-hexano e diclorometano por 8 horas. A cada frasco de extração foram acondicionados cobre e uma solução de padrões surrogates contendo 0,5 µg de aromáticos deuterados. O extrato foi concentrado em um evaporador rotativo à vácuo, em banho-maria de 50°C, até 2 mL. Posteriormente, os extratos concentrados foram submetidos à cromatografia de adsorção em uma coluna contendo sílica, alumina e sulfato de sódio. Para a análise dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), a coluna foi eluída com 15 mL de uma mistura de 30% diclorometano em n-hexano, tendo como resultado a fração 2, composta por

PAHs. Para a análise no cromatógrafo, a fração foi concentrada, e foram injetados 1mL de extrato dessa amostra em cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa Agilent 5973N (GC-MS). Foi realizada então a análise no cromatógrafo.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE NITRATO E FOSFATO

As amostras foram filtradas em filtros Schleicher & Schuell GF 52C ($\Phi = 47$ mm). As amostras filtradas foram congeladas em frascos de polietileno até a análise dos nutrientes inorgânicos dissolvidos

As análises das concentrações de nitrato e fosfato foram realizadas através de métodos colorimétricos descritas por Grasshoff *et al.* (1999). As suas leituras foram realizadas em um espectrofotômetro UV-1601, SHIMADZU na faixa da luz visível. O nitrato foi reduzido a nitrito em uma coluna redutora contendo grãos de cádmio cobertos por cobre (CuSO_4). O nitrogênio e o fósforo totais foram determinados por meio da oxidação simultânea com persulfato de potássio, e medição colorimétrica (GRASSHOFF *et al.*, 1999). A estimativa dos teores de nitrogênio e fósforo orgânicos totais foi realizada por meio da subtração do nitrogênio e fósforo inorgânicos do nitrogênio e fósforo total, respectivamente.

5.4 TEOR DE MATÉRIA ORGÂNICA

Para determinação do conteúdo de matéria orgânica, amostras secas de sedimento foram queimadas à 550°C por 60 minutos, em forno mufla. Através da diferença de peso da amostra antes e depois da queima, foi obtido o teor de matéria orgânica

5.5 TEOR DE CARBONATO DE CÁLCIO

Os teores de carbonato de cálcio foram obtidos tratando-se aproximadamente 10 g da amostra com ácido clorídrico a 10% de concentração, até cessar a efervescência, lavando-se em seguida com água destilada quente e secando-a para pesagem.

5.6 ANÁLISES GRANULOMÉTRICAS

As amostras foram processadas por peneiramento em intervalos de 0,5 phi e pipetagem em intervalos de 1 phi segundo metodologia descrita por Suguio (1973). Os parâmetros estatísticos granulométricos, diâmetro médio e grau de seleção dos grãos de sedimento, foram obtidos com o programa SysGran, versão 3.0 (CAMARGO, 1999), pelo método de Folk e Ward (1957).

5.7 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO, SALINIDADE E TEMPERATURA

O pH da água intersticial foi medido logo após a chegada ao laboratório com peagâmetro ANALION. A salinidade com refratômetro QA Supplies, LLC modelo MT110ATC. A temperatura do sedimento superficial foi medida no próprio local de coleta com termômetro padrão de mercúrio.

5.8 SEPARAÇÃO DE PROCARIOTOS ADERIDOS AO SEDIMENTO PARA CONTAGEM DE PROCARIOTOS HETEROTRÓFICOS TOTAIS E CÁLCULO DA BIOMASSA PROCARIÓTICA

Foram medidos 15 cm³ de cada amostra, diluídos com 135 mL de água destilada (diluição de 1:10), agitados por 10 minutos em agitador de Erlenmeyers a 80 rpm e decantados por 15 minutos. Do sobrenadante foram retirados e formalizados aproximadamente 20 mL para a contagem de procariotos heterotróficos totais e cálculo da biomassa procariótica e 100 mL para a análise de coliformes totais e *Escherichia coli*.

5.9 QUANTIFICAÇÃO DE PROCARIOTOS HETEROTRÓFICOS TOTAIS E CÁLCULO DA BIOMASSA PROCARIÓTICA

De cada amostra foram diluídos 0,5 mL em 1,5 mL de água destilada, corados com 0,2 mL de laranja de acridina e após dois minutos filtrados através de filtros de membrana NUCLEOPORE (0,22 µm de poro) previamente escurecidos. A contagem de procariotos foi realizada por microscopia de epifluorescência (Microscópio NIKON, modelo Labophot), seguindo-se a metodologia descrita por Parsons *et al.* (1984). A quantificação da biomassa procariótica foi efetuada através do cálculo do biovolume dos procariotos a partir de figuras geométricas aproximadas seguindo metodologia descrita por Kolm *et al.* (2002), sendo o fator de conversão utilizado de 0.4 pgC.µm⁻³ (BJØRNSSEN; KUPARINEN, 1991).

5.10 QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E *Escherichia coli*

Para a quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli*, as amostras da Baía de Laranjeiras foram analisadas sem diluição e as da Baía de Paranaguá com uma diluição de 1:10, em água destilada. Para a análise utilizou-se um substrato cromogênico composto basicamente por sais, ortho-nitrofenil-β-d-galactopyranosídeo (ONPG), específico para o grupo de coliformes totais e 4-metil-umberifenil glucoronídeo (MUG) específico para *Escherichia coli*, conforme descritos no “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” (EATON; GREENBERG, 1995). Os produtos utilizados foram Colilert, da empresa Idexx Laboratories, Inc. As amostras, após sua inserção em cartelas com meio de cultura, foram seladas e submetidas à incubação por 18 a 22 horas a 36⁰C. A contagem das *E. coli* foi realizada sob luz ultravioleta (365nm) e dos coliformes totais sob iluminação natural. Para obtenção do número mais provável (NMP) de coliformes totais e *Escherichia coli* em 100 mL de água foi utilizada uma tabela fornecida pela própria empresa.

5.11 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DO SEDIMENTO

O método de extração direta por quebra *in situ* tem sido amplamente utilizado nas últimas décadas, sendo o método utilizado no presente trabalho, pois provê, geralmente, o maior rendimento de DNA dentro de um tempo aceitável de processamento (ROBE *et al.*, 2003). O processo de separação envolve, primeiramente, a ruptura da célula microbiana, levando à liberação dos ácidos nucléicos dos micro-organismos, teoricamente independentemente da sensibilidade da parede celular da célula à quebra, da localização da bactéria em microestruturas e da sua interação com as partículas do solo. Posteriormente os ácidos nucléicos são separados das partículas de sedimento.

A extração do DNA total do solo foi realizada em menos de 24 horas após a coleta, utilizando-se o kit “UltraClean Soil DNA Kit[®]” da MO BIO Laboratories, Inc., seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. Para tanto foi utilizado 1g de sedimento de cada amostra, e o restante armazenado em freezer a -80°C. O kit utilizado envolve métodos físicos (esferas para quebra das partículas de solo) e químicos (detergentes para dissolução do material hidrofóbico das membranas celulares) na extração do DNA das amostras ambientais. De acordo com Robe *et al.* (2003), a conjugação entre métodos físicos e químicos para quebra de células têm sido amplamente utilizada, sendo que a escolha da metodologia reflete a necessidade entre a quantidade esperada de DNA e a pureza requerida.

Para analisar a qualidade do produto final, o material foi submetido à eletroforese em gel em agarose. Todas as amostras forneceram material para a continuidade das análises. O DNA foi submetido à espectrofotometria para análise da quantidade de DNA presente em cada amostra (comprimento de onda de 260 nm), assim como sua pureza (comprimento de onda de 280 nm para proteínas e 230 nm para ácidos húmicos). Uma razão 260/280 próxima a 1,8 indica uma baixa contaminação da amostra de DNA por proteínas. Uma razão 260/230 maior do que 2,0 indica uma baixa contaminação por ácidos húmicos.

5.12 MANIPULAÇÃO DE DNA

Os métodos de purificação de plasmídeos em tubos de 1,5 mL tipo *Eppendorf*, purificação de produtos de amplificação (PCR), digestão do DNA com endonucleases de restrição, eletroforese em gel de ágar, agarose e poliacrilamida (preparados em tampão TAE) foram executados segundo Sambrook *et al.*, (1989). Os géis de ágar (1%), agarose (1%) ou poliacrilamida (12%), foram corados em solução de brometo de etídeo 0,5 µg.mL⁻¹ (Invitrogen Inc.), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em câmera digital (Olympus modelo C-3040ZOOM, Japão).

5.13 TÉCNICA ARDRA

5.13.1 Amplificação do gene 16S rRNA

O DNA extraído do ambiente foi submetido à amplificação por PCR. O gene 16S rRNA de bactérias e arqueias presentes nas amostras de sedimento foi amplificado por PCR utilizando-se os pares de oligonucleotídeos iniciadores universais (*primers*) apresentados na TABELA 3.

TABELA 3 - INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES 16S rRNA

Organismo	Gene	Primer	Sequência	Referências
<i>Bacteria</i>	16S	27F	5' AGAGTTT <u>GATC</u> MTGGCTCAG	Suzuki e Giovannoni, 1996
	rRNA	1492R	5' GGTTACCTTGTTACGACTT	
<i>Archaea</i>	16S	21F	5' TTC <u>Y</u> GGTTGATCC <u>Y</u> GCC <u>R</u> GA	Moyer <i>et al.</i> , 1998
	rRNA	958R	5' <u>Y</u> CCGGCGTTG <u>A</u> NTCCAATT	

Legenda: As letras sublinhadas correspondem a posições degeneradas, onde: M = A + C; Y = C + T; R = A + G; N = A + G + C + T; W = A + T; S = C + G; B = C + G + T

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Eppendorf *Mastercycler Gradient*. As reações contiveram 20 ng de DNA molde, 20 pmol de cada primer, 2 unidades de enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Inc.), tampão de reação para a respectiva enzima *Taq* DNA polimerase diluído 10 vezes, 200 µmol/L de dideoxynucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 1,5 mmol/L de cloreto de magnésio, 1 µL de BSA 0,1% e água ultra pura estéril para um volume de final de 50 µL. Os ciclos de amplificação do DNA de *Archaea* foram: um ciclo de 95°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguidos por um ciclo final de 72°C por 10 minutos. A precipitação dos produtos de PCR de *Archaea* foi realizada com etanol.

Os ciclos de amplificação do DNA de *Bacteria* foram: um ciclo de 94°C por 3 minutos, seguido por 26 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos,

72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguidos por um ciclo final de 72° por 10 minutos. A precipitação dos produtos de PCR de *Bacteria* foi realizada com isopropanol.

5.13.2 Digestão em gel de poliacrilamida

Fragmentos de 16S rRNA amplificados através da PCR foram cortados em áreas específicas com enzima de restrição, sendo o produto então separado por eletroforese em gel de poliacrilamida. Diferentes sequências do 16S rRNA foram cortadas em diferentes sítios de restrição, resultando em um perfil único da comunidade. Dessa maneira, cada fragmento moveu-se ao longo do gel com uma velocidade inversamente proporcional ao *log* do seu peso molecular, produzindo bandas que correspondem ao conjunto de fragmentos, posicionados em ordem decrescente pelo gel.

Caso fossem detectadas diferenças significativas entre os géis de poliacrilamida, os perfis de restrição gerados pela enzima *Hinf*I de cada amostra do sedimento seriam utilizados para calcular a riqueza, a riqueza modificada, os índices de diversidade e o dendograma de similaridade. Porém, esta metodologia foi descartada devido à similaridade evidente entre os perfis analisados. A semelhança entre os padrões de bandas dos géis foi constatada visualmente e através do programa Labworks[®].

5.14 BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS

5.14.1 Amplificação do gene 16S rRNA

Para a montagem das bibliotecas metagenômicas através da Reação em Cadeia da Polimerase foram misturadas 6,66 ng de DNA de cada réplica (três de

Paranaguá e três de Laranjeiras) perfazendo um total de 20 ng para cada área. As demais condições de PCR foram as mesmas descritas no item 5.13.1.

5.14.2 Clonagem (Transformação, coleta e estocagem de clones transformantes)

Os vetores plasmidiais são plasmídeos bacterianos, ou seja, moléculas circulares de DNA que replicam o seu DNA independentemente do cromossomo bacteriano da célula (GRIFFITHS *et al.*, 2006). O kit comercial TA Cloning® (Invitrogen), específico para clonagem de fragmentos de PCR, foi utilizado para a clonagem dos genes 16S rRNA amplificados das amostras de sedimentos. O vetor pCR®2.1 (APÊNDICE 2) é linearizado e possui uma base nitrogenada timina em cada uma das extremidades, sendo assim possível utilizar a capacidade intrínseca da enzima DNA polimerase de adicionar uma base nitrogenada adenina em cada nova fita de DNA no final de um ciclo de amplificação. A existência de pontas coesivas A – T aumenta a eficiência da ligação do inserto com o vetor.

A quantidade de produto de PCR utilizada na reação de ligação foi calculada segundo equação sugerida pelo fabricante do vetor, a saber:

$$\mathbf{X \text{ ng de produto de PCR} = \frac{\mathbf{(Y \text{ bp do produto de PCR})(50 \text{ ng do vetor pCR 2.1}^{\circledR})}{\mathbf{Tamanho em pares de base do vetor pCR 2.1}^{\circledR} = \sim 3900}$$

Onde X é o montante de produto de PCR de Y pares de base a ser ligado numa razão molar (vetor:inserto) de 1:1.

Sendo assim, após quantificação dos produtos de PCR, foram adicionados 18,78 ng (2 µl) dos mesmos à 2 µl de tampão, 2 µl do vetor pCR®2.1, 3 µl de água ultra pura (para um volume total de 9 µl) e 1µl de T4 Ligase. A reação de ligação foi mantida a 14°C durante a noite. Após esse período a reação foi então armazenada a -20°C. Para a reação de ligação para confecção da biblioteca de *Archaea*, de acordo com a equação acima, foram utilizados 12 ng de produto da PCR.

No presente estudo, como hospedeira dos plasmídeos recombinantes derivados do pCR[®]2.1 (Invitrogen) foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* estirpe DH5 α (Invitrogen) (TABELA 4). Para o cultivo bacteriano em meio líquido foi utilizado o meio de cultura Terrific Broth (TB) (SAMBROOK *et al.*, 1989), adicionado de 250 μ g/mL de ampicilina. As culturas foram então incubadas a 37°C e 180 rpm durante a noite. Para crescimento bacteriano em meio sólido foi utilizado o meio Luria-Bertani Agar (LB-ágar) (SAMBROOK *et al.*, 1989) (APÊNDICE 1).

TABELA 4 - ESTIRPE E PLASMÍDEO UTILIZADOS PARA LIGAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO

Estirpe: <i>E. coli</i>	Genótipo e/ou Fenótipo	Referência
DH5 α	F- ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZ</i> YA <i>argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-, mk+) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ -	Invitrogen
Plasmídeo	Referência	
pCR [®] 2.1	Invitrogen	

O cultivo da estirpe DH5 α de *E. coli* foi realizado em meio Luria-Bertani (LB) (APÊNDICE 1) a 180 rpm até D.O._{600nm} entre 0,35 - 0,45. Foi realizada então a incubação em gelo (por 10 minutos) e centrifugação em tubos apropriados de 50 mL a 2.700g a 4°C, em centrífuga Himac CR 21G (HITACHI[®]) para recuperação das células. O sobrenadante foi então descartado, sendo realizada a ressuspensão em 15 mL de cloreto de cálcio e cloreto de magnésio (em cada tubo) com posterior junção dos tubos. Nova centrifugação a 2.700g a 4° C, descarte do sobrenadante e ressuspensão em 2 mL de cloreto de cálcio.

As células competentes de *E.coli* estirpe DH5 α foram transformadas através da mistura de 200 μ L de células competentes a 2 μ L do sistema de ligação. A mistura foi então deixada por 30 minutos em banho de gelo. Depois de transcorrido este tempo, as células foram submetidas a choque térmico a 42°C por 90 segundos em banho-maria. Foram adicionados 800 μ L de meio SOC (APÊNDICE 1) às células, para recuperação das mesmas, e deixadas a 50 rpm por 45 minutos a 37°C. As células transformadas foram plaqueadas em meio sólido LB-ágar contendo antibiótico ampicilina, kanamicina e X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-

galactopiranosídeo) como substrato para a enzima β -galactosidase. As placas foram então incubadas em estufa a 37°C por 18 horas.

Após o período de incubação, as colônias transformantes foram detectadas pela inativação da função β -galactosidase da *lacZ'*, resultando na incapacidade de conversão do substrato X-Gal em um corante azul. Sendo assim, as colônias que apresentaram coloração branca foram coletadas com auxílio de um palito de madeira, e então organizadas em placas de Petri de 96 amostras contendo meio sólido LA, ampicilina e kanamicina. As culturas foram mantidas em freezer a -20°C em 100 μ L de glicerol 87%, após terem sido inoculadas em placas do ELISA de 96 poços, preenchidas com 100 μ L de meio líquido TB (contendo ampicilina e kanamicina) e incubadas em estufa a 37°C por 18 horas.

5.14.3 Extração de DNA plasmidial em placas de 96 poços

O crescimento bacteriano foi realizado utilizando-se blocos de 96 poços com capacidade de 2 mL por poço, sendo adicionados 1,25 mL de meio TB contendo 250 μ g.mL⁻¹ de ampicilina em cada poço. As colônias foram então inoculadas com auxílio de repicador de 96 pinos e a placa selada com adesivo perfurado, permitindo assim a aeração das culturas. Estas foram então incubadas em estufa a 37°C por 16 horas sob uma agitação permanente de 180 rpm. A sedimentação das células foi realizada através da centrifugação do bloco das culturas crescidas por 7 minutos a 4.000 rpm. O precipitado de células foi lavado com 180 μ L de GET (glucose 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L pH 8 e Tris-HCl 25 mmol/L pH 8). Foi realizado então o descarte do sobrenadante e nova adição de GET, contendo 2,5 μ g de RNase. As células dh5 α foram então ressuspendidas por agitação, sendo a suspensão transferida para uma microplaca (polipropileno) de 96 poços e fundo em V. Cada poço da placa recebeu 80 μ L de solução de lise (NaOH 0,2 mol/L e SDS 1%). A placa foi então selada, misturada por inversão e incubada em temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente foram acrescentados, a cada poço, 80 μ L de KOAc 3 mol/L pH 5,2 gelado, misturando-se por inversão. A placa foi deixada 10 minutos a temperatura

ambiente e então incubada aberta em estufa a 90°C por 30 minutos. Depois de transcorrido esse tempo, a placa foi resfriada em banho de gelo por 10 minutos e centrifugada 10 minutos a 4000 rpm e 4°C. Foi realizada então a coleta do sobrenadante e a transferência do mesmo para uma placa de 96 poços Millipore (MAGV N22), fixada sobre uma placa de fundo “V” de 250 µL. O conjunto foi centrifugado (sem a tampa) por 5 minutos a 4000 rpm. Ao filtrado que passou para a microplaca foram adicionados 100 µL de isopropanol, e centrifugados por 45 minutos a 4000 rpm. O precipitado obtido de DNA foi lavado com 150 µL de etanol 70% e secado em estufa a 37°C por 15 minutos. O DNA foi dissolvido em 30 µL de água ultra pura.

5.14.4 Sequenciamento dos clones

O sequenciamento do DNA plasmidial da biblioteca do gene 16S rRNA foi realizado no sequenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Life Science/Molecular Dynamics) seguindo o método cujo princípio foi descrito por Sanger *et al.*, (1977).

As reações de sequenciamento em tubo foram realizadas adicionando-se 3 µL de DNA, 0,5 µL de *primer* (21F para Archaea e 27F para Bacteria), 3 µL de reagente de sequenciamento ET (Dyynamic ET terminator cycle sequencing kit GE Healthcare®) e 1 µL de água Milli-Q. Foram realizados os seguintes ciclos: *Bacteria*: um ciclo de 95°C por 1 minuto, seguido por 34 ciclos de 94°C por 20 segundos, 62°C por 2 minutos; *Archaea*: um ciclo de 95°C por 1 minuto, seguido por 34 ciclos de 94°C por 20 segundos, 55°C por 45 segundos e 62°C por 2 minutos. O sequenciamento do DNA plasmidial em tubo foi realizado no sequenciador ABI377 (Applied Biosystems).

5.14.5 Análise das sequências do gene 16S rRNA

A sequência obtida de cada clone foi comparada com os bancos de dados de genes ribossomais do *Ribosomal Database ProjectII* (RDPII - atualizado em 25/01/2010) (<http://www.rdp.cme.msu.edu>), através do programa *Classifier*, e com o Genbank – NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), através do programa *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*). O programa *Classifier* utiliza um sistema de pareamento de palavras (pedaços da sequência de consulta, ou sub-sequências) conjugado com uma estatística Baesyana, visando à obtenção de uma classificação taxonômica, realizando para tanto a comparação com o banco de dados que contém sequências de 16S rDNA de organismo já descritos, taxonomicamente bem conhecidos (COLE *et al.*, 2005). O programa *BLAST*, por sua vez, apesar de também utilizar a busca através de sub-sequências, executa a comparação com o banco de dados completo, incluindo sequências de 16S rRNA de organismos ainda não classificados ou descritos. As sequências obtidas foram comparadas com 1,358,426 sequências de 16S rRNA presentes no banco de dados de genes ribossomais do RDPII. O modelo de alinhamento do banco RDPII considera tanto a sequência primária quanto a estrutura secundária da molécula de rRNA. A hierarquia de classificação taxonômica do RDPII é baseada na proposta de Garrity *et al.* (2007), com reorganizações adicionais para Firmicutes (LUDWIG; SCHLEIFER; WHITMAN, 2008), Cianobactéria (WILMOTTE; HERDMAN, 2001) e com classificações de novas linhagens já bem definidas de Filo com poucos cultivados de Acidobactéria (BARNS *et al.*, 2007), Verrucomicrobia (SANGWAN *et al.*, 2004) e OP11 (HARRIS *et al.*, 2004). Informações para a classificação de Cloroplastos, Koarachaeota e Nanoarchaeum foram obtidas do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (WHEELER *et al.*, 2000).

Posteriormente serão aplicados os índices de diversidade às bibliotecas finais contendo o total do número de clones seqüenciados por amostra.

6 RESULTADOS

6.1 PARÂMETROS AMBIENTAIS

6.1.1 Porcentagem de carbonato de cálcio e matéria orgânica

Os valores de carbonato de cálcio foram significativamente menores nos sedimentos da Baía das Laranjeiras do que na Baía de Paranaguá (FIGURA 6 e TABELA 5). Nos sedimentos da Baía das Laranjeiras os valores mínimos e máximos de carbonato de cálcio foram de 1,52% e 4,53%, e nos da Baía de Paranaguá de 3,26% e 6,34%, respectivamente. A FIGURA 6 evidencia a diferença significativa ($p < 0,05$) entre Laranjeiras e Paranaguá para o carbonato de cálcio

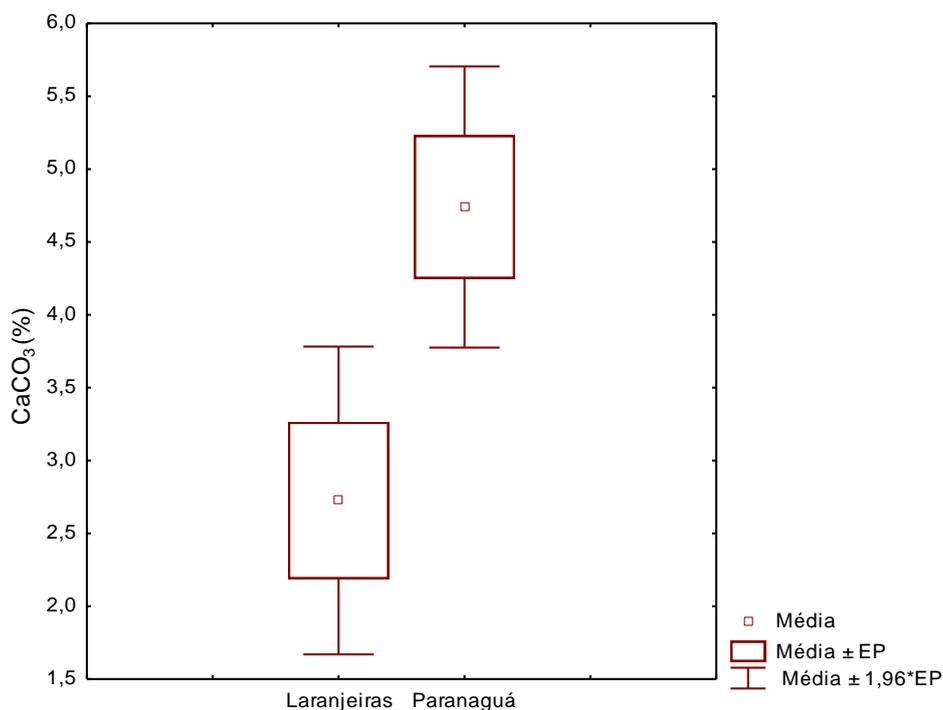


FIGURA 6 – DIFERENÇA SIGNIFICATIVA NA PORCENTAGEM DE CARBONATO DE CÁLCIO ($p=0,02^*$) ENTRE AS ESTAÇÕES DAS BAÍAS DAS LARANJEIRAS E PARANAGUÁ PELO TESTE-t.

As porcentagens de matéria orgânica nas amostras de sedimento foram significativamente maiores em Paranaguá (FIGURA 7). A porcentagem mínima de matéria orgânica em Laranjeiras foi de 1,87%, e a máxima de 2,55%. Em Paranaguá, a mínima foi de 3,97% e a máxima de 10,19%.

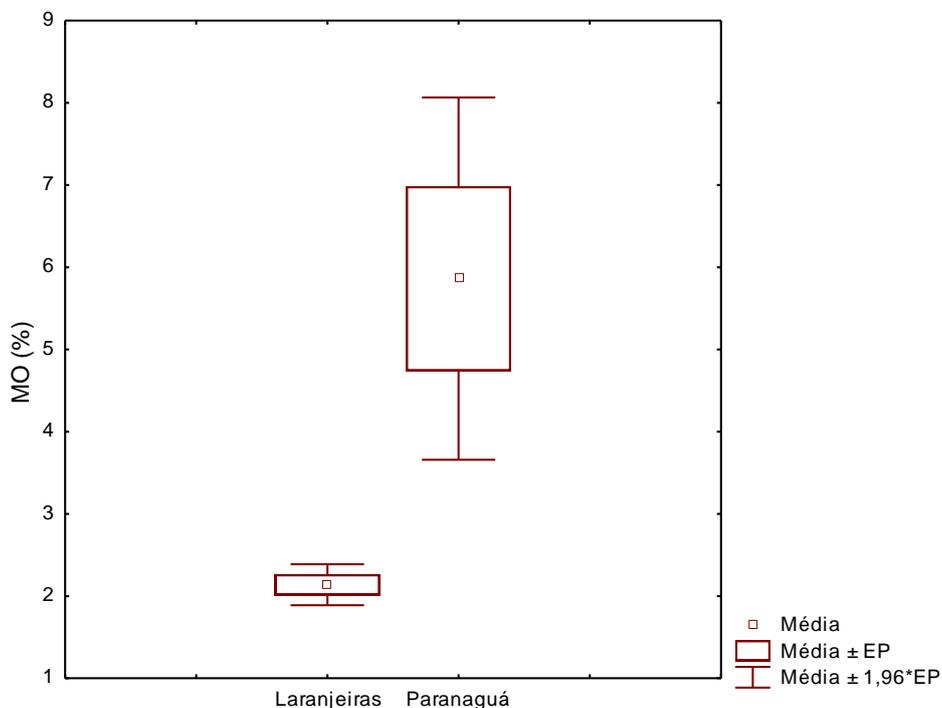


FIGURA 7. DIFERENÇA SIGNIFICATIVA NA PORCENTAGEM DE MATÉRIA ORGÂNICA ($p=0,01$) ENTRE AS ESTAÇÕES DAS BAÍAS DAS LARANJEIRAS E PARANAGUÁ PELO TESTE-t.

TABELA 5 – RESULTADO DOS VALORES DE CARBONATO DE CÁLCIO E MATÉRIA ORGÂNICA, EXPRESSOS EM PORCENTAGEM

Amostra	CaCO ₃ (%)	MO (%)
1Laranjeiras	1,72	1,87
2Laranjeiras	2,91	2,55
3Laranjeiras	1,52	2,05
4Laranjeiras	4,53	2,30
5Laranjeiras	2,95	1,92
1Paranaguá	4,52	10,19
2Paranaguá	4,67	5,70
3Paranaguá	3,26	3,97
4Paranaguá	6,34	5,11
5Paranaguá	4,88	4,33

6.1.2 Porcentagens de cascalho, areia, silte e argila

Embora os sedimentos das duas áreas amostradas tenham apresentado uma alta porcentagem de areia, no sedimento da Baía das Laranjeiras não pode ser detectada a presença de silte e argila, diferentemente de Paranaguá (TABELA 6). Todos os pontos amostrados em Paranaguá foram classificados como pobremente ou moderadamente selecionados, enquanto as amostras provenientes da Baía das Laranjeiras apresentaram pontos de bem a muito bem selecionados.

TABELA 6 – RESULTADO DAS ANÁLISES PARA PORCENTAGEM DE CASCALHO, AREIA, SILTE E ARGILA.

Amostra	Cascalho (%)	Areia (%)	Silte (%)	Argila (%)	Classificação
1Laranjeiras	0,01027	99,99	0	0	Bem selecionado
2Laranjeiras	0,2307	99,77	0	0	Bem selecionado
3Laranjeiras	4,349	95,65	0	0	Bem selecionado
4Laranjeiras	0,3323	99,67	0	0	Bem selecionado
5Laranjeiras	0,319	99,68	0	0	Muito bem selecionado
1Paranaguá	0,2421	89,25	5,481	5,024	Pobremente selecionado
2Paranaguá	0,1988	91,71	3,587	4,509	Moderadamente selecionado
3Paranaguá	0,4713	92,59	2,55	4,386	Moderadamente selecionado
4Paranaguá	0,09651	90,56	3,902	5,442	Pobremente selecionado
5Paranaguá	0,01035	92,85	3,621	3,518	Moderadamente selecionado

6.1.3 Porcentagem de fosfato

A porcentagem de fosfato no sedimento foi significativamente maior em Paranaguá (FIGURA 8), onde foi obtido mínimo de 0,47% e máximo de 0,79% (TABELA 7). Em Laranjeiras, os valores da porcentagem de fosfato no sedimento flutuaram entre 0,11% e 0,18%.

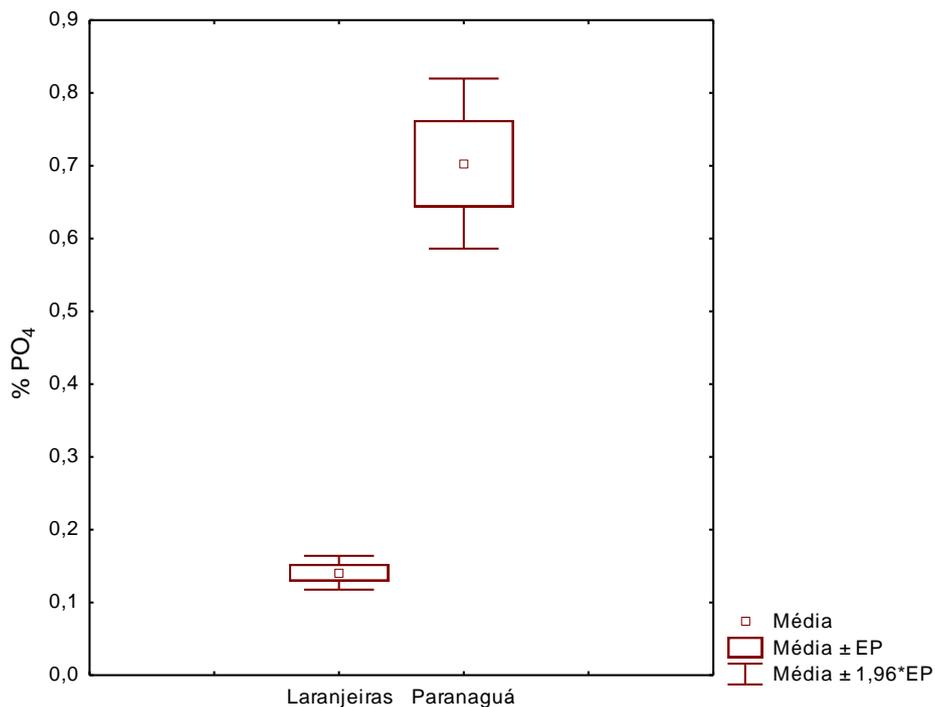


FIGURA 8. DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ($p=0,000015$) PARA PORCENTAGEM DE FOSFATO ENTRE AS ESTAÇÕES DAS BAÍAS DE LARANJEIRAS E PARANAGUÁ PELO TESTE-t.

6.1.4 Porcentagem de nitrato

A porcentagem de nitrato no sedimento de Laranjeiras oscilou entre 0,068% e 0,097% e nas amostras de Paranaguá entre 0,063% e 0,22% (TABELA 7). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre Laranjeiras e Paranaguá para a porcentagem de nitrato do sedimento (FIGURA 9).

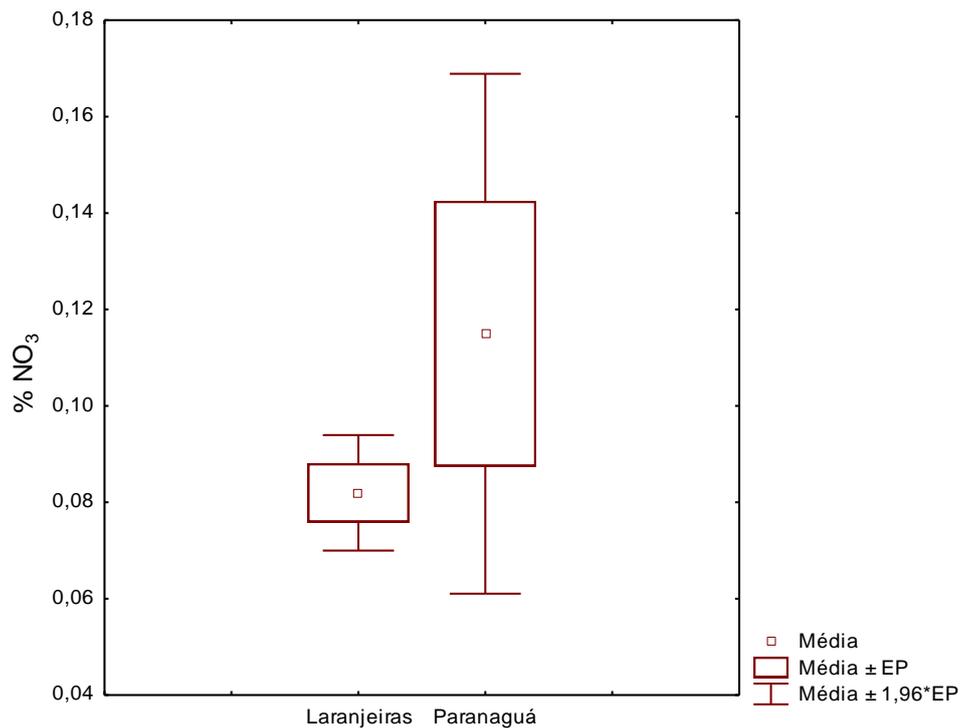


FIGURA 9. DIFERENÇA NÃO SIGNIFICATIVA ($p > 0,05$) PARA PORCENTAGEM DE NITRATO ENTRE AS ESTAÇÕES DAS BAÍAS DAS LARANJEIRAS E PARANAGUÁ PELO TESTE-t.

TABELA 7 – VALORES DE FOSFATO E NITRATO EXPRESSOS EM PORCENTAGEM.

Amostra	PO ₄ (%)	NO ₃ (%)
1Laranjeiras	0,158281	0,073
2Laranjeiras	0,177374	0,096
3Laranjeiras	0,134271	0,097
4Laranjeiras	0,119928	0,075
5Laranjeiras	0,114403	0,068
1Paranaguá	0,77345	0,220
2Paranaguá	0,736858	0,111
3Paranaguá	0,468051	0,080
4Paranaguá	0,742643	0,101
5Paranaguá	0,793913	0,063

6.1.5 Potencial Hidrogeniônico (pH)

Não foi identificada diferença significativa do pH entre as estações de Laranjeiras e Paranaguá (FIGURA 10). Em Laranjeiras o pH do sedimento oscilou entre 6,99 e 7,07. Em Paranaguá o mínimo de pH foi de 6,76 e o máximo de 7,35.

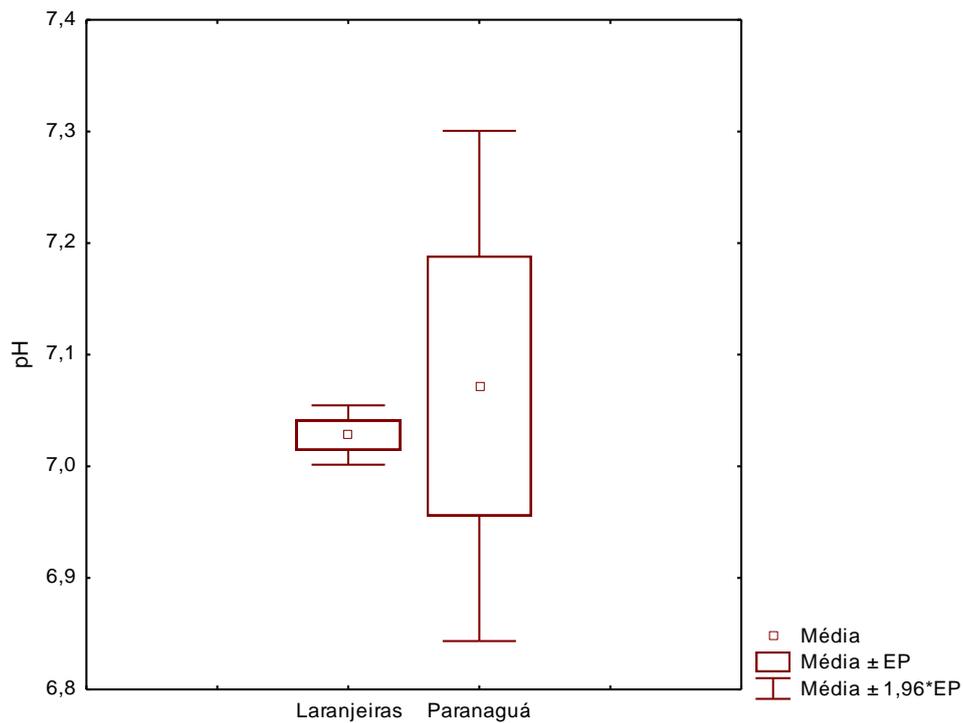


FIGURA 10. DIFERENÇA NÃO SIGNIFICATIVA ($p > 0,05$) DO pH ENTRE AS ESTAÇÕES DAS BAÍAS DAS LARANJEIRAS E PARANAGUÁ PELO TESTE-t.

6.1.6 Temperatura

O teste-t apontou diferença significativa de temperatura entre as estações de Laranjeiras e Paranaguá (FIGURA 11). Na Baía das Laranjeiras a temperatura do sedimento oscilou entre 20°C e 23°C. Em Paranaguá a mesma esteve entre 20°C e 21°C.

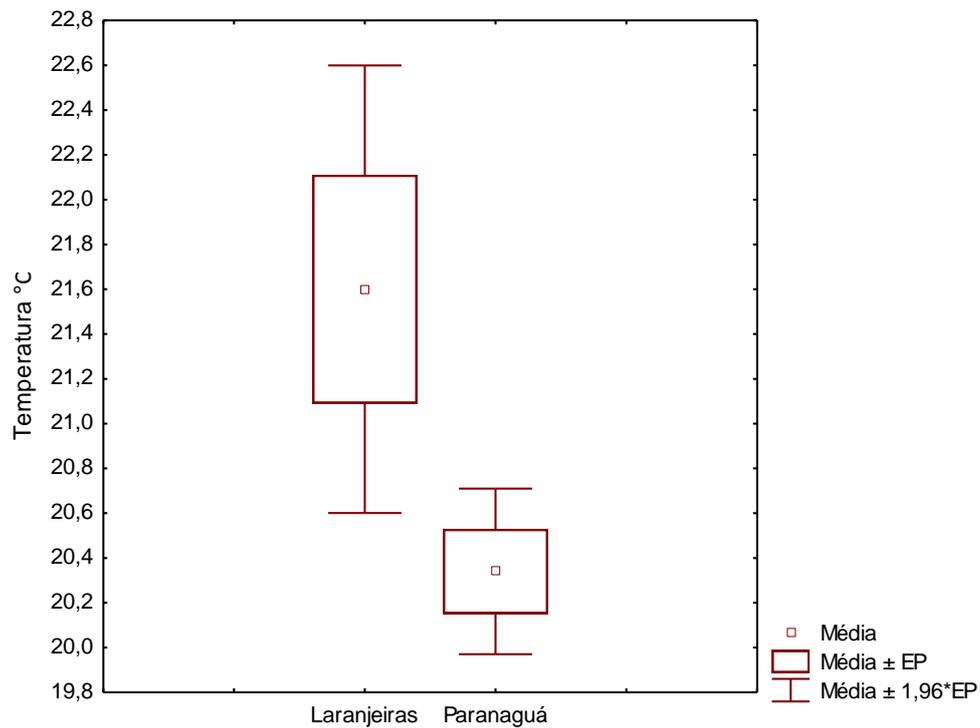


FIGURA 11. DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ($p=0,049$) PARA TEMPERATURA ENTRE AS ESTAÇÕES DAS BAÍAS DAS LARANJEIRAS E PARANAGUÁ PELO TESTE-t.

6.1.7 Salinidade

Entre os sedimentos das estações de Laranjeiras e Paranaguá não houve diferença significativa nos valores de salinidade (FIGURA 12). Esta variou entre 27 e 29,5 nas estações da Baía das Laranjeiras e entre 22 e 29 nas estações de Paranaguá.

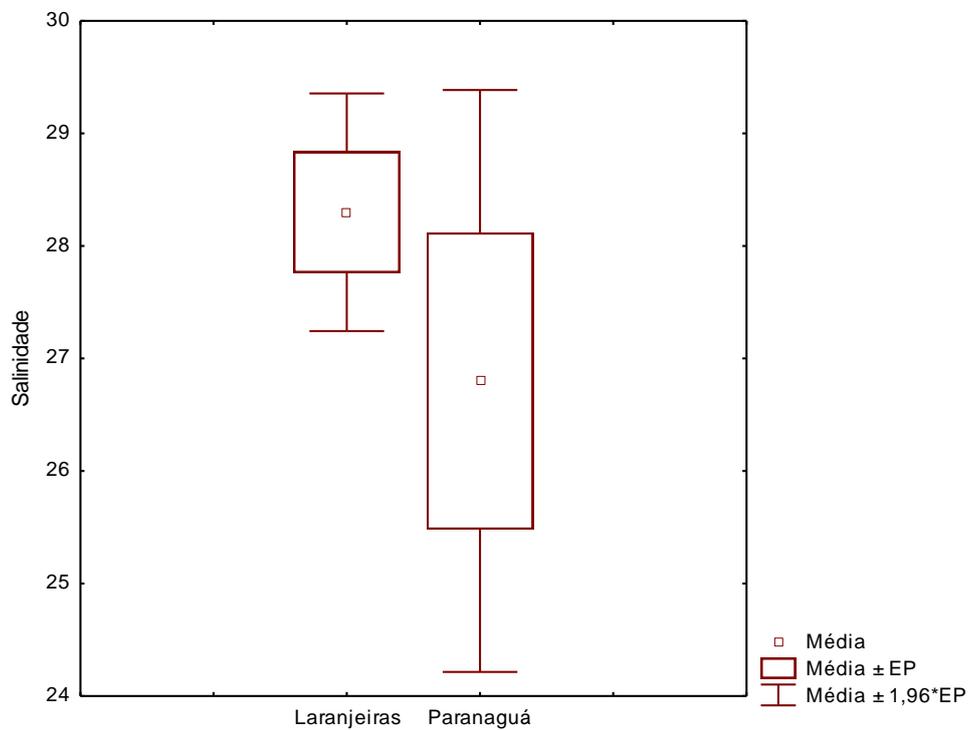


FIGURA 12. DIFERENÇA NÃO SIGNIFICATIVA ($p > 0,05$) PARA SALINIDADE ENTRE AS ESTAÇÕES DAS BAÍAS DAS LARANJEIRAS E PARANAGUÁ PELO TESTE-t.

6.1.8 Hidrocarbonetos

Nas análises de hidrocarbonetos alifáticos foi observada a presença de Mistura Complexa Não Resolvida (MCNR ou UCM - *Unresolved Complex Mixture*) nas amostras provenientes da Baía de Paranaguá, com máximo de 46,89 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (TABELA 8). Nas análises de sedimentos da Baía das Laranjeiras não foi detectada a presença de UCM (FIGURA 13), ao contrário do observado na Baía de Paranaguá (FIGURA 14).

Nos pontos amostrais da Baía das Laranjeiras, a concentração de alifáticos totais foi de 1,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e 0,76 $\mu\text{g.g}^{-1}$, e na Baía de Paranaguá de 55,6 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e 51,45 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (TABELA 8). Nos pontos amostrais da Baía das Laranjeiras os valores para a razão Pristano/Fitano foram de 0,48 e 0,27, e na Baía de Paranaguá de 0,7 e 0,73.

Na mesma tabela pode ser observado que os valores da razão Pristano/n-C₁₇, são mais elevados no manguezal de Paranaguá que no das Laranjeiras. Os de TAR (razão terrígeno/aquático ou *terrestrial aquatic ratio*) obtidos foram 1,26 e 0,99 nos pontos amostrais da Baía das Laranjeiras, e 33,33 e 25,93 na Baía de Paranaguá. Em suma, as amostras de sedimento provenientes da Baía de Paranaguá apresentaram valores maiores de UCM, razão Pristano/Fitano, Pristano/n-C₁₇, UCM/R, TAR, Alcanos Totais, Alifáticos Resolvidos e Alifáticos Totais.

TABELA 8. ÍNDICES DE DIAGNÓSTICO AMBIENTAL E NÍVEIS DE HIDROCARBONETOS.

Parâmetro	Amostras			
	L2	L4	P2	P4
Pristano ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	0,010	0,004	0,014	0,011
Fitano ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	0,021	0,015	0,020	0,015
UCM	nd	nd	46,89	46,53
Pristano/fitano	0,48	0,27	0,70	0,73
Pristano/n-C ₁₇	0,03	0,02	0,30	0,26
Fitano/n-C ₁₈	2,10	2,50	2,00	1,67
UCM/R	nc	nc	5,39	9,46
TAR	1,26	0,99	33,33	25,93
Alcanos Totais ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	1,205	0,513	8,417	4,640
Alifáticos Resolvidos ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	1,507	0,757	8,704	4,920
Alifáticos Totais	1,507	0,757	55,60	51,45

* nd: não detectado; nc: não calculado.

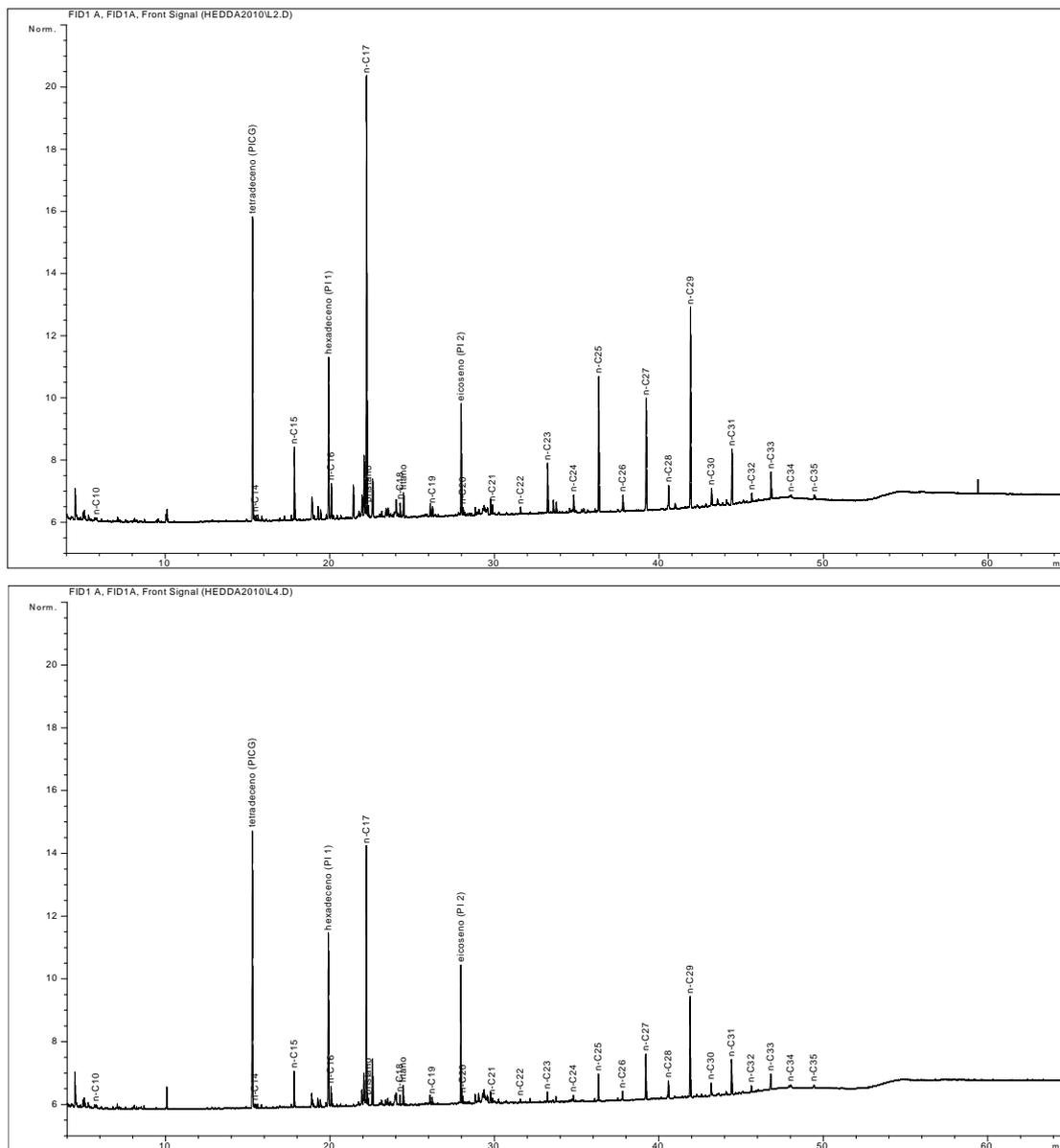


FIGURA 13 - CROMATOGRAMAS DA FRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS DE DUAS AMOSTRAS COLETADAS NA BAÍA DAS LARANJEIRAS (L2 e L4).

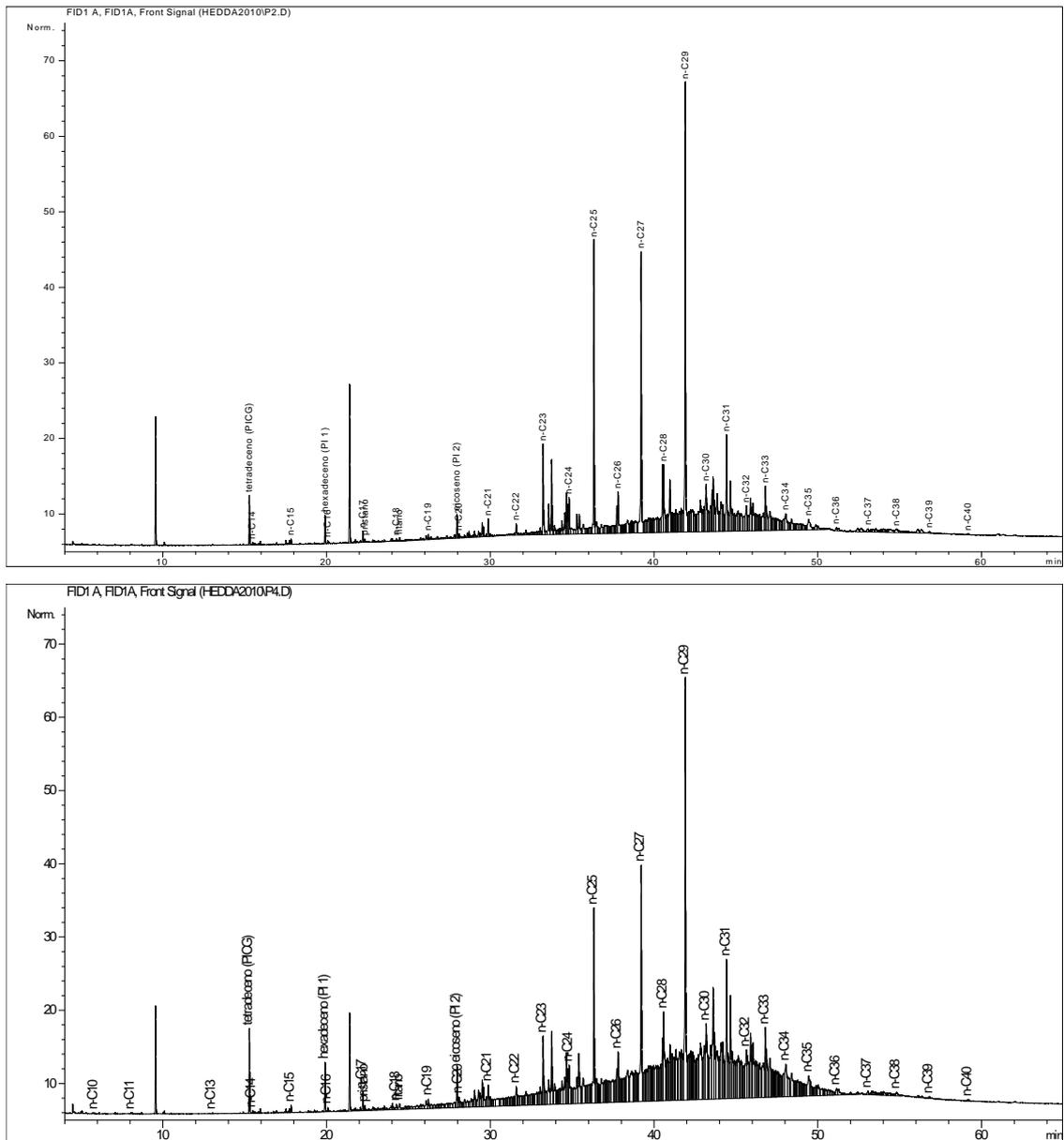


FIGURA 14 - CROMATOGRAMAS DA FRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS DE DUAS AMOSTRAS COLETADAS NA BAÍA DAS PARANAGUÁ (P2 e P4).

6.2 PARÂMETROS BIOLÓGICOS

6.2.1 Contagem de procariotos heterotróficos totais

Os valores para abundância de procariotos heterotróficos totais nos sedimentos da Baía das Laranjeiras variaram entre $22,8 \times 10^3 \text{ cel.cm}^{-3}$ e $40,9 \times 10^3 \text{ cel.cm}^{-3}$, enquanto os valores nos sedimentos da Baía de Paranaguá flutuaram entre $36,1 \times 10^3 \text{ cel.cm}^{-3}$ e $179,5 \times 10^3 \text{ cel.cm}^{-3}$.

A diferença da abundância de procariotos heterotróficos totais entre as estações das Baías das Laranjeiras e Paranaguá foi apontada pelo teste-t como sendo não significativa ($p > 0,05$), como pode ser observado na FIGURA 15.

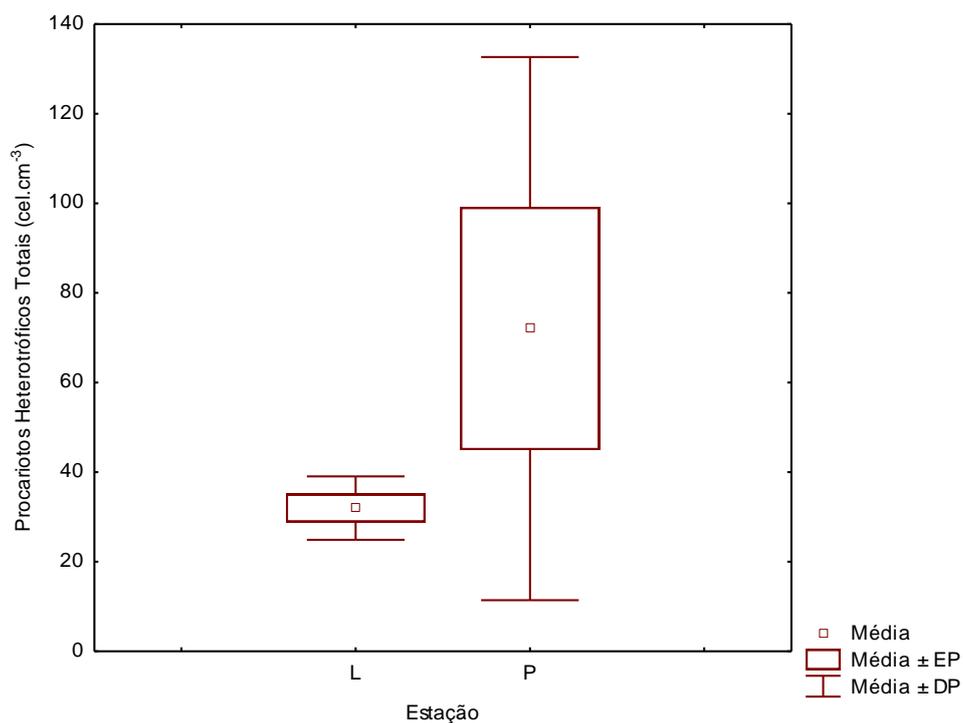


FIGURA 15 - DIFERENÇA NÃO SIGNIFICATIVA ($p > 0,05$) DE PROCARIOTOS HETEROTRÓFICOS TOTAIS ENTRE SEDIMENTOS DA BAÍA DAS LARANJEIRAS E DE PARANAGUÁ PELO TESTE-t. L: BAÍA DAS LARANJEIRAS; P: BAÍA DE PARANAGUÁ.

6.2.2 Biomassa procariótica

Os valores de biomassa procariótica nos sedimentos da Baía das Laranjeiras variaram entre $0,27 \mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$ e $0,66 \mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$, enquanto os valores nos sedimentos da Baía de Paranaguá oscilaram entre $0,42 \mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$ e $2,30 \mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$. Assim como a abundância de procariotos heterotróficos totais, a biomassa procariótica não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os sedimentos das Baías das Laranjeiras e Paranaguá (FIGURA 16).

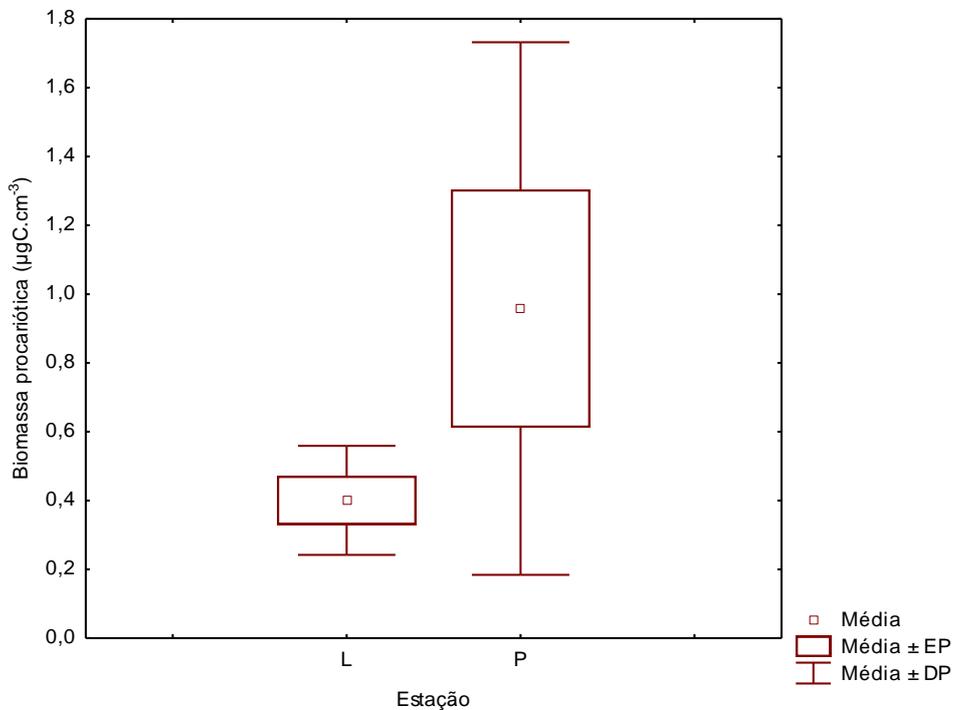


FIGURA 16 - DIFERENÇA NÃO SIGNIFICATIVA ($p > 0,05$) DE BIOMASSA PROCARIÓTICA ENTRE SEDIMENTOS DAS BAÍAS DAS LARANJEIRAS E DE PARANAGUÁ PELO TESTE-t. L: BAÍA DAS LARANJEIRAS; P: BAÍA DE PARANAGUÁ.

6.2.3 Coliformes totais

Os valores de coliformes totais presentes nos sedimentos da Baía das Laranjeiras variaram entre 23,99 NMP.g⁻¹ (Número Mais Provável/grama) e 67,39 NMP.g⁻¹. Na Baía de Paranaguá foram observados valores entre 672,1 NMP.g⁻¹ e 1655,8 NMP.g⁻¹.

A abundância de coliformes totais apresentou diferença altamente significativa ($p < 0,01$) entre as regiões amostradas, como pode ser observado na FIGURA 17.

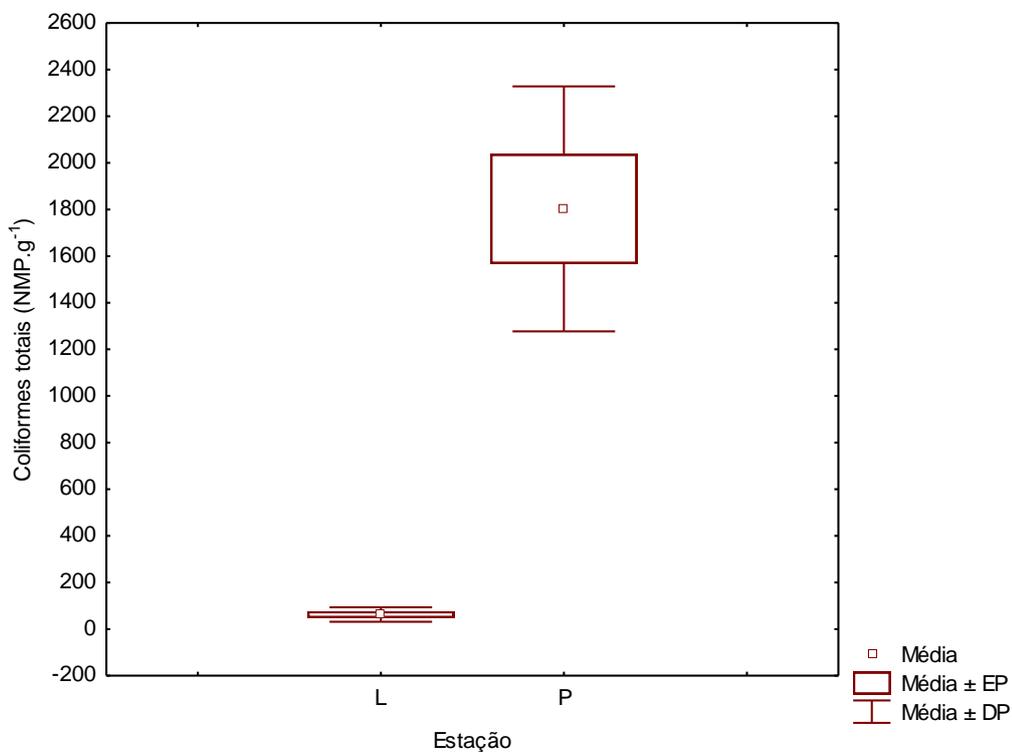


FIGURA 17 - A DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ($p=0,00008$) DE COLIFORMES TOTAIS ENTRE SEDIMENTOS DAS BAÍAS DAS LARANJEIRAS E DE PARANAGUÁ PELO TESTE-t. L: BAÍA DAS LARANJEIRAS; P: BAÍA DE PARANAGUÁ.

6.2.4 *Escherichia coli*

Os valores de *E. coli* obtidos nos sedimentos da Baía das Laranjeiras variaram entre 0,1 NMP.g⁻¹ e 2,0 NMP.g⁻¹ e na Baía de Paranaguá entre 55,2 NMP.g⁻¹ e 1543,9 NMP.g⁻¹.

A abundância de *E. coli* apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), de acordo com o teste-t, entre os sedimentos das Baías das Laranjeiras e Paranaguá, como pode ser observado na FIGURA 18.

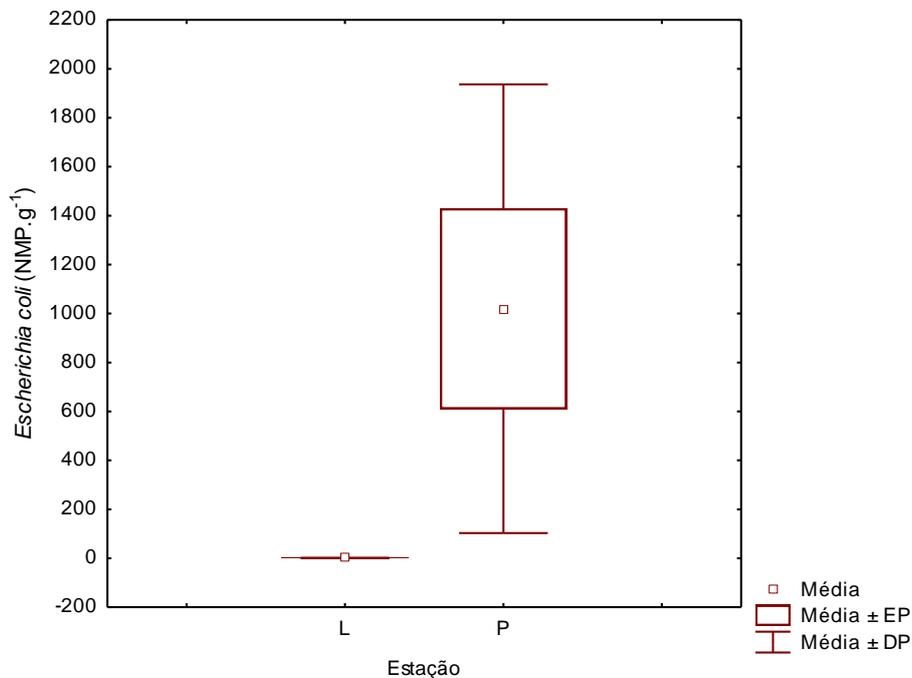


FIGURA 18 - DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ($p=0,04$) DE *Escherichia coli* ENTRE SEDIMENTOS DAS BAÍAS DAS LARANJEIRAS E DE PARANAGUÁ PELO TESTE-t. L: BAÍA DAS LARANJEIRAS; P: BAÍA DE PARANAGUÁ.

6.2.5 Extração do DNA das amostras de solo

Como pode ser observado na TABELA 9, embora a contaminação por proteínas esteja em nível baixo, a por ácidos húmicos se faz presente. Estas moléculas são potencialmente inibidoras da atividade da enzima DNA polimerase na Reação em Cadeia da Polimerase. Com o intuito de minimizar esta inibição, às reações de PCR foi adicionada BSA (*bovine serum albumin*), uma proteína que, segundo Kreader *et al.* (1996), se liga aos ácidos húmicos, neutralizando sua ação inibidora.

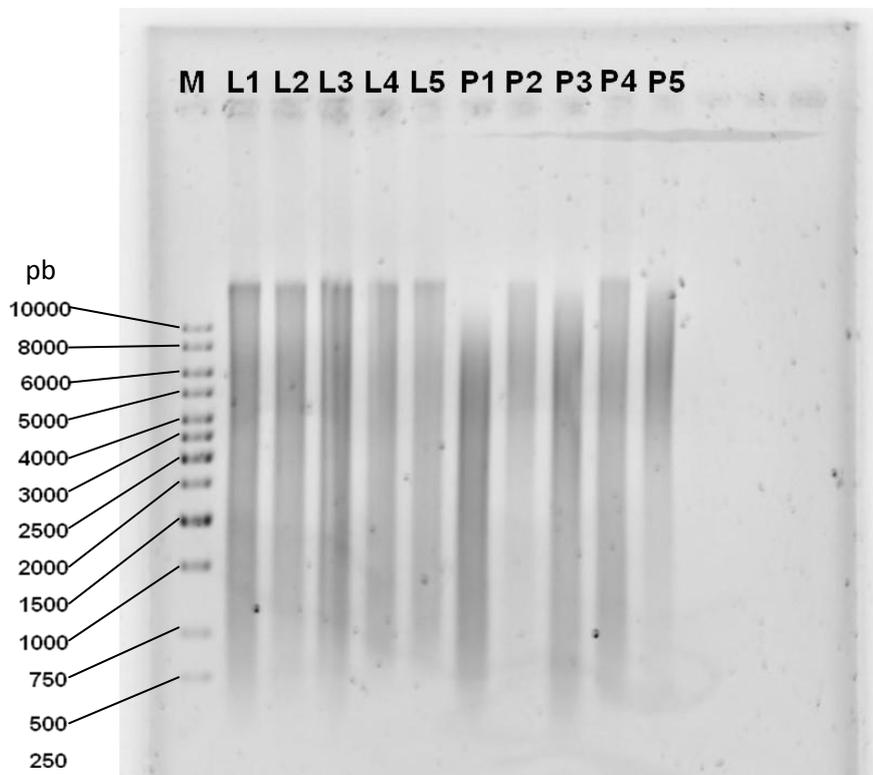


FIGURA 19 - EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1%, CORRIDO EM TAMPÃO TAE 1X, CORADO COM $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ DE BROMETO DE ETÍDIO E FOTOGRAFADO SOB LUZ ULTRA-VIOLETA. COLUNA M: MARCADOR: 1Kb DNA LADDER PLUS; COLUNAS L1 A L5: DNA ORIUNDO DAS AMOSTRAS DA BAÍA DAS LARANJEIRAS; COLUNAS P1 A P5: DNA ORIUNDO DAS AMOSTRAS DA BAÍA DE PARANAGUÁ; PB: PARES DE BASE.

TABELA 9 - QUANTIDADE DE DNA OBTIDA E SUA PUREZA.

Amostra	DNA (ng.µl ⁻¹)	260/280 (proteínas)	260/230 (ácidos húmicos)
1Laranjeiras	97,4	1,6	1,0
2Laranjeiras	68	1,7	1,1
3Laranjeiras	93,9	1,6	1,3
4Laranjeiras	84	1,6	1,4
5Laranjeiras	70,4	1,7	1,4
1Paranaguá	80,4	1,8	1,5
2Paranaguá	23,9	1,8	0,9
3Paranaguá	96,6	1,5	0,8
4Paranaguá	75,6	1,8	1,2
5Paranaguá	44,7	1,7	0,6

6.2.6 Amplificação do gene 16S rRNA

Após a extração do DNA dos sedimentos dos pontos amostrais, foram realizados testes para otimizar a amplificação do DNA ribossomal 16S através da Reação em Cadeia da Polimerase. Considerou-se o balanço entre reagentes, quantidade de DNA molde, número de ciclos e formação de bandas inespecíficas, até a obtenção de produtos de PCR satisfatórios. As condições consideradas ótimas estão descritas na seção Materiais e Métodos. Em todos os ensaios foram utilizados controles negativos, sem DNA. A FIGURA 20 demonstra um exemplo dos produtos de PCR da comunidade bacteriana obtido nas condições estabelecidas, onde se pode notar a ausência de bandas inespecíficas. Para o Domínio *Bacteria* foram obtidos fragmentos de 1465 pares de base, e para o Domínio *Archaea* de 937 pares de base, de acordo com os *primers* utilizados, apresentados na TABELA 3.

Devido a problemas logísticos, principalmente baixo rendimento na extração do DNA ambiental, dentre os cinco pontos amostrados em cada região, três foram escolhidos para a continuidade das análises, mantendo assim o *n*-amostral exigido para as análises estatísticas necessárias.

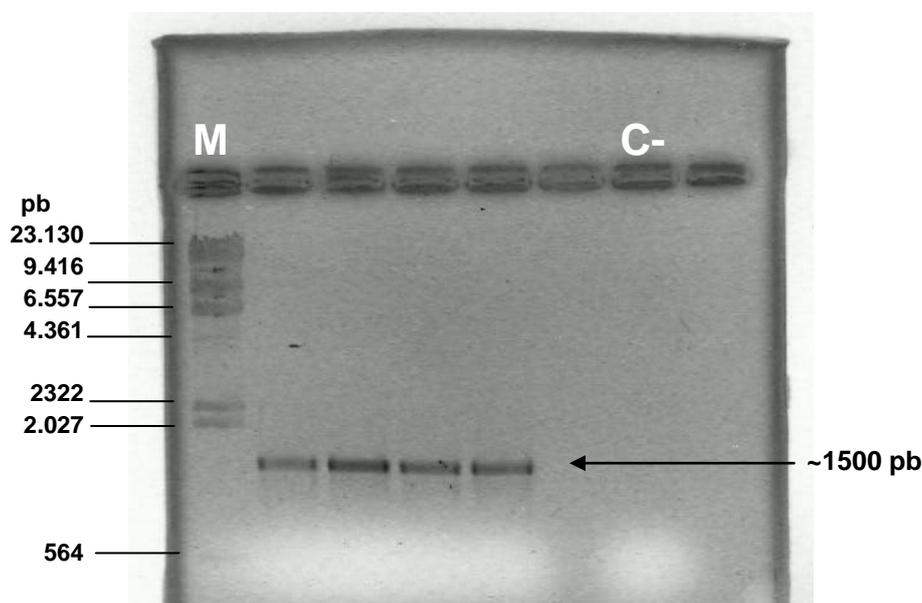


FIGURA 20 – EXEMPLO DE PRODUTO DE PCR OBTIDO PARA A COMUNIDADE DE BACTERIA. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1%, CORRIDO EM TAMPÃO TAE 1X, CORADO COM $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DE BROMETO DE ETÍDIO E FOTOGRAFADO SOB LUZ ULTRAVIOLETA. COLUNA M: MARCADOR DE TAMANHO MOLECULAR DNA λ /*Hind*III (~500ng); COLUNAS 2-4: DNA OBTIDO POR PCR A PARTIR DAS AMOSTRAS DA BAÍA DE PARANAGUÁ; COLUNA 6: DE PCR SEM DNA MOLDE (CONTROLE NEGATIVO). pb = PARES DE BASES.

6.2.7 ARDRA

O DNA referente ao gene 16S rRNA e amplificado através da Reação em Cadeia da Polimerase foi analisado pela técnica ARDRA, utilizando-se para tanto a enzima de restrição *Hinf*I (FIGURAS 21 e 22). A análise é representativa do polimorfismo genético presente nas amostras, e sendo assim cada banda não é considerada como sendo uma única espécie, podendo representar vários microorganismos que possuam um mesmo padrão de sítios de corte para a enzima, liberando assim fragmentos de mesmo tamanho. Não foram realizados os cálculos de riqueza, riqueza modificada, índices de diversidade e o dendograma de similaridade, devido à semelhança evidente entre os perfis de restrição obtidos (FIGURAS 21 e 22).

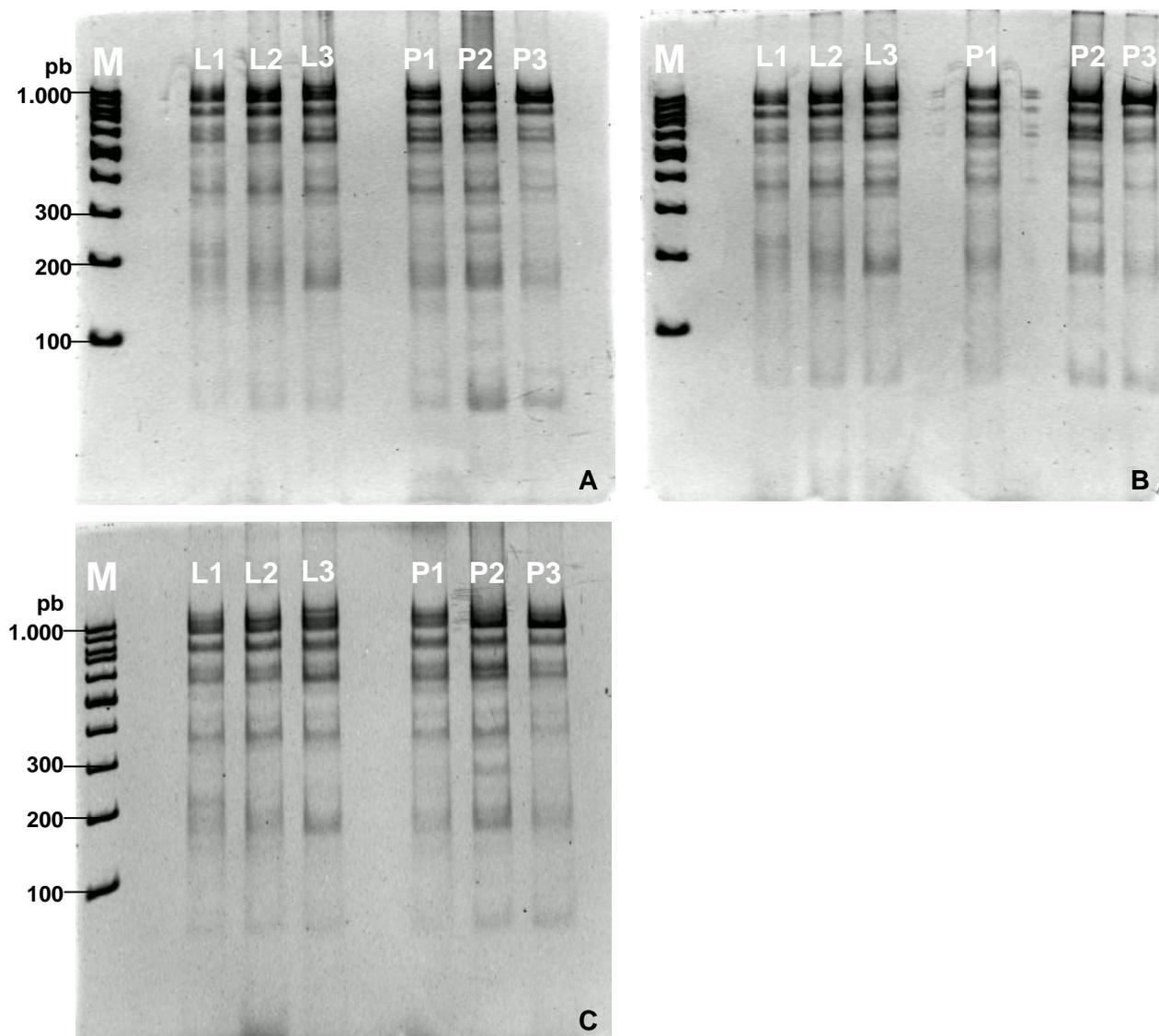


FIGURA 21 – ELETROFORESES EM GÉL DE POLIACRILAMIDA NÃO-DESNATURANTE A 12%, CORRIDAS EM TAMPÃO TAE 1x, A 100V, DURANTE 2h. OS GÉIS FORAM CORADOS COM $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DE BROMETO DE ETÍDIO E FOTOGRAFADOS SOB LUZ ULTRA-VIOLETA. COLUNA M: MARCADOR DE TAMANHO MOLECULAR 100pb DNA *LADDER* (500ng) Invitrogen®; COLUNAS L1, L2 E L3: 300ng DO GENE 16S rRNA DE *BACTERIA* DAS AMOSTRAS DA BAÍA DAS LARANJEIRAS CLIVADOS COM *Hinfl*, REPRESENTANDO TRÊS ENSAIOS INDEPENDENTES; COLUNAS P1, P2 E P3: 300ng DO GENE 16S rRNA DAS AMOSTRAS DA BAÍA DE PARANAGUÁ CLIVADOS COM *Hinfl*, REPRESENTANDO TRÊS ENSAIOS INDEPENDENTES; pb = PARES DE BASES. OS GÉIS A, B E C SÃO TRIPLICATAS.

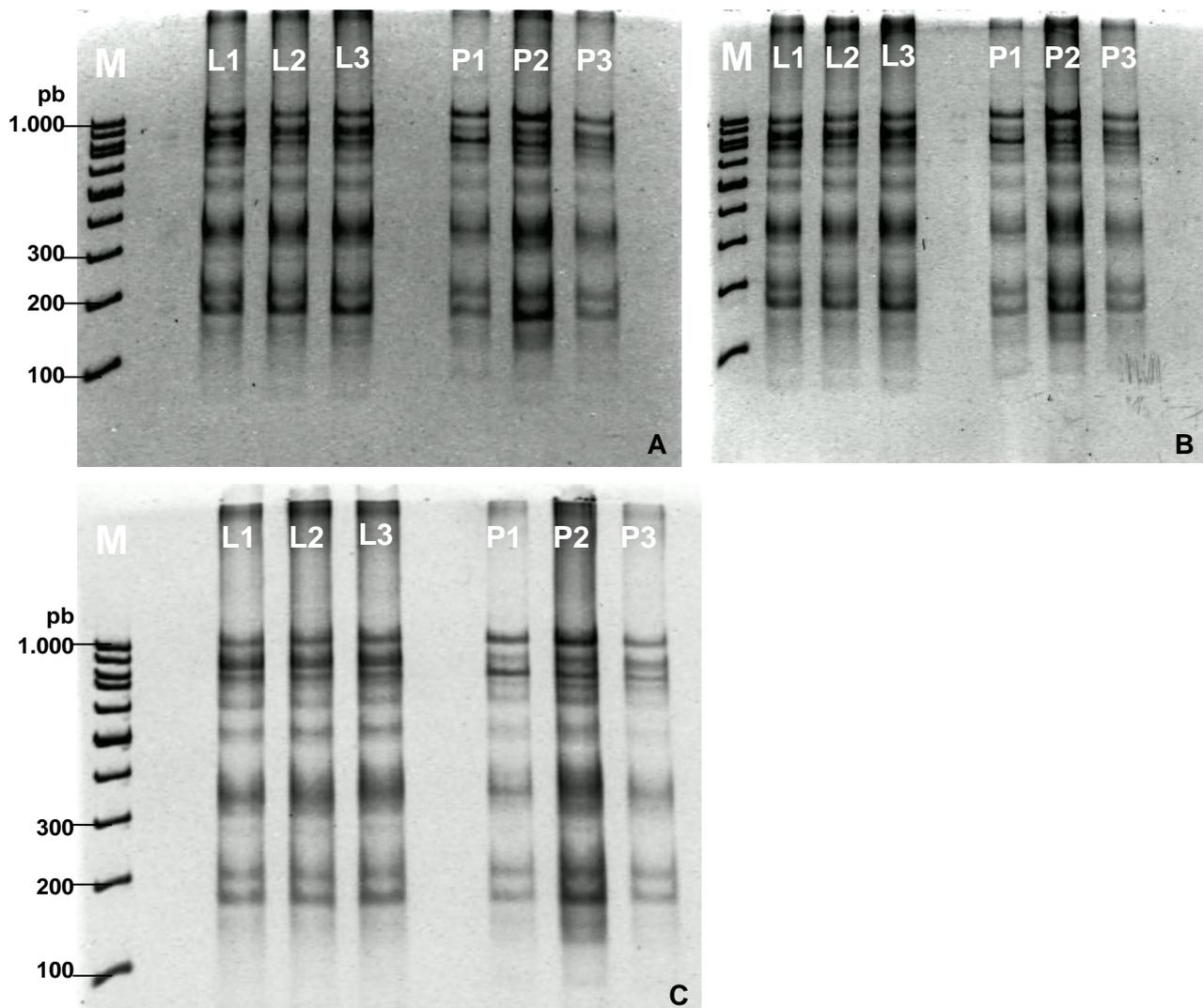


FIGURA 22 – ELETROFORESES EM GÉL DE POLIACRILAMIDA NÃO-DESNATURANTE A 12%, CORRIDO EM TAMPÃO TAE 1x, A 100V, DURANTE 2h. OS GÉIS FORAM CORADOS COM $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DE BROMETO DE ETÍDIO E FOTOGRAFADOS SOB LUZ ULTRA-VIOLETA. COLUNA M: MARCADOR DE TAMANHO MOLECULAR 100pb DNA LADDER (500ng) Invitrogen®; COLUNAS L1, L2 E L3: 300ng DO GENE 16S rRNA DE ARCHAEA DAS AMOSTRAS DA BAÍA DAS LARANJEIRAS CLIVADOS COM *HinfI*, REPRESENTANDO TRÊS ENSAIOS INDEPENDENTES; COLUNAS P1, P2 E P3: 300ng DO GENE 16S rRNA DAS AMOSTRAS DA BAÍA DE PARANAGUÁ CLIVADOS COM *HinfI*, REPRESENTANDO TRÊS ENSAIOS INDEPENDENTES; pb = PARES DE BASES. OS GÉIS A, B E C SÃO TRIPLICATAS.

6.2.8 Bibliotecas do gene 16S rRNA

Para cada área amostrada (Laranjeiras e Paranaguá) foi obtida uma biblioteca do Domínio *Bacteria* e uma do *Archaea*, perfazendo um total de quatro bibliotecas. Ao todo 384 clones estão estocados em glicerol 50% e distribuídos da seguinte maneira: 96 clones de *Bacteria* e 96 clones de *Archaea* provenientes da Baía das Laranjeiras e 96 clones de *Bacteria* e 96 clones de *Archaea* provenientes da Baía de Paranaguá. O DNA plasmidial correspondente aos clones do Domínio *Bacteria* foi purificado para análise por sequenciamento. O DNA dos demais clones será igualmente purificado e as quatro bibliotecas serão totalmente sequenciadas e analisadas quanto à diversidade.

Os genes 16S rRNA identificados no presente trabalho, 45 referentes ao Domínio *Archaea* e 36 referentes ao Domínio *Bacteria*, resultaram de reações de seqüenciamento em tubo individual (TABELAS 1, 2, 3 e 4 - Anexos).

6.2.9 Identificação por sequenciamento do gene 16S rRNA

6.2.9.1 Baías das Laranjeiras

Para o Domínio *Bacteria*, até a presente etapa do trabalho, foram obtidas seqüências referentes a 36 clones que pertencem a este Domínio com 100% de confiança. Utilizando-se o programa *Classifier* foram observados altos índices de confiabilidade na grande maioria das seqüências até o nível de Família (TABELA 2 - anexos). Ao todo, 61,1% das seqüências recuperadas são representativas do Filo Cyanobacteria, sendo que destas 90,9% são da Família Bacillariophyta. Outros Filos encontrados foram Proteobacteria, Bacteroidetes e Acidobacteria (FIGURA 23). Dentro do Filo das Proteobacterias, foram observados organismos das Classes

Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria e Alphaproteobacteria, com porcentagens de similaridade de 81% a 100%.

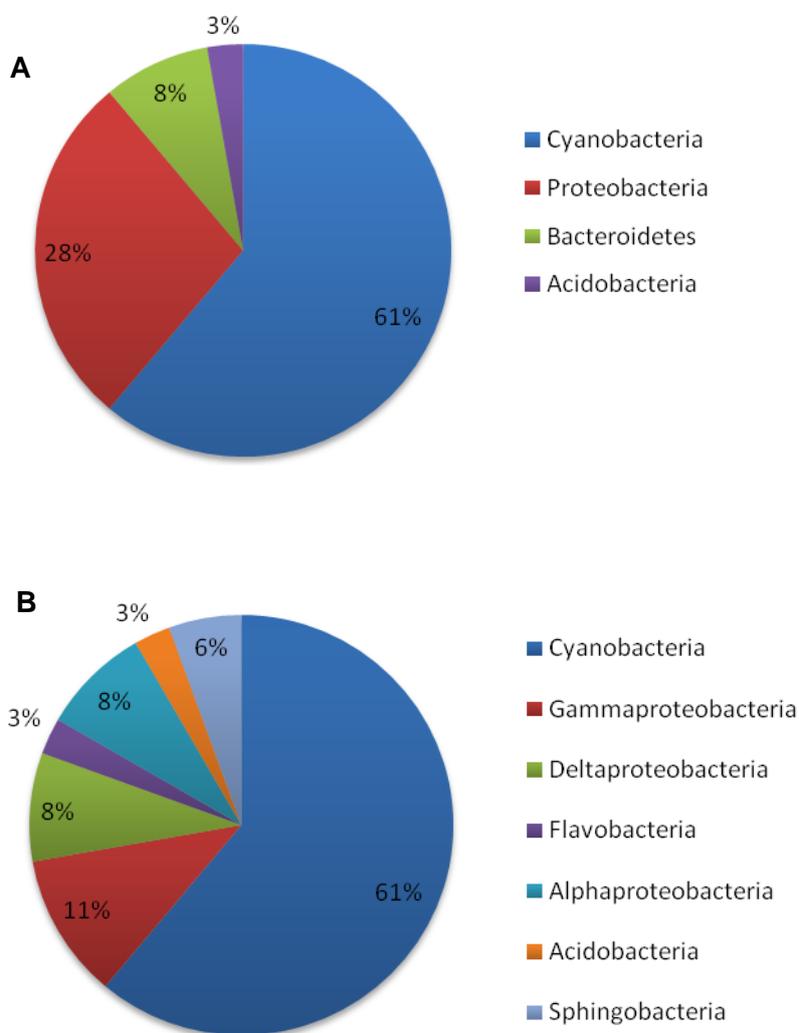


FIGURA 23 – **A**: PORCENTAGENS RELATIVAS AO NÍVEL TAXONÔMICO DE FILO PARA A BAÍA DAS LARANJEIRAS (DOMÍNIO *BACTERIA*); **B**: PORCENTAGENS RELATIVAS AO NÍVEL TAXONÔMICO DE CLASSE PARA A BAÍA DAS LARANJEIRAS (DOMÍNIO *BACTERIA*).

Até a presente etapa do trabalho, do DNA recuperado da Baía das Laranjeiras foram obtidas 29 sequências referentes ao Domínio *Archaea*. As sequências analisadas pela ferramenta *Classifier* (RDP) apresentaram um baixo índice de confiabilidade em níveis taxonômicos mais baixos (TABELA 4 - anexos), sendo mais

alta a confiabilidade quanto maior o nível taxonômico observado. Isso se deve ao fato de que o *Classifier* executa as comparações de sequências somente com o banco de dados que possui sequências de organismos descritos, de taxonomia conhecida. Porém, a quantidade de representantes do Domínio *Archaea* já cultivados e de taxonomia bem definida é relativamente baixa, se comparada ao Domínio *Bacteria*. Sendo assim, os resultados advindos do seu uso devem ser encarados como um indício de que a sequência submetida está relacionada a determinado grupo. Como evidenciado pelas análises comparativas com o banco de dados GenBank (NCBI) para *Archaea* (TABELA 3 - anexos), as sequências com baixo índice de confiabilidade no *Classifier* refletem, em sua maioria, organismos não cultivados cuja taxonomia ainda não foi apropriadamente descrita.

Para o Domínio *Archaea*, as porcentagens de similaridade no nível de Domínio oscilaram entre 37% e 100%. Apesar da ampla gama de variação, 86,2% das sequências apresentaram porcentagem de similaridade superior a 90% neste nível taxonômico. As sequências recuperadas para *Archaea* pertencem a dois grandes Filos: Crenarchaeota e Euryarchaeota (FIGURA 24A). Das sequências obtidas para *Archaea*, 48,3% pertencem ao Filo Crenarchaeota. Todas as sequências obtidas representativas do Filo Crenarchaeota estão relacionadas à Classe Thermoprotei. Dentro da Classe Thermoprotei, foram identificadas as Ordens Desulfurococcales, Thermoproteales e Caldisphaerales, com porcentagens de identidade oscilando entre 20% e 79%. Dentro do Filo Euryarchaeota, foram identificadas as Classes Methanococci, Thermoplasmata, Methanomicrobia e Methanobacteria, com porcentagens de identidade variando entre 10% e 63% (FIGURA 24C).

Segundo comparações com o banco de dados GenBank, das sequências do gene 16S rRNA recuperadas da Baía das Laranjeiras, 83,3% das pertencentes ao Domínio *Bacteria* (TABELA 1 - anexos) e 93,1% de *Archaea* (TABELA 3 - anexos), estão relacionadas com sequências de organismos pertencentes a regiões costeiras e oceânicas. A porcentagem de similaridade flutuou entre 83% e 100% para *Bacteria* e entre 87% e 100% para *Archaea*.

6.2.9.2 Baía de Paranaguá

Até a presente etapa do trabalho foram obtidos 16 clones de *Archaea* a partir das amostras de DNA da Baía de Paranaguá. Destas, 56,25% pertencem ao Filo Crenarchaeota, e 43,75% ao Filo Euryarchaeota, segundo a ferramenta *Classifier*, do RDP (TABELA 4 - anexos) (FIGURA 24B). Assim como as análises feitas para a Baía das Laranjeiras, todas as sequências obtidas do Filo Crenarchaeota estão relacionadas à Classe Thermoprotei. Dentre estas, foram identificados organismos das Ordens Thermoproteales, Sulfolobales e Desulfurococcales, com porcentagens de identidade oscilando entre 22% e 60% (FIGURA 24D).

Dentre as sequências do Filo Euryarchaeota, foram observadas as Ordens Methanococci, Methanobacteria e Thermoplasmata, porém com baixas porcentagens de similaridade, variando entre 13% e 65% a este nível. Segundo o banco de dados GenBank (TABELA 3 - anexos), 100% das sequências recuperadas pertencem a arqueias não cultivadas, sendo que destas 93,75% pertencem a ambientes costeiros e oceânicos, e dentre estas, 86,66% são pertencentes a sedimentos estuarinos e de manguezal.

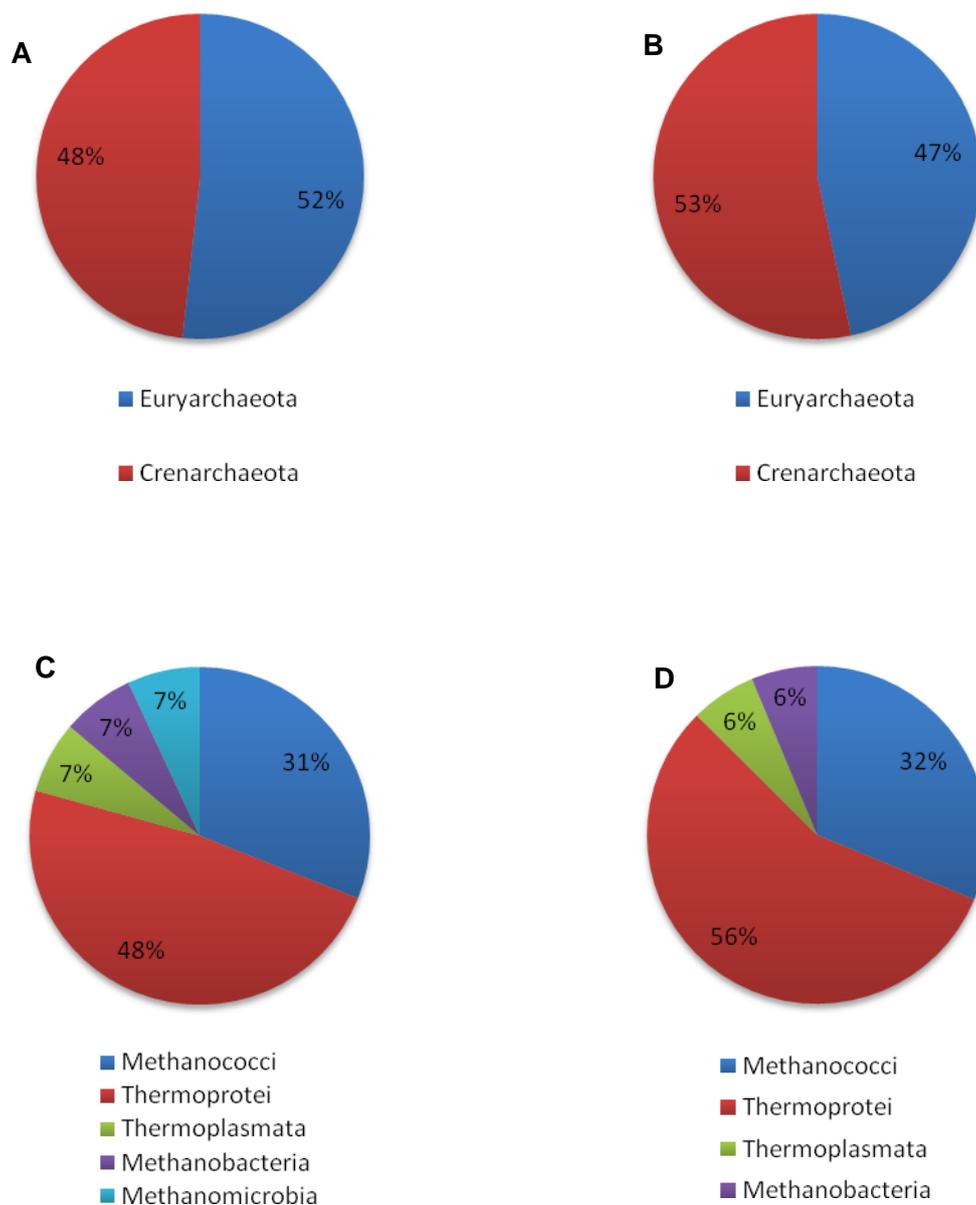


FIGURA 24 – PORCENTAGENS RELATIVAS AO NÍVEL TAXONÔMICO DE FILO (DOMÍNIO *ARCHAEA*) PARA **A**: BAÍA DAS LARANJEIRAS; **B**: BAÍA DE PARANAGUÁ; PORCENTAGENS RELATIVAS AO NÍVEL TAXONÔMICO DE CLASSE (DOMÍNIO *ARCHAEA*) PARA **C**: BAÍA DAS LARANJEIRAS; **D**: BAÍA DE PARANAGUÁ;

7 DISCUSSÃO

7.1 PARÂMETROS AMBIENTAIS

A atividade microbiana é considerada como a responsável pela maior parte das transformações de nutrientes ocorridas dentro dos ecossistemas de manguezal, onde bactérias, arqueias e fungos correspondem a um total de 91% da biomassa microbiana (ALONGI, 1988). Comunidades naturais bênticas são estáveis desde que não sofram perturbações externas, tanto naturais quanto antrópicas, sendo estas perturbações um fator determinante para a composição das mesmas (FINDLAY *et al.*, 1990 *apud* HOLGUIN, *et al.*, 2001). Os efeitos destas perturbações variam conforme a frequência, a duração e a natureza dos mesmos. Distúrbios comuns, como descarga de efluentes e derramamento de óleo, podem levar, por exemplo, à mudanças no sistema aeróbico-anaeróbico de decomposição para um sistema completamente anaeróbico, sendo este processo de reciclagem de nutrientes menos eficiente e mais lento, resultando no acúmulo e na liberação de compostos tóxicos (HOLGUIN, *et al.*, 2001).

No presente trabalho, assim como esperado, houve diferença significativa entre as porcentagens de fosfato das duas áreas em questão, evidenciando a influência antrópica na estação amostral do manguezal de Paranaguá. Devido ao fato de que o fósforo não apresenta fases atmosféricas gasosas estáveis, como o nitrogênio e o carbono, a disseminação deste nutriente é realizada principalmente através de vias aquáticas (FILIPPELLI, 2008). A área escolhida para amostragem está situada entre o píer da FOSPAR (Fospar S.A. Fertilizantes Fosfatados do Paraná), onde há descarregamento fósforo para produção de adubo, e o Canal do Anhaia, onde há descarga de parte do esgoto da cidade de Paranaguá. O fósforo constitui um elemento crítico para importantes processos naturais, cuja disponibilidade na maioria dos ambientes é relativamente escassa. Variações no ciclo do fósforo ocorreram durante a história geológica da Terra, sendo que o ciclo

moderno do fósforo terrestre é dominado pela agricultura, devido ao aumento do uso de fertilizantes, e outras atividades antropogênicas, como desflorestamento e perda de solos, assim como pelas fontes do esgoto (FILIPPELLI, 2008).

No que concerne à porcentagem de nitrato no sedimento, não houve diferença significativa evidenciada pelo teste-*t* entre as áreas amostradas. Apesar disso, a gama de oscilação desta porcentagem nas estações de Paranaguá foi consideravelmente maior. Segundo Holguin *et al.* (2001), a fixação de N₂ é uma das principais atividades procarióticas em ecossistemas de manguezal, apenas inferior à decomposição do carbono de detritos por bactérias redutoras de sulfato. A taxa e o fluxo de diferentes tipos de compostos nitrogenados dependem das características inerentes a cada sistema de manguezal (HOLGUIN, *et al.*, 2001). O nitrato derivado da degradação de compostos orgânicos nitrogenados presente em sedimentos é provavelmente convertido em íons de amônia por procariotos, sendo estes então assimilados por plantas e demais micro-organismos (RIVERA-MONROY *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 2009). Uma das prováveis modificações ambientais ocasionadas por atividades antrópicas, presentes na região de Paranaguá, pode estar correlacionada à descarga de efluentes domésticos. Estudos demonstram que sistemas de manguezais que recebem descargas de efluentes podem apresentar altas taxas de denitrificação associadas, sugerindo uma correção entre denitrificação e concentração de nitrato (RIVERA-MONROY *et al.*, 1995). Marone *et al.* (2005), indicam a predominância do processo de denitrificação por toda a Baía de Paranaguá, apresentando valores entre -24,3 e -10,6 x 10⁶ mol N.ano⁻¹, sendo o nitrogênio considerado potencialmente o nutriente mais limitante da região.

Um fator que indica perturbação da microbiota ocasionada por atividades antrópicas na região de Paranaguá é a diferença significativa observada na abundância de coliformes totais e *Escherichia coli* entre as duas regiões amostradas. Possivelmente a entrada de nutrientes como fósforo, além de outros aportes antropogênicos, venha a se refletir também na diferença significativa observada na porcentagem de carbonato de cálcio e matéria orgânica entre as regiões. Apesar disso, não foi observada diferença

significativa entre a abundância de procariotos heterotróficos totais e biomassa procariótica entre as regiões amostradas, embora a oscilação de seus valores nos sedimentos da Baía de Paranaguá seja evidentemente maior para os dois parâmetros.

No referente às análises de hidrocarbonetos alifáticos, a UCM compreende um conjunto de hidrocarbonetos diversos que não podem ser separados através das técnicas cromatográficas utilizadas, impossibilitando desse modo a identificação e quantificação individualizada destes compostos (VOLKMAN *et al.*, 1992). A presença de UCM é caracterizada pela formação de uma elevação na linha de base no cromatograma, e pode representar resíduos de óleo bruto intemperizado ou degradado por micro-organismos, sendo indicativo de contaminação de sedimentos marinhos por hidrocarbonetos. O indicativo de poluição nas estações da Baía de Paranaguá evidenciado pela presença de UCM foi corroborado pela concentração de alifáticos totais. Em sedimentos estuarinos considerados não poluídos, a concentração de alifáticos totais está abaixo de $10 \mu\text{g.g}^{-1}$. Porém, em áreas de manguezal com significativo aporte de n-alcenos de cadeia longa e número ímpar de carbono, o valor de alifáticos totais pode ser de até $30 \mu\text{g.g}^{-1}$, sem a necessária implicação de fontes antrópicas de hidrocarbonetos (VOLKMAN *et al.*, 1992). Foram observadas disparidades entre os valores de alifáticos totais presentes nas duas baías, indicando assim uma possível contaminação da região próxima ao Porto de Paranaguá. Em sedimentos costeiros não contaminados por petróleo, o pristano é encontrado em maiores concentrações que o fitano (VOLKMAN *et al.*, 1992). Concentrações maiores de pristano não foram encontradas em nenhum dos pontos amostrais. Do mesmo modo, uma razão pristano/fitano cujos valores sejam inferiores ou próximos a 1 indicam fontes petrogênicas de contaminação (VOLKMAN *et al.* 1992). As razões de pristano/fitano dos quatro pontos analisados foram inferiores a 1, indicando assim, apesar da diferença entre as duas áreas em outros parâmetros analisados, uma possível contaminação nas duas localidades. Este padrão pode ser ocasionado, por exemplo, pela circulação de água dentro do complexo estuarino.

Os parâmetros Pristano/n-C₁₇ e Fitano/n-C₁₈ indicam as razões entre as concentrações do pristano e do fitano com o n-alcano de peso molecular mais próximo. Em áreas contaminadas, valores superiores a 2,0 caracterizam a presença de resíduos degradados, como foi observado em todos os pontos amostrados para a razão Fitano/n-C₁₈. Os valores baixos da razão Pristano/n-C₁₇ indicam uma possível contaminação de óleo de origem recente (VOLKMAN *et al.*, 1992).

A razão terrígeno/aquático (TAR) é utilizada como um indicador da entrada relativa de matéria orgânica terrígena *versus* aquática, porém, deve ser utilizada com cautela por ser sensível a processos secundários, como maturação termal e biodegradação (PETERS *et al.*, 2005).

O pH e a salinidade não variaram significativamente nos sedimentos das duas baías. Apesar das áreas de coleta ficarem em dois eixos separados do complexo estuarino, sua localização em relação à desembocadura é semelhante, o que pode ter influenciado estes resultados. Além disto, valores semelhantes de pH e salinidade foram registrados por Kolm *et al.* (2002) em águas superficiais próximas do manguezal da Baía de Paranaguá. Por outro lado os valores de salinidade encontrados por Schoenenberger (1998) para águas superficiais próximas ao manguezal da Baía das Laranjeiras foram menores. Esta variação deve ser devida ao período do ano em que foram feitas as coletas. Enquanto Schoenenberger (1998) coletou a água nos meses de verão, em que a pluviosidade é maior, os sedimentos da presente pesquisa foram coletados na primavera, período com menor pluviosidade.

Apesar de a temperatura ter apresentado diferença marginalmente significativa, os valores obtidos aparentemente não indicam fontes prováveis de alteração da microbiota.

7.2 ARDRA

Segundo o estudo de Juliano Cury (CURY, 2002) sobre diversidade genética e metabólica da comunidade microbiana em manguezais de São Paulo afetados por contaminação por hidrocarbonetos, constatou-se, como no presente trabalho, pouca alteração da comunidade procariótica do Domínio *Archaea* em relação aos diferentes pontos amostrados.

A fraca influência dos pontos amostrais na estrutura arqueana e bacteriana dentro de cada área pode estar relacionada com o fato de que os sedimentos de manguezal estão permanentemente saturados com água, o que proporciona movimentação com a interação da maré. Ao nível de superfície, este processo pode diminuir a possibilidade de formação de micro-nichos contendo comunidades microbianas com estruturação distinta (ZHOU *et al.*, 2002).

Já entre as duas áreas, com distintos níveis de contaminação, a fraca influência dos pontos amostrais na estrutura arqueana pode estar relacionada à facilidade de adaptação deste grupo a ambientes extremos, como observou Cury (2002), sendo desse modo menos sensíveis a alterações ambientais desta natureza. O estudo de Liu *et al.* (2009) demonstrou que em solos contaminados por hidrocarbonetos, a comunidade arqueana pode vir a ser até mesmo mais complexa do que em ambientes prístinos.

Devem ser levadas em conta, da mesma forma, as implicações e limites da técnica utilizada (ARDRA) e da escolha da enzima de restrição de acordo com o número de seus sítios de restrição (*Hinfl*). Micro-organismos podem possuir mais de uma cópia do gene 16S. Sendo assim, múltiplas bandas no gel de poliacrilamida podem vir a representar apenas uma espécie procariótica. Similarmente, uma mesma banda no gel pode vir a representar mais de uma espécie procariótica. Outra limitação inerente à técnica é a possível amplificação preferencial de grupos dominantes através da Reação em Cadeia da Polimerase, mascarando assim diferenças estruturais mais sutis entre as comunidades. Sendo assim, se houvessem padrões de bandeamento diferentes, a comunidade procariótica seria seguramente diferente. Porém, se o

padrão de bandeamento obtido é similar, diferenças estruturais podem estar presentes ou não, sendo necessária a aplicação de técnicas mais acuradas de investigação (como o sequenciamento).

A relação entre a composição da comunidade procariótica e os fatores ambientais é altamente complexa em ecossistemas de manguezal, já que a comunidade varia de acordo com as condições ambientais e por sua vez as mudanças nas comunidades procarióticas geram alterações nos ciclos dos nutrientes nestes ambientes (ZHANG *et al.*, 2009). A técnica ARDRA, assim como para a comunidade de *Archaea*, não demonstrou diferenças significativas entre as comunidades bacterianas das duas regiões amostradas. Somada às questões passíveis de gerarem este padrão de similaridade expostas anteriormente, pode-se sugerir que as influências antrópicas verificadas na Baía de Paranaguá não são suficientes para gerar distúrbios na comunidade procariótica ao ponto de serem observadas pela resolução da técnica em questão. Estudos em manguezais como o de Zhang *et al.* (2009) identificaram como fontes de variabilidade da comunidade bacteriana *in situ*, principalmente o conteúdo de carbono orgânico, fósforo orgânico e pH. No presente estudo, através da técnica ARDRA, não foi verificada variabilidade significativa entre as áreas amostradas, mesmo havendo diferença significativa nas concentrações de CaCO₃, PO₄ e MO, diferenças significativas na abundância de *E. coli* e coliformes totais, assim como diferenças nos indicadores de contaminantes por hidrocarbonetos entre as mesmas. Segundo Seeliger e Kjerfve (2001), o Complexo Estuarino de Paranaguá é um dos sistemas costeiros menos impactados do sul-sudeste brasileiro, sendo o atual estado de conservação um resultado do processo regional de colonização, já que a maior parte do desenvolvimento urbano, industrial e agrícola do Estado do Paraná está localizada no primeiro planalto e não na planície costeira.

Piza *et al.* (2004) estudando a diversidade bacteriana do estuário de Santos-São Vicente em duas regiões (contaminada e não contaminada por hidrocarbonetos), observaram diferenças estruturais nas duas áreas apenas para o grupo de *Actinobacteria*. Gomes *et al.* (2008), em pesquisa sobre a diversidade da comunidade bacteriana em sedimentos de manguezais da Baía de Guanabara (RJ), observaram que a diversidade bacteriana não foi afetada

significativamente por diferentes níveis de poluição por hidrocarbonetos, apesar da comunidade ser estruturada de modo diferenciado. Do mesmo modo, Hernandez-Raquet *et al.* (2006) não identificou modificações significativas na diversidade de Alfa e Gammaproteobacteria entre duas áreas contaminadas por hidrocarbonetos.

Segundo Marone *et al.* (2005), em sistemas amplamente dinâmicos como os sistemas estuarinos, onde há a conjugação da influência continental e oceânica, além da presença de ciclos sazonais, a distinção entre mudanças ocasionadas por alterações naturais ou pela influência antrópica pode ser particularmente difícil.

7.3 BIBLIOTECA METAGENÔMICA - *BACTERIA*

O Filo com maior representatividade para o Domínio *Bacteria* foi o Filo Cyanobacteria, com membros majoritariamente pertencentes à Família Bacillariophyta, sendo as sequências recuperadas deste grupo pertencentes ao gene 16S rRNA de cloroplastos. A origem procariótica dos cloroplastos através de relações endossimbióticas é bem documentada. Segundo Giovannoni *et al.* (1988), em estudo sobre as relações evolucionárias entre cianobactérias e cloroplastos, indicam que muitas das diversas formas de cianobactérias divergiram dentro de um curto espaço de distância evolutiva. Ressaltam ainda que cianobactérias e cloroplastos formam não somente um grupo filogeneticamente coerente, mas também que a linhagem de cloroplastos não somente é um grupo irmão das formas de vida livre, mas sim está contido dentro da radiação cianobacteriana. Desse modo, observou-se que os métodos de lise celular utilizados para quebra de células procarióticas e extração do DNA ambiental permitiram a quebra de diatomáceas, facilitando desse modo o seqüenciamento do gene 16S das organelas fotossintéticas das mesmas. Em estudo sobre a dinâmica da estrutura procariótica em um estuário do Pacífico, Bernhard *et al.* (2005) observaram, do mesmo modo, dominância de membros

de Cyanobacteria e genes de cloroplastos, em especial nas áreas com maior influência oceânica.

O segundo Filo com maior representação nas amostras da Baía das Laranjeiras, *Proteobacteria*, parece exercer um papel importante nos ciclos do nitrogênio, fósforo e enxofre, assim como na fixação de nitrogênio, na solubilização do fosfato e na redução do enxofre (HOLGUIN *et al.*, 2001; KERSTERS *et al.*, 2006). O Filo *Proteobacteria* representa, atualmente, a maior e fenotipicamente mais diversa linhagem filogenética (KERSTERS *et al.*, 2006). Estudos como o de LIAO *et al.* (2007), indicam o Filo *Proteobacteria* como o mais abundante em sedimentos de manguezal em Taiwan. Liang *et al.* (2007) identificaram como majoritário o Filo *Proteobacteria* em manguezais da China. Do mesmo modo, Cury (2006) identificou o Filo *Proteobacteria* como dominante em sedimentos de manguezais do Estado de São Paulo.

No presente estudo foram identificados organismos pertencentes, entre outros, à Classe Deltaproteobacteria. Considerando-se seu estilo de vida e morfologia, a Classe δ é considerada uma das mais peculiares. Nas amostras de sedimento da Baía de Laranjeiras foram recuperadas sequências da Ordem Myxococcales, com um alto índice de identidade. O grupo *Mixobacteria* é constituído por organismos estritamente anaeróbicos, quimio-organotróficos, que sob condições de *stress* nutritivo formam corpos de frutificação multicelulares e macroscópicos (KERSTERS *et al.*, 2006). As *Mixobacterias* podem ocorrer em vários habitats, como solos, e principalmente em materiais orgânicos em decomposição, como dejetos de animais herbívoros, madeira podre, e em cascas de árvores vivas e mortas. Este grupo obtém seus nutrientes principalmente através da lise de outros procaríotos. As *Mixobacterias* frutificadoras apresentam o padrão mais complexo de comportamento e de ciclos de vida de todos os procaríotos conhecidos até hoje, como consumo coletivo de alimento, motilidade coletiva e desenvolvimento social (KERSTERS *et al.*, 2006). Outra Ordem observada dentro da Classe δ é *Desulfobacterales*, relativa ao grupo com membros com propriedades fenotípicas de dissolução ou redução do sulfato. Organismos redutores de sulfato do Filo *Proteobacteria* estão amplamente disseminados em ambientes aquáticos e ambientes terrestres úmidos que se tornam

anóxicos como resultado da decomposição microbiana, sendo partes essenciais do ciclo do enxofre (KERSTERS *et al.*, 2006). O Gênero Desulfonema, encontrado na presente pesquisa, pode crescer autotroficamente, utilizando-se do gás hidrogênio como doador de elétrons e do CO₂ como fonte de carbono (KERSTERS *et al.*, 2006). Nos sedimentos de manguezais, a disponibilidade do ferro e do fósforo pode ser dependente da atividade das bactérias redutoras de sulfato. Sob condições anaeróbicas, o fosfato dissolvido reage com o oxihidróxido de ferro, criando um complexo insolúvel FeOOH-PO₄ (HOLGUIN, *et al.*, 2001). Nos ambientes de manguezal, usualmente os fosfatos precipitam devido à abundância de cátions na água intersticial dos sedimentos, tornando o fósforo amplamente indisponível para as plantas. Bactérias solubilizadoras de fosfato podem, nesse caso, servir como fontes de formas solúveis de fósforo. As condições geralmente anóxicas dos sedimentos abaixo da zona aeróbica tendem a favorecer a dissolução de fosfatos não solúveis através da produção de sulfeto (HOLGUIN, *et al.*, 2001).

Assim como no presente trabalho, a presença do Filo Bacteroidetes foi observada por Bernhard *et al.* (2005) em estudo sobre a diversidade procariótica em estuário do Pacífico, estando este Filo relacionado à entrada de água doce no sistema. Zhang *et al.* (2009) reporta a presença - e até mesmo co-dominância - de Bacteroidetes em sedimentos de manguezal da China.

O presente trabalho indica que as técnicas moleculares são particularmente úteis na busca pelo conhecimento da estrutura das comunidades procarióticas e suas inter-relações com o ambiente. Segundo Holguin *et al.* (2001), estudos indicam que a estrutura e função microbiana dos ecossistemas de manguezais são diretamente responsáveis pelo funcionamento “saudável” dos mesmos. Organismos de nível trófico mais elevado podem ser severamente afetados se a estrutura e função microbianas forem perturbadas e destruídas.

7.4 BIBLIOTECA METAGENÔMICA - *ARCHAEA*

Como a grande maioria dos clones obtidos de *Archaea* não mostrou nenhuma afiliação com qualquer arqueia já cultivada, a relação dos mesmos com propriedades fenotípicas torna-se difícil, assim como a definição de seu papel ecológico dentro dos ecossistemas de manguezais. Segundo DeLong (2003), apesar do fato de que as informações sobre arqueias cultivadas estejam em franca expansão, apenas uma pequena fração da diversidade natural deste grupo é atualmente representada em coleções de cultivo.

A grande abundância do Filo Crenarchaeota em ambientes costeiros e oceânicos foi documentada em estudos anteriores. Em estudo sobre diversidade de *Archaea* em sedimentos estuarinos de Portugal, Abreu *et al.* (2001) observaram, do mesmo modo, uma maior proporção de membros deste Filo. Estimativas por contagem de células indicam que Crenarchaeotas planctônicas representam uma ampla fração da biomassa microbiana total dos oceanos globais, contabilizando aproximadamente 20% das células procarióticas destes ambientes (DELONG, 2003). Novos membros do Filo Crenarchaeota foram descobertos em habitats não-termofílicos globalmente distribuídos, porém suas propriedades fisiológicas e papéis ecológicos permanecem desconhecidos (ABREU *et al.*, 2001).

Dentro do Filo Crenarchaeota e da Classe Thermoprotei (de maior representatividade na presente pesquisa), os membros da Ordem Thermoproteales foram descritos como sendo bacilos termófilos e hipertermófilos, sendo anaeróbicos ou aeróbicos facultativos. Embora ainda seja encontrada a expressão “dependentes de enxofre” para este grupo, diversos membros podem substituir o enxofre por vários outros compostos orgânicos e inorgânicos, tendo sido relatados membros com crescimento inibido pela presença de enxofre (KERSTERS *et al.*, 2006). Podem desempenhar o papel de produtores primários ou consumidores de matéria orgânica. Como produtores primários, podem utilizar oxigênio, enxofre elementar, sulfato, tiosulfato, sulfito e nitrato como aceptores de elétrons, e hidrogênio molecular como doador de elétrons (KERSTERS *et al.*, 2006). A

Ordem Desulfurococcales possui membros hipertermófilos, com temperaturas ótimas de crescimento entre 85°C e 106°C, podendo crescer anaerobicamente, facultativamente anaerobicamente ou aerobicamente. Em condições autotróficas podem realizar a oxidação do hidrogênio utilizando enxofre elementar, tiosulfato, nitrato ou nitrito como aceptor de elétrons, e CO₂ como fonte de carbono (KERSTERS *et al.*, 2006).

Dentro do Filo Euryarchaeota, foram identificados possíveis metanogênicos da Ordem Methanobacteriales. Segundo Kersters *et al.*, (2006), membros da Ordem Methanobacteriales podem ser distinguidos de outros metanogênicos por sua limitada gama de substratos catabólicos, morfologia, composição lipídica e sequência de rRNA, sendo geralmente hidrogenotróficos, utilizando H₂ para reduzir CO₂ a metano. Saia *et al.* (2009) em estudo sobre a ocorrência de arqueias metanogênicas em sedimentos do altamente antropizado estuário Santos-São Vicente, relatou a presença das Famílias Methanosarcinaceae e Methanobacteriaceae. As duas famílias foram observadas no presente estudo, embora com baixas porcentagens de identidade. A Família Methanosarcinaceae foi observada apenas nos sedimentos da Baía das Laranjeiras, enquanto a Família Methanobacteriaceae foi encontrada nas duas regiões amostradas. Os membros destas Famílias estão amplamente distribuídos em diversos habitats anaeróbicos, indicando sua potencial participação na produção global de metano (SAIA *et al.*, 2009). Entretanto, para que possa ser feita uma comparação entre os dados obtidos na presente pesquisa e as informações de Saia *et. al.* (2009) serão necessárias pesquisas mais detalhadas.

Como demonstrado pelas análises filogenéticas, a maior proporção dos clones está relacionada à sequências obtidas em ambientes costeiros, principalmente estuarinos, mas também oceânicos, indicando a atuação de vetores de dispersão sobre os organismos encontrados.

7.5 A DIVERSIDADE PROCARIÓTICA COMO FERRAMENTA PARA CONSERVAÇÃO

As técnicas moleculares podem e devem ser utilizadas como ferramentas essenciais não só na compreensão dos fluxos de energia e matéria nos ecossistemas de manguezal, mas também para conhecimento da importância e diversidade do compartimento procariótico dos mesmos, como base para ações conservacionistas. Enquanto a maior parte da mídia, das instituições públicas e das organizações civis volta sua atenção à periculosidade da extinção de espécies de grande porte, cada vez mais a comunidade científica demonstra a importância do compartimento procariótico para os mais diversos ecossistemas do planeta. A perda da diversidade surge no começo do século XXI como um dos maiores desafios da humanidade. Segundo o secretário da Convenção sobre a Diversidade Biológica da ONU, Oliver Hillel, até 2030 cerca de 75% das espécies animais e vegetais podem estar ameaçadas de extinção. Neste panorama de iminência de grandes mudanças ecológicas e climáticas, o conhecimento tanto acerca da diversidade procariótica quanto de seu papel na funcionabilidade dos ecossistemas e regulação dos padrões climáticos permanece a ser explorado. Não há estimativas seguras do quanto a diversidade procariótica, tanto presente em manguezais quanto em qualquer outro ecossistema, tenha sido alterada ao longo das décadas, já que estudos anteriores sobre estas comunidades foram durante muito tempo dependentes de cultivo, mascarando assim a maior parcela da diversidade neles contida. Sugere-se uma ampla investigação da resposta dos organismos procarióticos aos distúrbios antrópicos, utilizando-se técnicas moleculares, tanto em manguezais quanto em outros ecossistemas, assim como uma conscientização, em vários níveis da sociedade, sobre a importância dos mesmos para a saúde do planeta.

8. CONCLUSÕES

- Foram observadas diferenças significativas entre as amostras de sedimento da Baía das Laranjeiras e de Paranaguá para os seguintes parâmetros: concentração de carbonato de cálcio, fosfato e matéria orgânica, abundância de *E. coli* e coliformes totais, assim como diferenças nos indicativos de contaminantes por hidrocarbonetos;
- As influências antrópicas verificadas na Baía de Paranaguá não são suficientes para gerar alterações na diversidade procariótica, detectáveis pela resolução da técnica ARDRA, utilizando-se a enzima *Hinfl*.
- A maior parte das sequências recuperadas dos sedimentos de manguezal amostrados, tanto para *Archaea* quanto para *Bacteria*, está relacionada com sequências de organismos pertencentes a regiões costeiras e oceânicas.
- O presente trabalho indica que as técnicas moleculares são particularmente úteis na busca pelo conhecimento da estrutura das comunidades procarióticas e suas inter-relações com o ambiente.

9 REFERÊNCIAS

- ABREU, C.; JURGENS, G.; MARCO, P.; SAANO, A.; BORDALO, A. A. Crenarchaeota and Euryarchaeota in temperate estuarine sediments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 713-718, 2001.
- AHMAD, N.; JOHRI, S.; ABDIN, M. Z.; QAZI, G. N. Molecular characterization of bacterial population in the forest soil of Kashmir, India. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 25, p.107–113, 2009.
- ALBAGLI, S. Da biodiversidade à biotecnologia: A nova fronteira da informação. **Ciência da Informação**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 7-10, 1998.
- ALLERS, T.; MEVARECH, M. Archaeal genetics: The third way. **Nature Reviews**, v.6., p. 58-73, 2005.
- ALONGI, D. M. Bacterial Productivity and Microbial Biomass in Tropical Mangrove Sediments. **Microbial Ecology**, v. 15, p.59-79, 1988.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 1, p. 143–169, 1995.
- BARNS, S. M.; FUNDYGA, R. E.; JEFFRIES, M. W.; PACE, N. R. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. **Proceedings of the National Academy of Science.**, v. 91, p. 1609-1613, 1994.
- BARNS, S.M.; CAIN, E.C.; SOMMERVILLE, L.; KUSKE, C.R. *Acidobacteria* phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, n.9, p.3113-6, 2007.
- BERNHARD, A. E.; COLBERT, D.; MCMANUS, J.; FIELD, K. G. Microbial community dynamics based on 16S rRNA gene profiles in a Pacific Northwest estuary and its tributaries. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 52, p. 115–128, 2005.

- BIGARELLA, J. J. Contribuição ao Estudo da Planície Litorânea do Estado do Paraná. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Jubilee Volume (1946-2001), p. 65 - 110, 2001.
- BHARATHKUMAR, S.; RAMESHKUMAR, N.; PAUL, D.; PRABAVATHY, V. R.; NAIR, S. Characterization of the predominant bacterial population of different mangrove rhizosphere soils using 16S Rna gene-based single-strand conformation polymorphism (SSCP). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, no prelo. DOI 10.1007/s11274-007-9487-3
- BJØRNSSEN, P. K.; KUPARINEN, A. 1991. Determination of bacterioplankton biomass, net production and growth efficiency in the southern ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 71: 185-194. *In* Delile, D. ; Fiala, M. & Razouls. S. 1996. Seasonal changes in bacterial and phytoplankton biomass in a subantarctic coastal area (Kerguelen Islands). **Hydrobiologia**, Hague, v. 330, p. 143-150.
- BRADFORD, M.A.; JONES, T. H.; BARDGETT, R. D.; BLACK, H. I. J.; BOAG, B.; BONKOWSKI, M.; COOK, R.; EGGERS, T.; GANGE, A. C.; GRAYSTON, S. J.; KANDELER, E.; MCCAIG, A. E.; NEWINGTON, J. E.; PROSSER, J. I.; SETÄLÄ, H.; STADDON, P. L.; TORDOFF, G. M.; TSCHERKO, D.; LAWTON, J. H. Impacts of soil faunal community composition on model grassland ecosystems. **Science**, v. 298, p. 615-618, 2002
- BRITO, E. M. S.; GUYONEAUD, R.; GOÑI-URRIZA, M.; RANCHOU-PEYRUSE, A.; VERBAERE, A.; CRAPEZ, M. A. C.; WASSERMAN, J. C. A.; DURAN, R. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. **Research em Micorbiology**, v. 157, p. 752–762, 2006.
- CAMARGO, M. G. (1999). **SysGran para Windows: Sistema de análises granulométricas**. Pontal do Sul. [mcamargo@cem.ufpr.br].
- COENYE, T.; VANDAMME, P. Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 228, p. 45-40, 2003.
- COLE, J. R.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; WANG, Q.; KULAM, S. A.; MCGARRELL, D. M.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 294–296, 2005.

- CURY, J. C. **Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado por petróleo.** 95p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- CURY, J. C. **Diversidade de Bacteria e Archaea em solos de mangue e marisma.** 148 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- DAS, S.; LYLA, P. S.; KHAN, S. A. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. **Current Science**, v. 90, n. 10, 2006.
- DeLONG, E. F. Oceans of *Archaea*. **American Society for Microbiology News**, v. 69, n.10, p.503-511. 2003.
- DeLONG, E.; KARL, D.; ROCAP, G. **Microbial oceanography: challenges and opportunities.** Agouron Institute, University of Hawaii: Brooks Bays, 2007.
- EATON, A. D.; Clesceri, L. S.; GREENBERG, A. E. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 19th ed. American Public Health Association, Washington, D.C. 870p, 1995.
- FILIPPELLI, G. M. The global phosphorus cycle: Past, present, and future. **Elements**, v. 4, p. 89-95, 2008.
- FOLK, R. L.; WARD, W. C. Brazos river bar: a study in the significance of grain size parameters. **Journal of Sedimentary Petrology**, v. 27, p 3-26, 1957.
- FUNPAR. **Estudo de Impacto Ambiental (EIA) de uma Usina Termelétrica na Baía de Paranaguá e do Porto de Desembarque, Subestação e Linha de Transmissão associados.** v. 2, Curitiba, 1997.
- GARRITY, G. M.; LILBURN, T. G.; COLE, J. R.; HARRISON, S. H.; EUZEBY, J.; TINDALL, B. J. **The Taxonomic Outline of *Bacteria* and *Archaea*.** TOBA Release 7.7, Michigan State University Board of Trustees, 2007. [<http://www.taxonomicoutline.org/>]
- GIOVANNONI, S. J.; TURNER, S.; OLSEN, G. R. J.; BARNES, S.; LANE, D. J.; PACE, N. R. Evolutionary Relationships among Cyanobacteria and Green Chloroplasts. **Journal Of Bacteriology**. v. 170, n. 8, p. 3584-3592, 1988.

- GOMES, N. C. M.; BORGES, L. R.; PARANHOS, R.; PINTO, F. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S.; SMALLA, K. Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forests. **FEMS Microbiology Ecology**. p.1–14, 2008. DOI:10.1111/j.1574-6941.2008.00519.x
- GRASSHOFF, K.; EHRHARDT, M.; KREMLING, K. (eds). **Methods of Seawater Analysis**. 2nd, Verlag Chemie, Weinheim, p. 419, 1999.
- GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWOTIN, R. C. GELBART, W. M.; SUZUKI, D. T. MILLER, J. H. **Introdução à genética**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 743p., 2006.
- HARRIS, J.K.S.; KELLEY, T.; PACE, N. R. New Perspective on Uncultured Bacterial Phylogenetic Division OP11. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p.845-9, 2004.
- HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal rna analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, v. 35, p.1–21, 1998.
- HERNANDEZ-RAQUET, G.; BUDZINSKI, H.; CAUMETTE, P.; DABERT, P.; MENACH, K. L.; MUYZER, G.; DURAN, R. Molecular diversity studies of bacterial communities of oil polluted microbial mats from the Etang de Berre (France). **FEMS Microbiology Ecology**. v. 58, p. 550–562, 2006.
- HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and Fertility of Soils**, v.33, p. 265-278, 2001.
- HORNER-DEVINE, M. C.; CARNEY, K. M.; BOHANNAN, B. J. M. An ecological perspective on bacterial biodiversity. **Proceedings of the Royal Society of London**, v.271-B, p. 113–122, 2004.
- HUGHES, J. B.; HELLMANN, J. J.; RICKETTS, T. H.; BOHANNAN, B. J. M. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4399–4406, 2001.

- HUNTER-CEVERA, J.; KARL, D.; BUCKLEY, M. Marine microbial diversity: the key to earth's habitability. **American academy of microbiology**. 22p, 2005. <http://www.asm.org>. Acesso em: 01.mai.2008.
- JAIN, R. K.; KAPUR, M.; LABANA, S.; LAL, B.; SARMA, P. M.; BHATTACHARYA, D.; THAKUR, S. I. Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. **Current Science**, v. 89, n. 1, 2005.
- KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. Biology of Mangroves and Mangrove Ecosystems. **Advances in Marine Biology**, v. 40, p. 81-251, 2001.
- KERSTERS, K.; VOS, P.; GILLIS, M.; SWINGS, J.; VANDAMME, P.; STACKEBRANDT, E. Introduction to the Proteobacteria. In.: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K-S.; STACKEBRANDT, E. **Prokaryotes**. Stanford: Springer, 2006, v. 5, p3–37.
- KOLM, H.E; SCHOENENBERGER, M.F.; PIEMONTE, M. R.; SOUZA, P.S.A.; SCÜHLI, G.S.; MUCCIATTO, M.B.; MAZZUCO, R. Spatial variation of bacteria in surface waters of Paranaguá and Antonina Bays, Paraná, Brazil. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 45, n. 1, p. 27 - 34, 2002.
- KREADER, C. A. Relief of amplification inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1102–1106, 1996.
- KRUG, L. A.; LEÃO, C.; AMARAL, S. Dinâmica espaço-temporal de manguezais no Complexo Estuarino de Paranaguá e relação entre decréscimo de áreas de manguezal e dados sócio-econômicos da região urbana do município de Paranaguá – Paraná. **Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, Florianópolis, Brasil, 21-26 abril 2007, INPE, p. 2753-2760.
- LANA, P. C. (1998). Manguezais: diagnóstico, conflitos e prognósticos. In: LIMA, R. E.; NEGRELLE, R. R. B. (orgs.). **Meio ambiente e desenvolvimento no litoral do Paraná. Diagnóstico**. Curitiba: Editora da UFPR. p. 105-115.
- LANA, P. C.; MARONE, E.; LOPES, R. M.; MACHADO, E. C. The Subtropical Estuarine Complex of Paranaguá Bay, Brazil. In SEELIGER, U. & KJERFVE, B. (Eds) **Coastal Marine Ecosystems of Latin América**. Ecological Studies, v.144. Springer-Verlag, Berlin, 2001.

- LIANG, J-B.; CHEN, Y-Q.; LAN, C-Y.; TAM, N. F. Y.; ZAN, Q-J.; HUANG, L-N. Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment. **Marine Biology**, v. 150, p.739–747, 2007.
- LIAO, P-C.; HUANG, B-H.; HUANG, S. Microbial Community Composition of the Danshui River Estuary of Northern Taiwan and the Practicality of the Phylogenetic Method in Microbial Barcoding. **Microbial Ecology**. v. 54, p. 497–507, 2007.
- LIU, R.; ZHANG, Y.; DING, R.; LI, D.; GAO, Y.; YANG, M. Comparison of archaeal and bacterial community structures in heavily oil-contaminated and pristine soils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.108, n. 5, p. 400–407, 2009
- LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K-H.; WHITMAN, W.B. **Revised Road Map to the Phylum Firmicutes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. v. 3. Springer-Verlag, New York, 2008.
- MARONE, E.; D. JAMIYANAA. Tidal characteristics and a numerical model for the M2 tide at the Estuarine Complex of Paranaguá Bay, Paraná, Brazil. **Neritica**, Pontal do Paraná, v. 11, p. 95-107, 1997.
- MARONE, E.; MACHADO, E. C.; RUBENS M. LOPES, R. M.; SILVA, E. T. Land-ocean fluxes in the Paranaguá Bay estuarine system, southern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**. v.53, n.3-4, 2005.
- MOYER, C. L.; TIEDJE, J. M.; DOBBS, F. C.; KARL, D. M. Diversity of deep-sea hydrothermal vent *Archaea* from Loihi Seamount, Hawaii. **Deep-Sea Research II**, v. 45, p. 303-317, 1998.
- MUNSON, M. A.; NEDWELL, D. B.; EMBLEY, T. M. Phylogenetic Diversity of *Archaea* in Sediment Samples from a Coastal Salt Marsh. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n.12, p. 4729–4733, 1997.
- NIMAD. Interações entre os processos produtivos, meio ambiente e qualidade de vida na região da baía de Paranaguá e região metropolitana de Curitiba – geração de propostas de desenvolvimento. **NIMAD**, Núcleo Interdisciplinar de Meio Ambiente e Desenvolvimento – UFPR, 1994.

- PETERS, K. E.; WALTERS, C. C.; MOLDOWAN, J. M. **The Biomarker Guide: Biomarkers and isotopes in petroleum exploration and Earth history**, vol. 2. 2^a ed. Cambridge. Cambridge University Press, 2005.
- PIZA, F.F.; PRADO, P. I.; MANFIO, G.P. Investigation of bacterial diversity in Brazilian tropical estuarine sediments reveals high actinobacterial diversity. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, p. 317–328, 2004.
- RIVERA-MONROY, V. H.; TWILLEY, R. R.; BOUSTANY, R. G.; DAY, J. W.; VERA-HERRERA, F.; RAMIREZ, M. C. Direct denitrification in mangrove sediments in Terminos Lagoon, Mexico. **Marine Ecology Progress Series**. v.12, p.97-109, 1995.
- ROBE, P.; NALIN, R.; CAPELLANO, C.; VOGEL, T. M.; SIMONET, P. Extraction of DNA from soil. **European Journal of Soil Biology**, v. 39, p. 183-190, 2003.
- ROBERTSON, C. E.; HARRIS, J. K.; SPEAR, J. R.; PACE, N. R. Phylogenetic diversity and ecology of environmental *Archaea*. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p. 638–642, 2005.
- SAIA, F.; DOMINGUES, M.; PELLIZARI, V.; VAZOLLER, R. Occurrence of Methanogenic *Archaea* in Highly Polluted Sediments of Tropical Santos–São Vicente Estuary (São Paulo, Brazil). **Current Opinion in Microbiology**, DOI 10.1007/s00284-009-9503-y.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F; MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning. **A laboratory guide**. Cold Spring Harbor Laboratories Press, New York. pp. 7.26-7.29.
- SANGWAN, P.; CHEN, X.; HUGENHOLTZ, P.; JANSSEN, P.H. *Chthoniobacter flavus* gen. nov., sp. nov., the first pure-culture representative of subdivision two, *Spartobacteria* classis nov., of the phylum *Verrucomicrobia*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n.10, p.5875-81, 2004.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceeding of the National Academy of Science**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

- SANTOS, P. R. N. de M. **Variação espaço-temporal do bacterioplâncton e espacial do bacteriobentos da baía de Guaratuba, Paraná, Brasil.** Curitiba, 2003. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Setor de Ciências Agrárias – Universidade Federal do Paraná.
- SAPP, J. Two faces of the prokaryote concept. **International Microbiology**, v. 9, p.163-172, 2006.
- SCHLEPER, C. JURGENST, G. JONUSCHEIT, M. Genomic studies of uncultivated archaea. **Nature Reviews**, v. 3, p. 479-488, 2005.
- SCHOENENBERGER, M.F.B. **Variação espacial e temporal de bactérias em águas de superfície das baías das Laranjeiras e Guaraqueçaba, Paraná, Brasil.** Curitiba, 1998.58p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas – Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.
- SEELIGER, U; KJERFVE, B. **Coastal Marine Ecosystems of Latin America.** Berlin: Springer-Verlag, 2001, 243p.
- SMITH, J. J. **Microbial diversity and gene mining in Antarctic Dry Valley mineral soils.** 158 p. Dissertação (Doutorado em Filosofia). Bellville, 2006, University of the Western Cape.
- SUGUIO, K. (1973). **Introdução à sedimentologia.** São Paulo: Edgard Blücher: EDUSP.
- SUZUKI, M. T.; GIOVANNONI, S. J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 625–630, 1996.
- TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F. L. High Diversity in DNA of Soil Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 782-787, 1990.
- VAN de PEER, Y.; CHAPPELLE, S.; WACHTER, R. D. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 17, p. 3381-3391, 1996.

- VETRIANI, C.; REYSENBACH, A-L.; DORE, J. Recovery and phylogenetic analysis of archaeal rRNA sequences from continental shelf sediments. **FEMS Microbiology Letters**, v. 161, p. 83-88, 1998.
- VOLKMAN, J. K.; HOLDSWORTH, G. D.; NEILL, G. P.; BAVOR, J. H. Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. **Science of the Total Environment**. v. 112, p.203-219, 1992.
- WANG, M. C.; LIU, Y-H.; WANG,Q.; GONG, M.; HUA, X-M.; PANG, Y-J.; HU, S.; YANG, Y-H. Impacts of methamidophos on the biochemical, catabolic, and genetic characteristics of soil microbial communities. **Soil Biology & Biochemistry**,v. 40, p. 778–788, 2008.
- WILMOTTE, A.; HERDMAN, M. **Phylogenetic relationships among the Cyanobacteria based on 16S rRNA sequences**. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2^a Ed, v. 1, p. 487-493. Springer-Verlag, New York, 2001.
- WHEELER, D.L.; CHAPPEY, C.; LASH, A.E.; LEIPE, D.D; MADDEN, T.L.; SCHULER, G.D.; TATUSOVA, T.A.; RAPP, B.A. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research.**, v. 28, n.1, p.10-14, 2000.
- WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, v. 95, p. 6578–6583, 1998.
- WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, v. 74, p. 5088-5090, 1977.
- WOESE, C. R.; KANDLER, O; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Science, USA** , v. 87, p. 4576-4579,1990.
- WOESE, C. R.; WINKERS, S.; GUTELL, R. R. Architecture of ribosomal RNA: Constraints on the sequence of "tetra-loops". **Proceedings of the National Academy of Science, USA**. v. 87, p. 8467-8471, 1990.

- ZHANG, Y.; DONG, J.; YANG, B.; LING, J.; WANG, Y.; ZHANG, S. Bacterial community structure of mangrove sediments in relation to environmental variables accessed by 16S rRNA gene-denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting. **Scientia Marina**, v. 73, n.3, p. 487-498, 2009.
- ZENG, Y.; LI, H.; JIAO, N. Phylogenetic diversity of planktonic archaea in the estuarine region of East China Sea. **Microbiological Research**, v. 162, p. 26-36, 2007.
- ZHOU, J.; XIA, B.; TREVES, D. S.; WU, L-Y.; MARSH,, T. L.; O'NEILL, R. V.; PALUMBO,A. V.; TIEDJE, J. M. Spatial and Resource Factors Influencing High Microbial Diversity in Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n.1, p. 326–334, 2002.

10 ANEXOS

LISTA DE TABELAS - ANEXOS

TABELA 1	CORRESPONDÊNCIA DAS SEQUÊNCIAS DE <i>BACTERIA</i> COM O BANCO DE DADOS NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION).....	82
TABELA 2	CORRESPONDÊNCIA DAS SEQUÊNCIAS DE <i>BACTERIA</i> COM O BANCO DE DADOS RDP (RIBOSOMAL DATABASE PROJECT) – <i>CLASSIFIER</i>	84
TABELA 3	CORRESPONDÊNCIA DAS SEQUÊNCIAS DE <i>ARCHAEA</i> COM O BANCO DE DADOS NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION).....	86
TABELA 4	CORRESPONDÊNCIA DAS SEQUÊNCIAS DE <i>ARCHAEA</i> COM O BANCO DE DADOS RDP (RIBOSOMAL DATABASE PROJECT) – <i>CLASSIFIER</i>	88

TABELA 1. Correspondência das sequências de *Bacteria* com o banco de dados Genbank do National Center for Biotechnology Information.

Seq.	Correspondência com banco Genbank (NCBI)*	Origem	% Sim.
LAR1	Uncultured bacterium (Tet1ect1F3)	Laranja	98
LAR2	Uncultured cyanobacterium (GASP-MA1S1_F07)	Solos cultivados	94
LAR3	Uncultured gamma proteobacterium (MSB-4D7)	Sedimento de manguezal	99
LAR4	Uncultured delta proteobacterium (68 T12d-oil)	Ambiental	95
LAR5	Uncultured bacterium (ANTLV2_F08)	Antártica	83
LAR6	<i>Shewanella</i> sp. (IE9-1)	Antártica	92
LAR7	<i>Maribacter</i> sp. (EM44)	Água do mar	96
LAR8	Uncultured bacterium (N4-30)	Cultivo de camarão	100
LAR9	Uncultured cyanobacterium (sw-xj279)	Sedimentos	95
LAR10	Uncultured bacterium (ANTLV2_F08)	Antártica	96
LAR11	Uncultured bacterium (SGUS1424)	Coral	97
LAR12	Uncultured bacterium (OS25-DNA-48)	Entre-marés	96
LAR13	<i>Fragilaria zeilleri</i> var. <i>elliptica</i> (D48 24) chloroplast.	Lago	93
LAR14	Uncultured cyanobacterium (926-C6)	Esponjas	97
LAR15	Uncultured gamma proteobacterium (MSB-5C2)	Sedimento de manguezal	95
LAR16	Uncultured cyanobacterium (SIMO-1714)	Marisma	97
LAR17	<i>Roseobacter</i> sp. (ARCTIC-P4)	Ártico	93
LAR18	Uncultured cyanobacterium (SIMO-1231)	Marisma	96
LAR19	Uncultured cyanobacterium (SIMO-1231)	Marisma	94
LAR20	Uncultured bacterium (CM111)	Água doce	91
LAR21	Uncultured Desulfobacteraceae bacterium (SIMO-2250)	Marisma	99
LAR22	Uncultured bacterium (F4-4)	Cultivo de gastrópode	99
LAR23	<i>Synedra fragilaroides</i> isolate (C43) chloroplast.	Diatomáceas	99
LAR24	Uncultured bacterium (ANTLV2_F08)	Antártica	98
LAR25	<i>Synedra fragilaroides</i> isolate (C43) chloroplast.	Diatomáceas	99
LAR26	Unidentified bacterium (K2-S-25)	Hawaii	97

Continuação

Seq.	Correspondência com banco NCBI	Origem	% Sim.
LAR27	Uncultured bacterium (ANTLV2_F08)	Antártica	94
LAR28	Uncultured Bacteroidetes bacterium (SIMO-377)	Marisma	92
LAR29	Uncultured bacterium (Pm_eggs_E06)	Coral	93
LAR30	Uncultured bacterium clone sed_red_(Rung8)	Sedimento costeiro	96
LAR31	Uncultured bacterium clone (F02P2MbD)	Coral	93
LAR32	<i>Synedra fragilaroides</i> isolate (C43) chloroplast.	Diatomáceas	99
LAR33	Uncultured Lewinella sp.	Sedimento oceano profundo	89
LAR34	Uncultured bacterium (OS25-CYA-15)	Entre-marés	98
LAR35	Uncultured bacterium (ANTLV2_F08)	Antártica	95
LAR36	Uncultured bacterium (300c2)	Sedimento costeiro	89

* Sequências que apresentaram o maior *score* e *e-value*.

TABELA 2. Correspondência das sequências de *Bacteria* com o banco de dados RDP (Ribosomal Database Project) - *Classifier*.

Seq.	Correspondência com banco Ribosomal Database Project				
	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
LAR1	Cyanobacteria[100%]	Cyanobacteria[100%]	Chloroplast[100%]	Bacillariophyta[100%]	
LAR2	Cyanobacteria[100%]	Cyanobacteria[100%]	Chloroplast[100%]	Bacillariophyta[100%]	Thioalkalispira[55%]
LAR3	Proteobacteria[98%]	Gammaproteobacteria[94%]	Chromatiales[61%]	Ectothiorhodospiraceae[59%]	
LAR4	Proteobacteria[98%]	Deltaproteobacteria[98%]	Desulfobacterales[98%]	Desulfobacteraceae[98%]	Desulfonema[32%]
LAR5	Cyanobacteria[100%]	Cyanobacteria[100%]	Chloroplast[100%]	Bacillariophyta[100%]	
LAR6	Proteobacteria[100%]	Gammaproteobacteria[100%]	Alteromonadales[100%]	Shewanellaceae[100%]	Shewanella[100%]
LAR7	Bacteroidetes[100%]	Flavobacteria[100%]	Flavobacteriales[100%]	Flavobacteriaceae[100%]	Robiginitalea[94%]
LAR8	Proteobacteria[100%]	Alphaproteobacteria[99%]	Rhodobacterales[65%]	Rhodobacteraceae[65%]	Woodsholea[37%]
LAR9	Cyanobacteria[100%]	Cyanobacteria[100%]	Chloroplast[100%]	Bacillariophyta[100%]	
LAR10	Cyanobacteria[100%]	Cyanobacteria[100%]	Chloroplast[100%]	Bacillariophyta[100%]	
LAR11	Cyanobacteria[100%]	Cyanobacteria[100%]	Chloroplast[100%]	Bacillariophyta[100%]	
LAR12	Cyanobacteria[100%]	Cyanobacteria[100%]	Chloroplast[100%]	Bacillariophyta[100%]	
LAR13	Cyanobacteria[96%]	Cyanobacteria[96%]	Chloroplast[96%]	Bacillariophyta[96%]	
LAR14	Cyanobacteria[100%]	Cyanobacteria[100%]	Chloroplast[100%]	Bacillariophyta[100%]	
LAR15	Proteobacteria[95%]	Gammaproteobacteria[91%]	Oceanospirillales[43%]	Oceanospirillaceae[33%]	Oceanobacter[25%]
LAR16	Cyanobacteria[100%]	Cyanobacteria[100%]	Chloroplast[100%]	Bacillariophyta[100%]	
LAR17	Proteobacteria[100%]	Alphaproteobacteria[100%]	Rhodobacterales[97%]	Rhodobacteraceae[97%]	Roseobacter[22%]
LAR18	Cyanobacteria[100%]	Cyanobacteria[100%]	Chloroplast[100%]	Bacillariophyta[100%]	
LAR19	Cyanobacteria[100%]	Cyanobacteria[100%]	Chloroplast[100%]	Bacillariophyta[100%]	
LAR20	Cyanobacteria[99%]	Cyanobacteria[99%]	Chloroplast[99%]	Bacillariophyta[99%]	
LAR21	Proteobacteria[100%]	Deltaproteobacteria[100%]	Desulfobacterales[100%]	Desulfobulbaceae[98%]	Desulfotalea[38%]
LAR22	Acidobacteria[96%]	Acidobacteria[96%]	Acidobacteriales[96%]	Acidobacteriaceae[96%]	Gp4[96%]
LAR23	Cyanobacteria[100%]	Cyanobacteria[100%]	Chloroplast[100%]	Bacillariophyta[100%]	
LAR24	Cyanobacteria[100%]	Cyanobacteria[100%]	Chloroplast[100%]	Bacillariophyta[100%]	

Seq	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
LAR25	Cyanobacteria[100%]	Cyanobacteria[100%]	Chloroplast[100%]	Bacillariophyta[100%]	
LAR26	Cyanobacteria[100%]	Cyanobacteria[100%]	Family IV[51%]	GpIV[51%]	
LAR27	Cyanobacteria[100%]	Cyanobacteria[100%]	Chloroplast[100%]	Bacillariophyta[100%]	
LAR28	Bacteroidetes[100%]	Sphingobacteria[79%]	Sphingobacteriales[79%]	Saprospiraceae[76%]	Lewinella[29%]
LAR29	Cyanobacteria[54%]	Cyanobacteria[54%]	Chloroplast[54%]	Bacillariophyta[54%]	
LAR30	Proteobacteria[98%]	Gammaproteobacteria[81%]	Chromatiales[42%]	Chromatiaceae[40%]	Thioflavicoccus[14%]
LAR31	Proteobacteria[100%]	Alphaproteobacteria[100%]	Sphingomonadales[97%]	Sphingomonadaceae[97%]	Porphyrobacter[67%]
LAR32	Cyanobacteria[100%]	Cyanobacteria[100%]	Chloroplast[100%]	Bacillariophyta[100%]	
LAR33	Bacteroidetes[72%]	Sphingobacteria[30%]	Sphingobacteriales[30%]	Flammeovirgaceae[21%]	Flammeovirga[21%]
LAR34	Cyanobacteria[98%]	Cyanobacteria[98%]	Family X[47%]	GpX[47%]	
LAR35	Cyanobacteria[100%]	Cyanobacteria[100%]	Chloroplast[100%]	Bacillariophyta[100%]	
LAR36	Proteobacteria[89%]	Deltaproteobacteria[84%]	Myxococcales[67%]	Sorangineae[67%]	Polyangiaceae[67%]
				Espécie	Sorangium[62%]

* Os valores de porcentagem indicam a probabilidade das sequências analisadas pertencerem a cada um dos 5 níveis taxonômicos individualmente.

TABELA 3. Correspondência das sequências de *Archaea* com o banco de dados GenBank do National Center for Biotechnology Information.

Seq.	Correspondência com banco GenBank (NCBI)*	Origem	% Sim.
L1	Uncultured archaeon (Pm_eggsAr_5G9)	Coral	100
L2	Uncultured archaeon (XMA2)	Sedimento de manguezal	96
L3	Uncultured archaeon (XMA31)	Sedimento de manguezal	97
L4	Uncultured archaeon (MD3044E-52)	Sedimento oceano profundo	95
L5	Uncultured eukaryote (ALAS78)	Sedimentos contaminados	99
L6	Uncultured archaeon (ZES-200)	Estuário	90
L7	Uncultured archaeon (SAT_3E7)	Marisma	97
L8	Uncultured archaeon (XM201_78)	Águas costeiras	99
L9	Uncultured archaeon (XMA10)	Sedimento de manguezal	96
L10	Uncultured archaeon (ss062)	Solo salino	97
L11	Uncultured archaeon (SMTZArch9)	Estuário	96
L12	Uncultured archaeon (3A003)	Estuário	96
L13	Uncultured archaeon (SAT_3E10)	Marisma	98
L14	Uncultured archaeon (SAT_3E10)	Marisma	98
L15	Uncultured archaeon (5A080)	Estuário	96
L16	Archaeon enrichment culture (AOM-Clone-F5)	Enriquecimento de metano	97
L17	Uncultured archaeon (25H-200S-15)	Cold Seeps	92
L18	Uncultured archaeon (NM202_95)	Águas Costeiras	97
L19	Uncultured crenarchaeote (sj14)	Sedimento marinho	100
L20	Uncultured archaeon (174A/17-Ar61)	Sedimento marinho	97
L21	Uncultured archaeon (3A046)	Sedimento estuarino	97
L22	Uncultured archaeon (PNG_TB_4B30H1_A002)	Sedimento marinho	87
L23	Uncultured archaeon (XMA55)	Sedimento manguezal	99
L24	Uncultured archaeon (MD3052Z98)	Sedimento oceano profundo	94
L25	Uncultured archaeon (MKCSB-A12)	Sedimento manguezal	99
L26	uncultured archaeon (ss043)	Solo	97
L27	Uncultured archaeon (5H2_F22)	Sedimento oceano profundo	96

L28	Uncultured archaeon (SAT_3E10)	Marisma	98
L29	Uncultured archaeon (XMA2)	Sedimento manguezal	99
P1	Uncultured archaeon (5A045)	Sedimento estuarino	98
P2	Uncultured archaeon (MES-196)	Sedimento estuarino	96
P3	Uncultured archaeon (SAT_3F11)	Marisma	98
P4	Uncultured archaeon (XMA31)	Sedimento manguezal	98
P5	Uncultured archaeon (XMA15)	Sedimento manguezal	98
P6	Uncultured archaeon (HS373A4)	Sedimentos marinhos	96
P7	Uncultured archaeon (ARC-U3SP-15)	Marisma	96
P8	Uncultured archaeon (Hados.Sedi.Arch.2)	Lago	98
P9	Uncultured archaeon (MD3057K-12)	Sedimento marinho	98
P10	Uncultured archaeon (XMA2)	Sedimento manguezal	98
P11	Uncultured archaeon (SAT_10H3)	Marisma	98
P12	Uncultured archaeon (XMA21)	Sedimento manguezal	99
P13	Uncultured archaeon (MKCSM-A6)	Sedimento manguezal	96
P14	Uncultured archaeon (3A066)	Sedimento estuarino	99
P15	Uncultured archaeon (SAT_3H6)	Marisma	99
P16	Uncultured marine archaeon (Rs-Fg3-Arch43)	Coral	99

* Sequências que apresentaram o maior *score* e *e-value*.

TABELA 4. Correspondência das sequências de *Archaea* com o banco de dados RDP (Ribosomal Database Project) – *Classifier*.

Correspondência com banco Ribosomal Database Project					
Seq	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
L1	Euryarchaeota[70%]	Methanococci[18%]	Methanococcales[18%]	Methanocaldococcaceae[11%]	Methanotorris[11%]
L2	Crenarchaeota[72%]	Thermoprotei[72%]	Desulfurococcales[51%]	Desulfurococcaceae[50%]	Thermodiscus[40%]
L3	Crenarchaeota[78%]	Thermoprotei[78%]	Desulfurococcales[44%]	Desulfurococcaceae[42%]	Thermodiscus[33%]
L4	Crenarchaeota[67%]	Thermoprotei[67%]	Desulfurococcales[33%]	Desulfurococcaceae[26%]	Thermodiscus[11%]
L5	Crenarchaeota[66%]	Thermoprotei[66%]	Desulfurococcales[35%]	Desulfurococcaceae[35%]	Thermodiscus[35%]
L6	Euryarchaeota[76%]	Methanococci[37%]	Methanococcales[37%]	Methanocaldococcaceae[37%]	Methanotorris[21%]
L7	Crenarchaeota[89%]	Thermoprotei[89%]	Desulfurococcales[46%]	Desulfurococcaceae[45%]	Thermodiscus[19%]
L8	Euryarchaeota[77%]	Methanococci[19%]	Methanococcales[19%]	Methanocaldococcaceae[10%]	Methanotorris[7%]
L9	Euryarchaeota[98%]	Thermoplasmata[44%]	Thermoplasmatales[44%]	Ferroplasmataceae[23%]	Ferroplasma[23%]
L10	Euryarchaeota[41%]	Methanococci[28%]	Methanococcales[28%]	Methanococcaceae[21%]	Methanothermococcus[21%]
L11	Crenarchaeota[89%]	Thermoprotei[89%]	Desulfurococcales[65%]	Pyrodictiaceae[23%]	Hyperthermus[19%]
L12	Crenarchaeota[46%]	Thermoprotei[46%]	Thermoproteales[43%]	Thermoproteaceae[43%]	Thermocladium[39%]
L13	Euryarchaeota[34%]	Methanococci[28%]	Methanococcales[28%]	Methanococcaceae[23%]	Methanothermococcus[23%]
L14	Crenarchaeota[66%]	Thermoprotei[66%]	Desulfurococcales[38%]	Desulfurococcaceae[38%]	Thermodiscus[27%]
L15	Crenarchaeota[88%]	Thermoprotei[88%]	Thermoproteales[54%]	Thermoproteaceae[42%]	Thermocladium[29%]
L16	Euryarchaeota[98%]	Methanomicrobia[63%]	Methanosarcinales[54%]	Methanosarcinaceae[54%]	Methanomethylovorans[41%]
L17	Euryarchaeota[30%]	Thermoplasmata[10%]	Thermoplasmatales[10%]	Ferroplasmataceae[9%]	Ferroplasma[9%]
L18	Euryarchaeota[100%]	Methanomicrobia[56%]	Methanosarcinales[50%]	Methanosarcinaceae[45%]	Methanomethylovorans[34%]
L19	Euryarchaeota[67%]	Methanococci[31%]	Methanococcales[31%]	Methanocaldococcaceae[23%]	Methanotorris[20%]
L20	Crenarchaeota[52%]	Thermoprotei[52%]	Caldisphaerales[20%]	Caldisphaeraceae[20%]	Caldisphaera[20%]
L21	Euryarchaeota[73%]	Methanococci[53%]	Methanococcales[53%]	Methanococcaceae[31%]	Methanothermococcus[31%]
L22	Euryarchaeota[31%]	Methanobacteria[11%]	Methanobacteriales[11%]	Methanobacteriaceae[11%]	Methanosphaera[10%]
L23	Crenarchaeota[79%]	Thermoprotei[79%]	Thermoproteales[42%]	Thermoproteaceae[33%]	Thermocladium[31%]

Seq	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
L24	Euryarchaeota[68%]	Methanococci[42%]	Methanococcales[42%]	Methanocaldococcaceae[25%]	Methanotorris[20%]
L25	Crenarchaeota[91%]	Thermoprotei[91%]	Desulfurococcales[62%]	Desulfurococcaceae[52%]	Ignisphaera[31%]
L26	Euryarchaeota[70%]	Methanobacteria[18%]	Methanobacteriales[18%]	Methanobacteriaceae[18%]	Methanothermobacter[14%]
L27	Crenarchaeota[67%]	Thermoprotei[67%]	Thermoproteales[49%]	Thermoproteaceae[42%]	Thermocladium[42%]
L28	Euryarchaeota[53%]	Methanococci[45%]	Methanococcales[45%]	Methanococcaceae[25%]	Methanothermococcus[25%]
L29	Crenarchaeota[85%]	Thermoprotei[85%]	Desulfurococcales[79%]	Desulfurococcaceae[79%]	Thermodiscus[66%]
P1	Crenarchaeota[33%]	Thermoprotei[33%]	Thermoproteales[31%]	Thermoproteaceae[25%]	Thermocladium[23%]
P2	Crenarchaeota[68%]	Thermoprotei[68%]	Sulfolobales[22%]	Sulfolobaceae[22%]	Stygiolobus[6%]
P3	Crenarchaeota[67%]	Thermoprotei[67%]	Desulfurococcales[47%]	Desulfurococcaceae[47%]	Thermodiscus[26%]
P4	Crenarchaeota[64%]	Thermoprotei[64%]	Desulfurococcales[40%]	Desulfurococcaceae[39%]	Thermodiscus[17%]
P5	Crenarchaeota[57%]	Thermoprotei[57%]	Thermoproteales[28%]	Thermofilaceae[13%]	Thermofilum[13%]
P6	Euryarchaeota[58%]	Methanococci[54%]	Methanococcales[54%]	Methanococcaceae[38%]	Methanothermococcus[38%]
P7	Crenarchaeota[82%]	Thermoprotei[82%]	Desulfurococcales[45%]	Desulfurococcaceae[43%]	Ignisphaera[30%]
P8	Euryarchaeota[61%]	Methanococci[45%]	Methanococcales[45%]	Methanococcaceae[34%]	Methanothermococcus[34%]
P9	Crenarchaeota[46%]	Thermoprotei[46%]	Thermoproteales[26%]	Thermoproteaceae[26%]	Thermocladium[26%]
P10	Crenarchaeota[60%]	Thermoprotei[60%]	Desulfurococcales[50%]	Desulfurococcaceae[48%]	Thermodiscus[43%]
P11	Euryarchaeota[67%]	Methanococci[24%]	Methanococcales[24%]	Methanocaldococcaceae[15%]	Methanotorris[15%]
P12	Euryarchaeota[81%]	Methanobacteria[26%]	Methanobacteriales[26%]	Methanobacteriaceae[26%]	Methanosphaera[21%]
P13	Crenarchaeota[83%]	Thermoprotei[83%]	Thermoproteales[69%]	Thermoproteaceae[67%]	Thermocladium[66%]
P14	Euryarchaeota[100%]	Thermoplasmata[65%]	Thermoplasmatales[65%]	Picrophilaceae[51%]	Picrophilus[51%]
P15	Euryarchaeota[72%]	Methanococci[21%]	Methanococcales[21%]	Methanocaldococcaceae[18%]	Methanotorris[12%]
P16	Euryarchaeota[68%]	Methanococci[13%]	Methanococcales[13%]	Methanocaldococcaceae[9%]	Methanotorris[9%]

APÊNDICE 1 – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

MEIO TERRIFIC BROTH	
Bacto-Triptona	12 g/L
Extrato de Levedura	24 g/L
Glicerol	4 mL/L

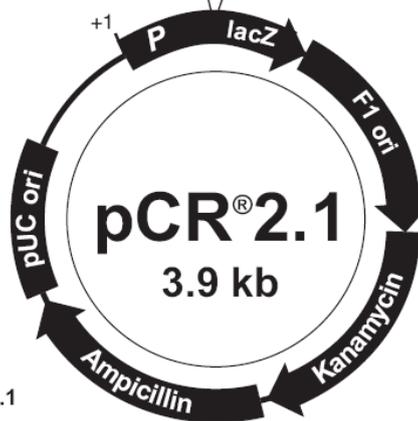
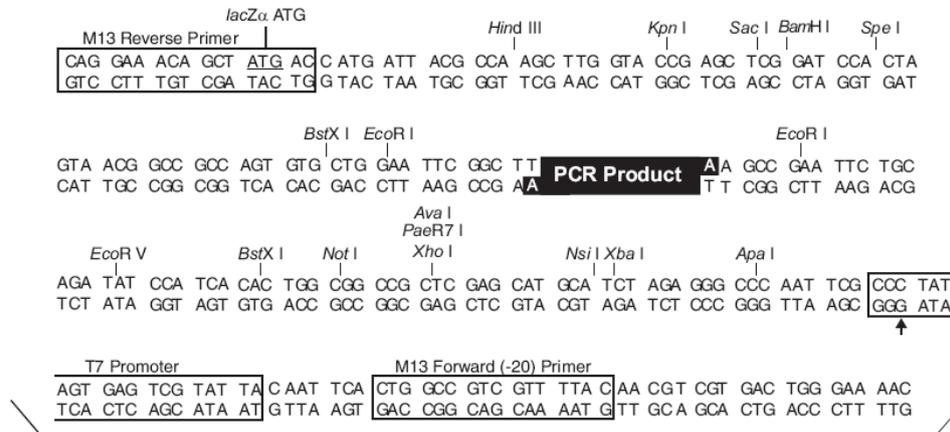
MEIO LURIA-BERTANI AGAR (LA)	
Triptona	10 g/L
Extrato de Levedura	5 g/L
NaCl	10 g/L
Agar	15 g/L

MEIO SOB	
Bacto-Triptona	20 g/L
Extrato de Levedura	5 g/L
NaCl	0,584 g/L
KCl	0,186 g/L
Água destilada q. s. p.	1 L

MEIO SOC	
Triptona	20g /L
Extrato de Levedura	5 g/L
NaCl	0,6 g/L
KCl	0,19 g/L
MgCl ₂	0,94 g/L
MgSO ₄	1,2 g/L
Glucose	3,6 g/L
Água destilada q. s. p.	1 L

APÊNDICE 2 – VETOR pCR® 2.1

Map of pCR®2.1 The map of the linearized vector, pCR®2.1, is shown below. The arrow indicates the start of transcription for the T7 RNA polymerase. The complete sequence of pCR®2.1 is available from our Web site (www.invitrogen.com) or by contacting Technical Service (page 18).



Comments for pCR®2.1 3929 nucleotides

LacZα gene: bases 1-545
M13 Reverse priming site: bases 205-221
T7 promoter: bases 362-381
M13 (-20) Forward priming site: bases 389-404
f1 origin: bases 546-983
Kanamycin resistance ORF: bases 1317-2111
Ampicillin resistance ORF: bases 2129-2989
pUC origin: bases 3134-3807