

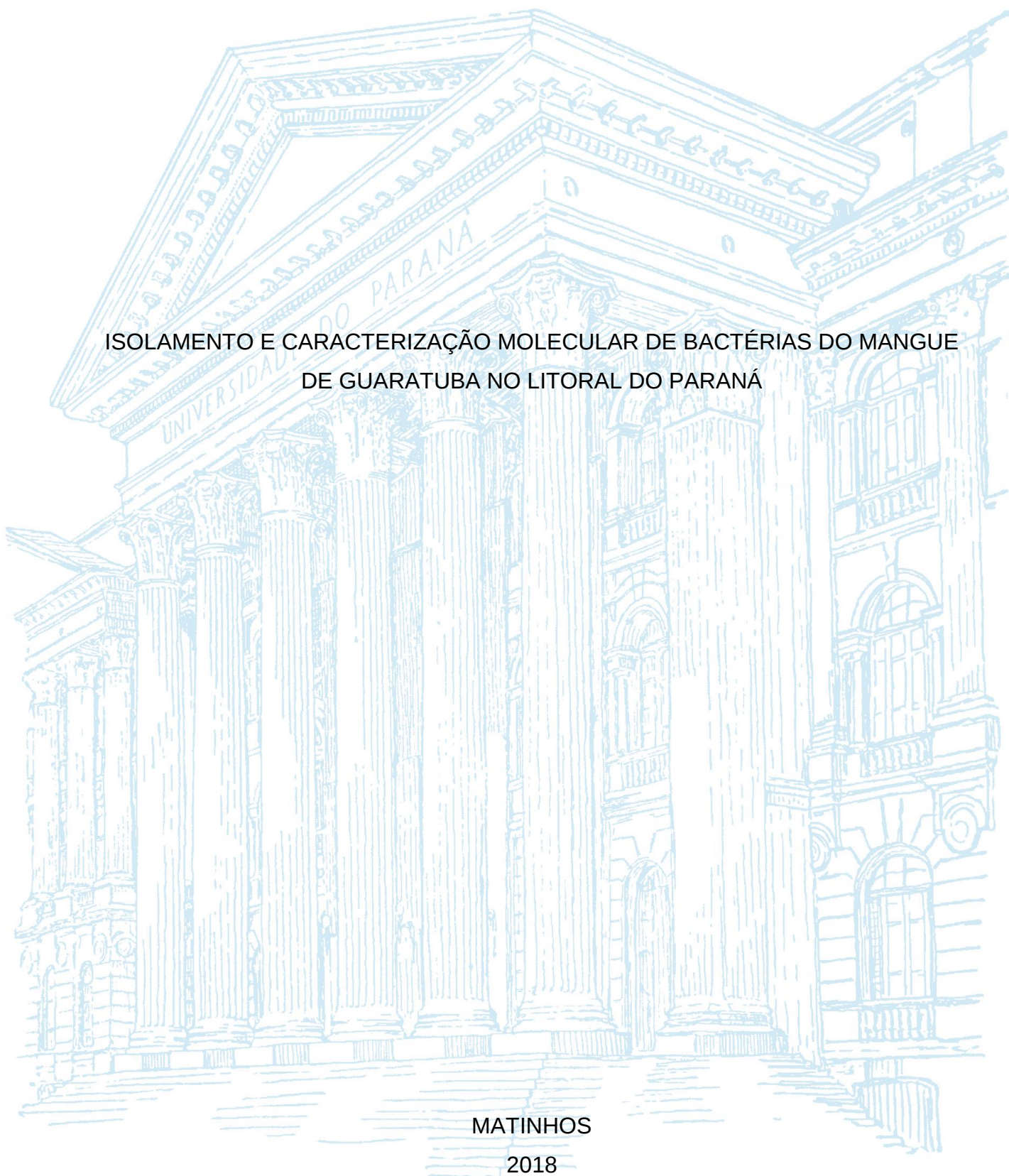
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA DOS SANTOS ELIAS

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS DO MANGUE
DE GUARATUBA NO LITORAL DO PARANÁ

MATINHOS

2018



ANDRESSA DOS SANTOS ELIAS

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS DO MANGUE
DE GUARATUBA NO LITORAL DO PARANÁ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Gestão Ambiental da Universidade Federal
do Paraná como requisito à obtenção do título de
Bacharel em Gestão Ambiental.

Orientador: Prof. Luciano Fernandes Huergo

MATINHOS

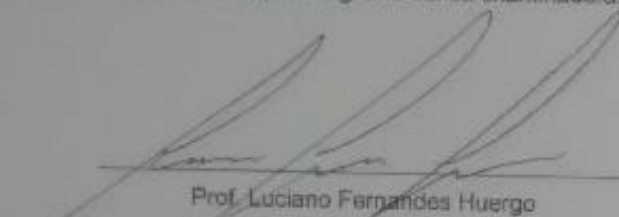
2018

TERMO DE APROVAÇÃO

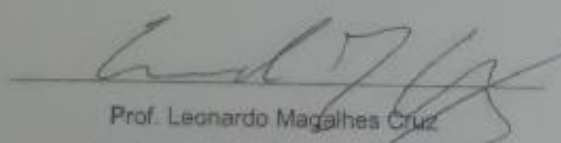
ANDRESSA DOS SANTOS ELIAS

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS DO MANGUE
DE GUARATUBA NO LITORAL DO PARANÁ.

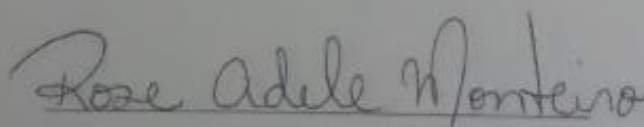
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção
do título de Bacharel em Gestão Ambiental, Curso de Gestão Ambiental, Setor litoral,
Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Luciano Fernandes Huergo
Orientador – Setor Litoral, UFPR.



Prof. Leonardo Magalhes Cruz
Departamento de Bioquímica, UFPR.



Prof. Rose Adele Monteiro
Departamento de Bioquímica, UFPR.

Matinhos, 12 de setembro de 2018

*À minha mãe Divanira dos Santos Elias
e meu pai Carlos Elias.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida e saúde em todo o caminho até aqui.

À minha família pelo grande auxílio financeiro, assim como pelo cuidado, amor, atenção, paciência e apoio. Amo vocês.

À minha mãe Divanira Elias pelas orações e amor incondicional.

À minha irmã Larissa Elias pela atenção e companheirismo em me ouvir tantas vezes nesse logo processo.

À minha avó pelo total conforto que sua casa proporciona, me ajudando a descansar tanto mentalmente quanto fisicamente.

Ao meu orientador Luciano Huergo por todo conhecimento passado, pela atenção, paciência, amizade e toda dedicação demonstrada por cada parte do trabalho.

À minha grande e melhor amiga Maria Vanaina pelo imenso incentivo e por acreditar que eu seria capaz de realizar um grande trabalho. Pelas inúmeras vezes que deixou sua vida de lado para me ouvir e me ensinar. Por todos os momentos de risadas depois de um dia cansativo de trabalho, pela preocupação demonstrava e principalmente pela enorme amizade que criamos até aqui que levarei para a vida toda e terei orgulho de contar para os outros a pessoa incrível que foi nessa caminhada e que continua sendo.

À minha amiga não menos importante Tatiana Damasco pela amizade enorme e carinho que demonstrou trabalhando ao meu lado e me ajudando. Por todos os incentivos que me fizeram ter forças para nunca desistir. Pelos momentos bons e tristes que passamos, serviu para fortalecer ainda mais nossa amizade. Sentirei imensa saudade.

À minha amiga Paloma Guedes e Nicolle Stakowian, maravilhosas biólogas que me ajudaram tirando minhas dúvidas. Sou imensamente grata pelas lindas mensagens de apoio e incentivo independente da hora que fosse. Pela amizade que só se tornou maior e incrível, meu muito obrigada.

À todas as amigas que fiz até aqui, meus agradecimentos por todos os momentos proporcionados.

Ao Flávio Barreto e Marcos Gernet pela ajuda na coleta de material no segundo ponto amostral.

À equipe do laboratório da UFPR pela ajuda.

“Parece razoável acreditar que quanto mais claramente possamos concentrar nossa atenção nas maravilhas e realidade do universo que nos cerca, menos gosto teremos pela destruição de nossa raça. Admiração e humildade são emoções saudáveis, e não existem lado a lado com o desejo de destruição”.

Rachel Carson

RESUMO

Possuindo a maior versatilidade metabólica entre os seres vivos, os procariontes são capazes de realizar funções de extrema importância para o meio ambiente onde vivem e são peças fundamentais nos ciclos bioquímicos. No ambiente de manguezal, procariontes possuem a função de contribuir na formação dos solos e da vegetação, sendo também um dos principais decompositores da matéria orgânica. Apesar da vasta importância a grande maioria dos procariontes ainda são desconhecidos, assim como, a função que desempenham nesse ecossistema. Este trabalho teve como objetivo isolar bactérias do mangue de Guaratuba no litoral do Paraná, com capacidade de fixação de nitrogênio e produção de celulases. Em um primeiro esforço amostral, realizado no sítio sambaqui Cabaraquara, Guaratuba – PR, foram selecionados procariotos capazes de se desenvolver em meio de cultura sem a presença de nitrogênio fixado. Esta etapa teve a finalidade de identificar organismos capazes de realizar fixação biológica de nitrogênio. Dois isolados foram selecionados e submetidos à análise taxonômica através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. O isolado identificado como A12 apresentou 100% de identidade com a espécie *Streptomyces mirabilis* de acordo com o no banco de dados RDP e o segundo isolado A19 apresentou 100% de identidade com a espécie *Bacillus nealsonii*. Os mesmos foram submetidos ainda a determinação da atividade de nitrogenase pelo método de redução de acetileno em etileno, quanto ao crescimento em meio de cultura sem NH_4^+ . Os isolados não apresentam reação de redução de acetileno em etileno. Uma segunda coleta foi realizada em ambiente de mangue nas proximidades do sambaqui do rio Boguaçu em Guaratuba-PR, onde bactérias heterotróficas foram isoladas e um total de 312 colônias foram submetidas à clusterização de dados de espectrometria de massa de célula intacta. Todos os espectros foram analisados com o sistema de maldi-biotyper e apresentaram semelhanças com bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus* e *Vibrio*. Foram selecionados 9 isolados, distantes filogeneticamente na clusterização dos espectros, para análises taxonômicas através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. De acordo com banco de dados RDP os isolados apresentam semelhanças com bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Lysinibacillus* e *Vibrio*. Foram selecionados 9 isolados para avaliar a capacidade de degradação de celulose, 4 isolados demonstraram desempenho quanto a produção de enzimas com atividade celulosítica tendo como única fonte de carbono Carboximetil Celulose.

Palavras-Chaves: Biodiversidade. Isolamento Bacteriano. Ecossistema Manguezal.

ABSTRACT

Possessing the greatest metabolic versatility among living organisms, prokaryotes are capable of performing functions of extreme importance to the environment in which they live and are key components in biogeochemical cycles. In the mangrove environment prokaryotes contribute to the formation of soils and vegetation and participate in the decomposition of organic matter. Despite their importance, most prokaryotes are still unknown. This work aimed to isolate new strains of bacteria from the Guaratuba mangrove on the Paraná Coast. In a first sampling effort carried out at the Sambaqui Cabaraquara Site, Guaratuba - PR prokaryotes capable to develop in culture medium without the presence of fixed nitrogen were selected. The goal was to identify organisms capable of performing biological fixation of nitrogen. Two isolates were selected and submitted to taxonomic analysis through partial sequencing of the 16S rRNA gene. The isolate identified as A12 showed 100% identity with the species *Streptomyces mirabilis* according to analyzes in the NCBI database and the second isolate A19 showed 100% identity with the species *Bacillus nealsonii*. They were also assayed for nitrogenase activity by the acetylene reduction method in semi-solid medium without nitrogen. Despite growing well in the absence of fixed nitrogen both isolates showed no nitrogenase activity. A second sampling effort was carried out in a mangrove environment near the Boguaçu River Sambaqui in Guaratuba-PR, where heterotrophic bacteria were isolated and a total of 312 colonies were submitted to clustering of intact cell mass spectrometry data. All spectra were analysed with the MALDI-Biotyper system and few isolates showed similarities with *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus* and *Vibrio* genera. With the analysis of mass spectrometry, 9 phylogenetically distant isolates were selected and submitted to taxonomic analysis through partial sequencing of the 16S rRNA gene. According to the NCBI database, the data indicate that the isolates were similar to *Bacillus* and *Lysinibacillus*. 9 isolates were tested for the ability to degrade cellulose and 4 isolates were positive.

Key-words: Biodiversity. Bacterial isolation. Mangrove Ecosystem.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - NITROGENASE.....	19
FIGURA 2 – MAPA AMOSTRAL DA ÁREA DE COLETA, IMAGENS DO GPS ESSENTIALS, COLETA DAS AMOSTRAS DE SOLO DO MANGUE DA BAÍA DE GUARATUBA – PR.....	23
FIGURA 3 – SEGUNDO PONTO DE COLETA.....	25
FIGURA 4 – BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS.....	34
FIGURA 5 – BACTERIAS ISOLADAS EM QUADRANTES.....	35
FIGURA 6 – ISOLADOS A12 E A19	35
FIGURA 7 – ELETROFORESE DE DNA DOS ISOLADOS A12 E A19	36
FIGURA 8 – ISOLADO A12 <i>STREPTOMYCES MIRABILIS</i>	38
FIGURA 9 – ISOLADO A19 <i>BACILLUS NEALSONII</i>	38
FIGURA 10 – CRESCIMENTO DO ISOLADO A19 NO MEIO SEMI-SÓLIDO	39
FIGURA 11 – DENDOGRAMA GERADO COM DADOS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS MALDI-TOF MS DE CÉLULA INTACTA.....	42
FIGURA 12 – ELETROFORESE DE DNA DOS ISOLADOS SELECIONADOS	44
FIGURA 13 – IDENTIDADE DE ESPÉCIE <i>B. XIAMENENSIS</i>	46
FIGURA 14 – PROXIMIDADE ENTRE OS ISOLADOS IDENTIFICADOS POR MEIO DO MALTI- BIOTYPER E 16S.	47
FIGURA 15 – RESULTADO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA.....	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PRIMERS UTILIZADO PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S RRNA DAS AMOSTRAS.....	31
TABELA 2 – RESULTADO DA IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS A12 E A19 POR MEIO DO SEQUENCIAMENTO GENE 16S RRNA	37
TABELA 3 – RESULTADO DE MALDI-BIOTYPER. OS ISOLADOS COM SCORE ENTRE 1,8 E 2 IDENTIFICA GÊNERO E ACIMA DE 2 ESPÉCIE.	43
TABELA 4 - RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S RRNA.....	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 MICRORGANISMOS.....	14
2.1.1 Procariontes	15
2.2 MANGUEZAL	15
2.2.1 Diversidade de procarionte no solo de manguezais	18
2.3 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	19
2.4 CELULOSE	20
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 OBJETIVO GERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 ÁREA DE ESTUDO.....	23
4.2 HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	26
4.2.1. Diluição seriada.....	26
4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO	26
4.3.1 Meios de Cultura	26
4.3.2 Tempo e temperatura.....	28
4.4 – 1º ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS.....	29
4.4.1 Espectrometria de Massa.....	29
4.5 – 2º ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS.....	29
4.5.1 Reação da Cadeia de Polimerase – PCR	29
4.5.2 Purificação do DNA	30
4.5.3 Amplificação, Sequenciamento e análise do gene 16S rRNA	30
4.5.4 Análises computacionais de sequência de DNA	31
4.6 ATIVIDADE NITROGENASE	32
4.7 ATIVIDADE CELULOLÍTICA	33
4.7.1 Meio de cultura.....	33
5 RESULTADO	34
5.1 – 1º COLETA DAS AMOSTRAS DE MANGUE	34
5.1.2 Prováveis bactérias fixadoras de nitrogênio.....	34
5.1.3 PCR dos isolados A12 e A19.	36
5.1.4 Sequenciamento, análise e identificação das sequências de 16S rRNA	37

5.1.5 Atividade de nitrogenase com os isolados A12 e A19.....	39
5.2 – 2º COLETA DAS AMOSTRAS DE SOLO DO MANGUE	40
5.2.1 Isolamento de bactérias	40
5.2.2 Isolados submetidos a Espectrometria de Massa	41
5.2.3 Identificação dos isolados através do sistema de MALDI-Biotyper.	43
5.2.4 Amplificação do gene 16S rRNA dos isolados cultiváveis.....	43
5.2.5 Sequenciamento, Análise e identificação das sequências de 16S rRNA com o banco de dados RDP	44
5.3 ANÁLISE DE ATIVIDADE CELULOLÍTICA DOS ISOLADOS 5, 8, 9 E 12.....	48
6 DISCUSSÃO	49
6.1 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO A12 E A19	49
6.2 IDENTIFICAÇÃO POR MEIO DO SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S.....	50
7. CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
APÊNDICE 1.....	59
ANEXO I – ARTIGO APROVADO PARA PUBLICAÇÃO	60
ANEXO II – INTEGRAÇÃO CULTURAL HUMANÍSTICA, ICH	70
ANEXO III – PROJETOS DE APRENDIZAGEM, PA	76
ANEXO IV – VIVÊNCIAS EM GESTÃO AMBIENTAL	78

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos são seres que estão presentes em todos os lugares, ligado de forma direta com o solo, água, ar, plantas e animais. O solo proporciona condições ideais para a proliferação de microrganismos, devido à grande quantidade de matéria orgânica (SILVEIRA, 2004). Os microrganismos desempenham diversas funções, entre elas a remoção de toxinas, participação nos ciclos do carbono, nitrogênio e enxofre (SILVEIRA, 2004). Microrganismos também se destacam quanto ao grande potencial biotecnológico, sendo utilizados na produção de antibióticos e enzimas entre outros.

De acordo com Ribeiro (2010), regiões costeiras podem apresentar um grande depósito de uma biodiversidade ainda desconhecida. O ambiente de manguezal por sua vez apresenta condições ideais para o desenvolvimento de microrganismos, possibilitando que haja ali microrganismos ainda não descritos. Entretanto, apesar das áreas de manguezais serem de grande importância ecológica, o manguezal é considerado um ecossistema vulnerável devido à crescente destruição. O manguezal, de acordo com o Código Florestal lei nº12.651/2012, se estende ao longo da costa brasileira, entre os Estados do Amapá e de Santa Catarina. Os manguezais possuem um papel primordial na manutenção da biodiversidade marinha (CORREIA *et al.*, 2014), e abriga um grupo rico e diversificado de microrganismos (DAS *et al.*, 2006).

Bactérias presentes no ambiente de manguezal podem desempenhar inúmeras atividades, dentre elas a fixação biológica de nitrogênio (DAS *et al.*, 2006). O nitrogênio está presente em praticamente 80% do ar, estando de forma química indisponível para ser assimilado por plantas e animais. Porém, bactérias diazotróficas podem fazer com que o nitrogênio seja assimilável, através da fixação biológica de nitrogênio (HUNGRIA, 2007).

Considerando aspectos importantes já descritos, o presente trabalho tem por objetivo isolar bactérias do mangue de Guaratuba no litoral do Paraná e avaliar a capacidade de fixação de nitrogênio e produção de celulasas. Uma vez que o ambiente de manguezal é um ambiente pouco estudado, assim como a sua biodiversidade microbiana e a função que esses microrganismos desempenham nesse ambiente. Através de dois esforços amostrais coletados a partir do solo de manguezais, as amostras foram cultivadas em placas de petri com a ajuda de meios

de cultura diferenciados. Os isolados cultivados foram submetidos à espectrometria de massa, e identificados através do programa MALDI-Biotyper e sequenciamento de DNA do gene 16S rRNA, afim de determinar a classificação taxonômica molecular dos isolados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICRORGANISMOS

Os microrganismos estão ligados de forma direta com o solo, assim como o água, ar, plantas e animais. O solo é um dos principais reservatórios de carbono do planeta e um dos mais importantes habitats para os microrganismos. Manter a diversidade de microrganismo garante uma boa qualidade de solo, segundo Val-Moraes *et al* (2008, p.8), “tão importantes quanto às características físico-químicas do solo são os seus componentes biológicos, ou seja, a diversidade genotípica e a atividade metabólica dos microrganismos edáficos”.

Habitualmente, o solo proporciona boas condições para proliferação de microrganismos, fazendo como que a quantidade de microrganismos no solo seja muito farta, uma vez comparado com os ambientes de água doce ou salgada. Um dos motivos vem a ser a grande quantidade de matéria orgânica encontradas no solo, em relação a outros ecossistemas (SILVEIRA, 2004). Entre as muitas funções que desempenham os microrganismos está a remoção de toxinas, participação nos ciclos do carbono e nitrogênio (SILVEIRA, 2004). De acordo com Goi *et al* (2006), microrganismos apresentam grande potencial biotecnológico, tais como, bioinoculantes para produção agroflorestal, controle biológico, biorremediação, produção de fármacos tais como antibióticos, enzimas, corantes entre outras substâncias químicas. No entanto, a magnitude da biodiversidade microbiana ainda não é conhecida e conseqüentemente o potencial a ser explorado, conclui o autor.

Segundo GRAYSTON & JONES (1996 apud ZILLI *et al*, 2003), a presença de raízes e matéria orgânica em decomposição, influência na atividade metabólica do solo. O mesmo autor observa na rizosfera, “uma intensa atividade microbiana, em razão da presença de exsudatos e secreções radiculares que representam as maiores fontes de carbono prontamente disponíveis para os microrganismos”. (GRAYSTON & JONES 1996 apud ZILLI *et al*, 2003, p.400). Zilli *et al* (2003), considera extremamente importante a busca de métodos de avaliação da diversidade de microrganismos no solo, como uma forma também de determinação da qualidade do solo.

2.1.1 Procariontes

Os procariontes são divididos em dois grupos: Bactéria e Archeae. Bactéria normalmente aparecem isoladas ou em forma de colônias ou biofilmes, as células variam entre 0,2 – 5 µm de tamanho, são unicelulares e apresentam variações quanto à forma podendo ser esférica, bastonete e espirilo. As Archeae não deixam de apresentar semelhanças com as Eubactérias, porém apresentam diferenças importantes em relação a sua composição química e habitat podendo ser encontradas em ambientes de alta concentração salinas, acidez e temperatura, uma vez que a presença de nutriente no ambiente é o principal fator que limita o crescimento bacteriano (VIEIRA *et al.*, 2012).

Podendo ser considerado outros fatores limitantes como Temperatura, pH e Oxigênio. De acordo com Vieira *et al* (2012), algumas bactérias crescem entre temperaturas baixas, intermediárias e altas, considerando que a temperatura mais favorável, os microrganismos crescem mais rapidamente. Em relação ao pH o mesmo descreve as bactérias como acidófilas (pH 01 a 5,4), neutrofílicas (pH 5,5 a 8,5) e alcalófilas (pH 8,5 a 11,5), onde o pH ótimo é bem definido para cada espécie e o crescimento das bactérias não ocorrem abaixo ou acima do pH ideal. O oxigênio também aparece como um fator limitante, algumas bactérias necessitam de O₂ para o crescimento sendo elas conhecidas como aeróbias estritas, outras anaeróbias estritas que crescem que ausência de O₂, microaerofílicas (precisam de O₂, mas em pressão inferior à atmosférica) e anaeróbias facultativas ou aerotolerantes (crescem na presença ou ausência de O₂).

Estudar a morfologia das bactérias, assim como a observação interna das estruturas celulares permite conhecer um pouco o funcionamento da bactéria no ambiente. Estudos já realizados descrevem a importância das bactérias nos processos biotecnológicos quando utilizados na indústria, agricultura e na medicina.

2.2 MANGUEZAL

De acordo com o artigo 3º do Código florestal lei nº12.651/2012, o manguezal é considerado:

XIII - manguezal: ecossistema litorâneo que ocorre em terrenos baixos, sujeitos à ação das marés, formado por vasas lodosas recentes ou arenosas, às quais se associa, predominantemente, a vegetação natural conhecida como mangue, com influência fluviomarinha, típica de solos limosos de regiões estuarinas e com dispersão descontínua ao longo da costa brasileira, entre os Estados do Amapá e de Santa Catarina.

Manguezal é ecossistema costeiro tropical, que está entre a terra e o mar, podendo ser encontrados em terrenos baixos na foz dos rios e estuários, tendo grande influência das marés, as quais são responsáveis pela entrada de água salinas nos manguezais, ocasionando as variações de salinidade (CORREIA *et al.*, 2005). Entre as funções que as marés desempenham no ambiente de manguezal estão o transporte de sedimentos para dentro dos manguezais, “renovação das águas superficiais e intersticiais, cuja importância está na oxigenação, transporte de nutrientes e propágulos, além da dispersão das larvas de peixes e dos organismos bentônicos, principalmente das espécies sésseis” (CORREIA *et al.*, 2005, p.26). Além das marés que influenciam os manguezais, a quantidade de água doce que o manguezal recebe é considerada por Albuquerque *et al* (2015), fundamental para o desenvolvimento e manutenção deste ambiente.

Estando entre a transição dos ambientes terrestres e marinhos, o manguezal possui uma composição de substratos dita por Correia *et al* (2005, p.25) com predominância de “vasa e lama, formados por depósitos recentes, ricos em silte e argila, podendo apresentar diferentes concentrações de areia”. O substrato das áreas de manguezais é composto por uma variação de sedimentos que possuem diferentes origens, tanto marinhos quanto dos fluxos dos rios e estuários. Sedimentos que também são formados por folhas, galhos e material vegetal e animal em diferentes etapas de decomposição, acarretando baixo teor de oxigênio no interior do solo (CORREIA *et al.*, 2005). Sedimentos ou detritos que são formados pelo mesmo conjunto de matérias naturais como folha e galhos, passam pelo processo de decomposição realizada por microrganismos, os quais compõem a base da cadeia alimentar. Microrganismos sendo eles protozoários, bactérias e fungos, ajudam no processo de alimentação de crustáceos e peixes mais jovens (ATLAS, 2018).

Os manguezais apresentam uma biodiversidade funcional única e possuem uma flora e fauna única do ecossistema, uma vez que, esse ecossistema pode ser encontrado pelo mundo inteiro, tanto em regiões que apresentam climas tropicais como subtropicais. Os manguezais apresentam diferentes características entre salinidade e formação de florestas que variam segundo a latitude, meio físico, hidrografia e atmosfera, que resulta em uma grande variedade botânica e zoológica, entre outras características (CASTRO, 2011). Entre as vegetações mais encontradas no ambiente de manguezal estão o mangue vermelho (*Rhizophorae mangle*), o mangue preto (*Avicennia shaueriana*) e o mangue branco (*Laguncularia racemosa*). (CASTRO, 2011). Áreas de manguezais são diferenciadas facilmente por ser composta por uma vegetação que cresce em ambiente de água salgada ou salobra, além de suas raízes possuírem grande sustentação no solo ajudando na redução do fluxo das águas, garantindo grande estabilidade e proteção contra erosão (ATLAS, 2018). O desenvolvimento dos manguezais está ligado de forma direta com as diferenças de temperatura e pluviosidade. Sendo necessário médias anuais acima de 20°C e mínimas superiores a 15°C, no qual a amplitude térmica fica entorno de 5°C. Já a precipitação pluvial deve ser acima de 1.500 mm/ano e sem prolongados períodos de seca (CORREIA *et al.*, 2005).

O ecossistema manguezal apresenta condições ideais para alimentação, proteção e reprodução de muitas espécies de animais, servindo como berçário natural e abrigo para diversas espécies de peixes, crustáceos, aves, entre outros. (ALBUQUERQUE *et al.*, 2015). Segundo Correia *et al* (2005), algumas espécies de dulcícolas necessitam das áreas de manguezal para se reproduzirem durante o seu ciclo biológico e desenvolverem diferentes fases larvais das suas respectivas proles. Albuquerque *et al* (2015, p.138), destaca que “a fauna do manguezal pode ser distribuída de uma maneira geral pelos diferentes compartimentos existentes neste ecossistema, didaticamente separados em: água, solo e vegetação”. Sendo de grande importância para o equilíbrio ecológico, rico em proteínas para diversos componentes da fauna estuarina e marinha (BARCELLOS *et al.*, 2005).

Estando entres os principais ecossistemas costeiros tropicais, pela sua grande atuação na transformação da matéria orgânica, tendo por resultado a ciclagem dos nutrientes. Os manguezais ocorrem em todo o mundo, onde ocupam grandes áreas. De acordo com o material produzido pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - Atlas dos Manguezais do Brasil (2018), a

diversidade de ambientes de manguezais ocorre desde 04°20'N (Oiapoque, AP) até 28°30'S (Laguna, SC). Deixando apenas Rio Grande do Sul com nenhum registro de presença atual de cobertura vegetal típica de manguezal (ATLAS, 2018).

O manguezal está presente junto com a sociedade desde a pré-história, em razão da abundância de recursos alimentares que fornece. No entanto Albuquerque *et al* (2015), ressalta quando ao uso desse ecossistema de forma indevida, cuja proteção legal do mesmo apresenta-se como imprescindível. Tendo como problema mais frequente a construção de moradias nas margens dos manguezais, ocasionando o desmatamento de grandes áreas de manguezal. O desmatamento é visto como uma das mais antigas alterações nas áreas de manguezais no Brasil, praticado desde o século XVI, gerando impactos que alteram diretamente tanto a flora e a fauna como a comunidade em um todo (ALBUQUERQUE *et al.*, 2015).

2.2.1 Diversidade de procarionte no solo de manguezais

Os microrganismos são considerados os organismos mais abundantes e diversos da terra (RIBEIRO, 2010). No entanto, a diversidade de procariontes no ecossistema manguezal, ainda é pouco estudada. Segundo Ribeiro (2010), regiões costeiras que normalmente recebem influência de alguns processos naturais, podem representar grandes depósitos de uma biodiversidade ainda desconhecida, podendo servir para estudos quanto a mudanças antropogênicas e funcionamento do ecossistema. O autor destaca os ambientes de manguezais como áreas excepcionais para esses estudos e um ambiente ecológico singular para uma grande diversidade de comunidades bacterianas.

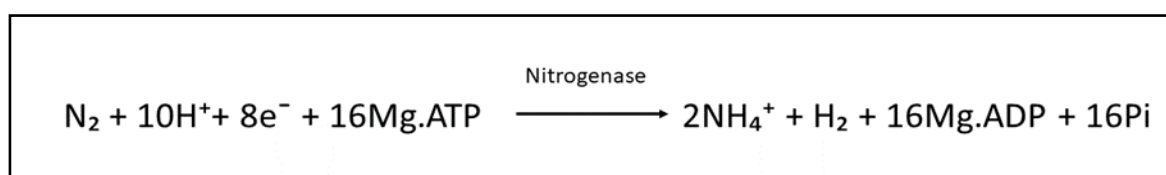
Dentre os trabalhos sobre a diversidade de procariontes em manguezais encontrados no Brasil, Ribeiro (2010), ao estudar a diversidade procariótica em sedimentos de dois manguezais, com distintos níveis de poluição, no complexo de Paranaguá – PR, observou a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA altos índices de confiabilidade com determinados filos de bactérias, sendo eles: *Cyanobacteria*, *Bacillariophyta*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Acidobacteria*. E observou ainda organismos das classes *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* e *Alphaproteobacteria*. Na mesma linha de pesquisa Rocha (2008), com a finalidade de contribuir para o conhecimento da diversidade bacteriana no solo de Manguezais da Barra Grande, Icapuí, entre outras finalidades, descreve o isolamento de bactérias capazes de degradar petróleo e derivados. De acordo com o

sequenciamento do gene 16S, tais isolados mostraram 99% de similaridade com *Acinetobacter sp.*, já Castro (2011), ao estudar comunidades bacteriana endofíticas associadas aos manguezais de Cananéia e Bertioga – SP, identificou o gênero *Bacillus* com maior número de isolados cultiváveis com capacidade de crescimento em meio NFb, e o gênero *Pantoea* com maior número de isolados fixadores de nitrogênio. Além da identificação desses gêneros, em seu trabalho Castro (2011), identificou sete diferentes gêneros de bactérias quanto a capacidade de produção de Ácido Indol Acético, sendo eles: gêneros *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Exiguobacterium*, *Sphingosinicella*, *Erwinia*, *Stenotrophomonas*. Destacando a espécie *Exiguobacterium sibiricum* como maior produção de AIA.

2.3 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Servindo como elemento essencial na nutrição vegetal, o nitrogênio faz parte de uma série de compostos chaves na fisiologia das plantas, como clorofila, ácidos nucléicos, aminoácidos e proteínas. O elemento é abundante na natureza sendo o principal constituinte da atmosfera somando 80% do ar, mas está de forma química indisponível para ser assimilado por plantas e animais. Porém, bactérias conhecidas como diazotróficas, tem a capacidade de transformar (fixar) o nitrogênio atmosférico em formas assimiláveis, como a amônia (NH₃) (HUNGRIA, 2007). Segundo Burris (1991 *apud* HUERGO, 2006), “as chamadas bactérias diazotróficas são os únicos organismos que podem converter o denitrogênio atmosférico a amônio, o qual pode ser utilizado na síntese de biomoléculas que contenham nitrogênio”. A Figura 1 mostra a reação da enzima nitrogenase responsável pela fixação biológica de nitrogênio. Esta enzima catalisa a redução de denitrogênio gasoso (N₂) a amônio. (EADY, 1986; POSTGATE, 1982 *apud* HUERGO, 2006).

FIGURA 1 - NITROGENASE



Segundo Moreira *et al* (2010), microrganismos conhecidos como diazotróficos podem ser de vida livre, que estabelecem associações com espécies vegetais ou, podem estabelecer simbiose com leguminosas. A simbiose pode ser facilmente identificada pela estrutura especializada para o processo biológico, chamada de nódulo que são formados nas raízes das leguminosas.

Os diazotrofos possuem grande importância quanto ao fornecimento de nitrogênio a diversos ecossistemas. A realização da fixação biológica de nitrogênio auxilia o crescimento radicular das plantas, sendo as bactérias diazotróficas consideradas rizobactérias promotoras do crescimento vegetal. (MOREIRA *et al.*, 2010). Alguns exemplos de diazotróficos podem ser aeróbios como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* e *Burkholderia*, anaeróbios obrigatórios (*Clostridium*) ou anaeróbios facultativos (*Klebsiella spp*). (HUNGRIA, 2007).

São encontrados entre os microrganismos diazotróficos arqueobactérias, cianobactérias, bactérias gram-positivas e gram-negativas, que juntas formam uma grande diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. (MOREIRA *et al.*, 2010). Segundo Hungria (2007), 50% de todo o nitrogênio que entra na terra é atribuído à fixação biológica de nitrogênio. No qual contribui para uma agricultura moderna, que tem por objetivo alcançar o máximo de produtividade, com a melhor relação custo/benefício e impacto ambiental mínimo.

No ambiente de manguezal Castro (2011), descreve o isolamento de bactérias capazes de fixar nitrogênio. Em seu trabalho, a espécie de *Bacillus pumilus* apresentou grande capacidade quanto a fixação de N_2 , demonstrando dessa forma a importância da mesma. Castro (2011), identifica em seu trabalho bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de manguezais que ainda não havia sido relatada em outros trabalhos, considerando a primeira observação neste sentido.

2.4 CELULOSE

De acordo com Lima *et al* (2015, p. 1), “a celulose, ($C_6H_{10}O_5$) é o polímero natural mais abundante da terra obtido a partir de fontes renováveis” e a madeira é a fonte natural de celulose mais explorada comercialmente “devido sua grande disponibilidade que atende as demandas da indústria do papel”. Segundo Sacco

(2013), o grande volume de resíduos celulósico gerados por diferentes fontes, dentre elas indústrias, gera um desequilíbrio no ecossistema por ser de difícil degradação. Como alternativas os microrganismos podem ser utilizados na degradação de celulose, uma vez que a celulose pode ser degradada através de enzimas celulase, os quais bactérias dentre outros organismos conseguem produzir. (SACCO, 2013).

Dentre os produtores de celulose, encontrasse as algas marinhas, musgos, animais marinhos e algumas espécies de bactérias, como por exemplo, bactérias do gênero espécie *Gluconacetobacter*, sendo conhecida nesse caso como celulose bacteriana ou também como biocelulose ou celulose microbiana (George *et al.*, 2012 apud LIMA *et al.*, 2015). Estudos comprovam o potencial de outras espécies de bactérias quanto a degradação de celulose, xilana e ágar. (DENG & WANG, 2017; SU *et al.*, 2018; JAG *et al.*, 2017 e JESUS *et al.*, 2015). No solo da caatinga, Giovedy (2011), isolou 73 linhagens de bactérias, das quais 34% apresentaram halo de degradação de celulose. E em solos de manguezais, Sá (2008), identificou a espécie *Bacillus subtilis* com maior performasse em relação à produção de endocelulose. O mesmo autor descreve a atividade celulolítica do ambiente de manguezal de grande importância, devido à alta produtividade em função da ciclagem dos nutrientes promovido pela decomposição das folhas, fazendo com que as folhas e as madeiras das árvores sejam os principais componentes degradados por microrganismos celulolíticos neste ecossistema.

A produção de enzimas microbianas e a aplicação dessas enzimas em “bioprocessos industriais representa a alternativa mais viável do ponto de vista econômico e ambiental em relação aos processos termo-químicos utilizados no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica para conversão em biocombustível” (LYND *et al.*, 2008 apud JESUS *et al.*, 2015, p. 270). As bactérias ainda são empregadas a degradação e biorremediação de compostos do petróleo (WETLER-TONINI *et al.*, 2010) e análises de ácidos graxos (COELHO *et al.*, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Prospecção de bactérias cultiváveis com potencial para fixação biológica de nitrogênio e produção de celulose, isolados do mangue de Guaratuba no Litoral do Paraná.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

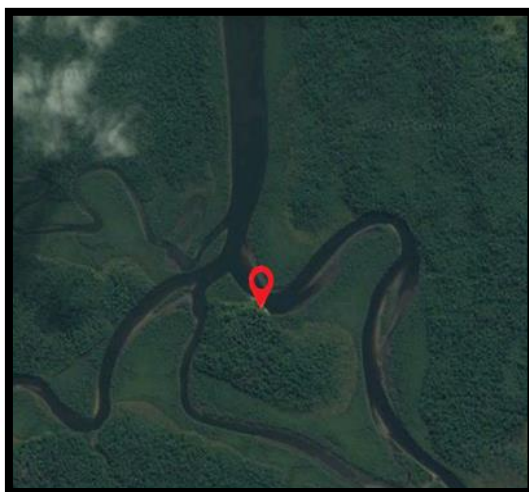
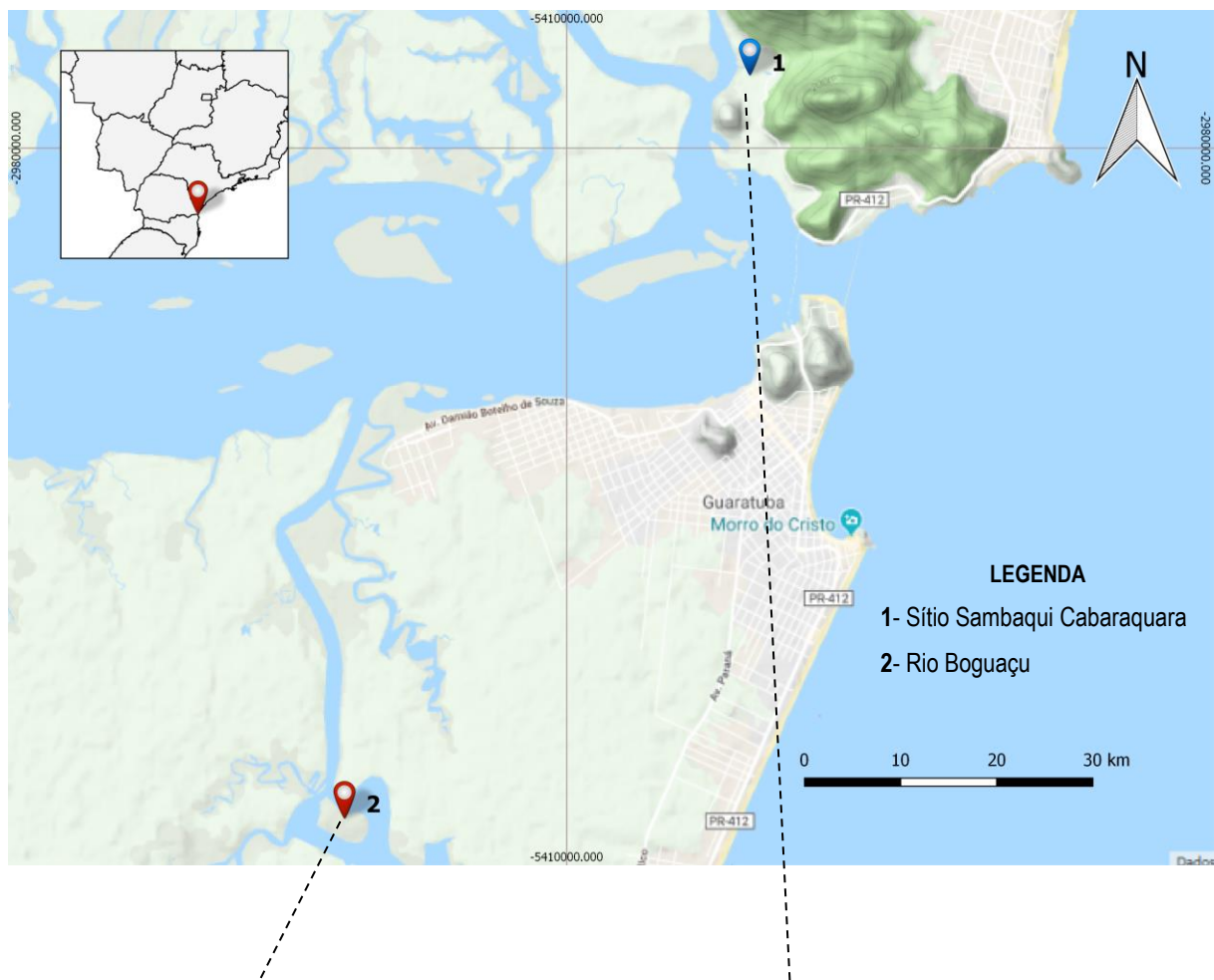
- Isolar bactérias com potencial para fixação biológica de nitrogênio;
- Determinar a classificação taxonômica dos isolados;
- Avaliar o potencial para produção de celulases dos isolados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

As amostras aqui estudadas foram coletadas em dois pontos amostrais sendo eles estabelecidos no ecossistema manguezal. A primeira área de coleta foi realizada no Sítio Sambaqui Cabaraquara, conhecido na região de Guaratuba por possuir uma grande área de manguezal, além de realizar o cultivo de ostras e caranguejos, e desenvolver projetos na área de Educação Ambiental. O segundo ponto de coleta no manguezal, foi estabelecido no entorno do Rio Boguaçu, onde foram coletados amostras do solo de manguezal, juntamente com amostras de manguezal misturados com conchas trituradas, sendo essas conchas presentes em sítio arqueológico Sambaqui, ambos pontos de coleta localizados no litoral do Paraná, em Guaratuba-PR. Tendo por coordenada geográfica marcado com o auxílio do GPS Essentials: S- 25,833652 W-48,578575 (1° ponto de coleta) e S- 25,919583 W- 48,627819 (2° ponto de coleta). (Figura 2).

FIGURA 2 – MAPA AMOSTRAL DA ÁREA DE COLETA, IMAGENS DO GPS ESSENTIALS, COLETA DAS AMOSTRAS DE SOLO DO MANGUE DA BAÍA DE GUARATUBA – PR.



As amostras do solo de manguezal correspondente ao primeiro ponto amostral, foram coletadas com o auxílio de dois tubos falcon de 50ml. Sendo levado para o laboratório em temperatura ambiente e processadas em menos de 1 hora após a coleta. Foram estabelecidos para o primeiro ponto de coleta apenas um ponto amostral.

Já as amostras de solo de manguezal correspondente ao segundo ponto de coleta, foram realizados seis pontos amostrais nomeados como sendo: Mangue 1, Mangue 2, Mangue 3, Sambaqui 1, Sambaqui 2 e Sambaqui 3. Em cada um dos 6 pontos nomeados, foram feitas sucessivamente três subamostras que foram unidas, podendo ser observado com o auxílio da Figura 3. As amostras foram levadas para o laboratório em sacos plásticos, e armazenadas por não mais que 3 horas em temperatura ambiente até o procedimento seguinte.

FIGURA 3 – SEGUNDO PONTO DE COLETA



Ponto amostral identificado como Sambaqui 1, tendo respectivamente três áreas subamostrais de coleta.

4.2 HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

4.2.1. Diluição seriada

No laboratório, uma quantidade de 1g da amostra foi colocado em um tubo de ensaio de 15 ml com 9 ml de solução salina (NaCl a 0,9%) devidamente autoclavada. Essa amostra foi agitada no período de 10 minutos para obter a homogeneização da amostra. Deixada em repouso por mais 10 minutos ao termino da agitação. Amostra essa considerada como sendo a diluição 10^{-1} . Tendo por objetivo obter concentrações menores da amostra coletada, em um eppendorf de 1,5ml foram colocados 150µl do sobrenadante da diluição 10^{-1} e passado sucessivamente para outros 4 eppendorf contendo 1350 µl de solução salina (NaCl a 0,9%) sendo essas diluições 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} .

Para o cultivo bacteriano, foram utilizados 100µl das diluições 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , descartando apenas a primeira diluição 10^{-1} .

4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

4.3.1 Meios de Cultura

Para o cultivo dos microrganismos foram utilizadas placas de petri contendo 25ml de meio de cultura e 100µl correspondente a cada uma das diluições seriadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}). Os meios de cultura utilizados foram LB, M9 (sem NH_4) com o objetivo de cultivar microrganismos capazes de fixar nitrogênio, NFb Lactato e Tryptona Soya. (meio de cultura comercial – fabricante HIMEDIA). Os seguintes meios de cultura foram preparados da seguinte forma:

Meio de cultura LB: Extrato de levedura 5,0 g/L, Cloreto de sódio 10,0 g/L e Tryptona 10,0 g/L. Completado com água destilada, tendo por volume final 1,0 L. Após o preparo, o meio foi devidamente autoclavada. O meio sólido foi obtido com a adição de ágar na concentração de 15 g/L ao meio líquido e foi denominado LA. (HUERGO, 2006).

Meio de cultura M9: foram preparadas algumas soluções individuais devidamente autoclavados e misturas no momento do uso:

- Para o preparo dos sais para M9 (5x) foram adicionados Fosfato de Sódio Dibásico 64 g/L, Fosfato monossódico 15 g/L e NaCl 2,5 g/L, completado com água destilada, tendo por volume final 1,0 L. O pH final entre 7,0.
- Para o preparo do Sulfato de magnésio (1mol/L) foram adicionados 9,8 g de MgSO_4 , completado com água destilada, tendo por volume final de 40 ml.
- Para o preparo do Cloreto de cálcio (1 mol/L) foram adicionados 1,1 g de CaCl_2 , completado com água destilada, tendo por volume final 10 ml.
- Para o preparo da Glucose foram utilizados 20 g de glucose, completado com água destilada, tendo por volume final 100 ml.
- Para o preparo da solução de cloreto de sódio, foram adicionados 5,8 g de NaCl, completado com água destilada, tendo por volume final 100 ml.

Para o preparo do meio de cultura M9, foram utilizados: Ágar bacteriológico 3g, Sais para M9 (5x) 40 ml, Sulfato de magnésio 0,4 ml, Cloreto de cálcio 10 μ l, Glucose 4 ml, completado com água destilada, tendo por volume final 150 ml.

Meio de cultura NFb Lactato: A composição e o preparo do meio NFb Lactato foram realizados da seguinte forma grama/litro:

Composição	gramas/litro
KH_2PO_4	4,0
K_2HPO_4	6,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-1}$
NaCl	$1,0 \cdot 10^{-1}$
CaCl_2	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Ácido nitrilo triacético	$5,6 \cdot 10^{-2}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Lactato de sódio	5,0
Biotina	$1,0 \cdot 10^{-4}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$2,35 \cdot 10^{-3}$

H ₃ BO ₃	2,8. 10 ⁻³
CuSO ₄ . 5H ₂ O	8,0. 10 ⁻⁵
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,4. 10 ⁻⁴

Não foi adicionado nenhuma fonte de nitrogênio, com o objetivo de cultivar bactérias capazes de fixar nitrogênio. A solução de fosfato foi autoclavada separadamente e adicionadas fria ao meio no momento de uso. O meio NFb Lactato sólido foi obtido adicionando-se ágar bacteriológico na concentração de 15 g/L ao meio líquido, dez por cento da mistura de fosfato foi adicionada ao meio sólido antes da autoclavação para evitar hidrólise do ágar devido a possíveis variações no pH. O pH ideal 6,8 a 7,0. (HUERGO, 2006).

Meio de cultura Tryptona Soya: foram adicionados 51g do meio de cultura comercial Tryptona Soya para 1000ml de água destilada e após o preparo o meio foi devidamente autoclavada. Conforme descrito pelo fabricante o meio de cultura possui a seguinte composição:

Composição	gramas/litros
Caseína enzimática hidrolisada	17,00
Digestão papáica de farinha de soja	3,00
Cloreto de sódio	5,00
Fosfato hidrogênio dipotássico	2,50
Dextrose 2,50, Extrato de levedura	6,00
Ágar	15,00
O pH final (a 25°C): 7,3 ± 0,2.	

4.3.2 Tempo e temperatura

As placas foram incubadas na BOD a 30°C entre 24 a 72 horas até o aparecimento de colônias.

4.4 – 1º ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS

4.4.1 Espectrometria de Massa

Colônias isoladas foram coletadas com um palito de madeira e aplicadas em poços de uma placa de MALDI, em seguida, a solução de matrix HCCA foi aplicada sobre a amostra e deixada seca a temperatura ambiente. Espectros de massa foram adquiridos em modo linear positivo utilizando um equipamento AutoflexII da Bruker Daltonics. O equipamento foi pré-calibrado com uma mistura de proteínas purificadas. A aquisição dos espectros foi automatizada bem com o processamento dos dados para gerar as listas de massas de cada isolado. Os espectros de massas foram submetidos à clusterização a fim de determinar a similaridade e relação filogenética entre os isolados. A clusterização foi realizada utilizando o programa Especlust dentro de um pacote de análise ainda em fase de desenvolvimento por alunos do curso de pós-graduação em bioinformática denominado MS analyzer. As árvores geradas foram analisadas e tratadas utilizando o software FIGTREE versão 1.4.3. Em um processo mais adiante as árvores foram utilizadas para selecionar alguns isolados mais distantes filogeneticamente, onde foram submetidos à classificação taxonômica através da amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA.

A aquisição dos dados de espectrometria de massas foi realizada pelo Prof. Luciano F. Huergo. Os espectros de massas obtidos também foram analisados através do programa de identificação de microrganismos baseados em espectrometria de massa de célula intacta (Biotyper – Bruker Daltonics).

4.5 – 2º ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS

4.5.1 Reação da Cadeia de Polimerase – PCR

Para realizar a reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi utilizado: 25 µl do mix que são os conjuntos de primers 27F: 5'- AGR GTT YGA TYM TGG CTC AG-3' e 1492R: 5'- RGYTACCTTGTTACGACT 3' ou S-D-Bact-0341-b-S-17: 5'- CCTACGGGNGGCWGCAG-3' e S-DBact-0785-a-A-21: 5'-

GACTACHVGGGTATCTAATCC- 3', junto com 0,5 µl da enzima Taq DNA Polimerase e 1 µl de massa da célula diluída correspondente de cada amostra. O DNA de cada uma das amostras foi obtido coletando uma pequena massa da colônia do isolado, após foram colocados junto a um eppendorf com 50 µl de água autoclavada, centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm, a fim de obter apenas o sobrenadante da amostra. Processo esse determinado como ferve.

Na reação de PCR foram feitos o controle negativo com água e foram usadas as seguintes condições de tempo e temperatura: uma vez 95°C por 5 minutos, foram realizados 30 ciclos no termociclador 95°C 30 segundos, 51°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos e por último 72°C por 10 minutos.

A visualização do DNA foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, conforme descrito por SAMBROOK *et al* (1989), com modificações. Logo após houve o tratamento com brometo de etídio, e visualizado em transluminador de luz ultravioleta.

4.5.2 Purificação do DNA

As amostras foram submetidas a purificação de produto de PCR, por meio do Kit – PureLink PCR Purification Kit. Foram realizadas algumas modificações assim descritas: foram colocados 80µL de B2 junto a reação de PCR e centrifugado por 1 minuto a 12.000 rpm e descartados. Após o descarte do material, foram adicionados no mesmo eppendorf 650µL de Wash Buffer, centrifugado por 1 minuto e descartado. O mesmo eppendorf foi centrifugado pela segunda vez por 2 minutos até estar totalmente seco. Tendo por última etapa a troca dos eppendorf, foram adicionados 25µL de tampão E1 e deixado por 1 minuto em temperatura ambiente, passado um minuto foram centrifugados por 2 minutos e armazenadas.

4.5.3 Amplificação, Sequenciamento e análise do gene 16S rRNA

O PCR foi realizado utilizando os iniciadores do gene 16S rRNA universais 27F e 1492R podendo amplificar 1500 pares de base e S-D-Bact-0341-b-S-17 e S-D-Bact-0785-a-A-21 que amplificam 500 pares de base. As sequencias dos primers são descritas da Tabela 1. A amplificação de DNA foi realizada utilizando o sistema de reação em cadeia da polimerase (PCR) (KOCHER e WILSON, 1991). Para a

maioria das reações de amplificação foram utilizados: 1µl de bigdye, 2µl save Money 5x, 1µl do primer e 6µl do DNA do isolado já purificado por meio do kit. Tendo um volume final de reação de 10µl.

As amostras de DNA foram submetidas uma vez 95°C por 5 minutos, foram realizados 30 ciclos no termociclador 95°C 30 segundos, 51°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos e por último 72°C por 10 minutos. Após o termino dos ciclos, as amostras foram submetidas aos pós sequenciamento com as seguintes etapas: em cada eppendorf foram adicionados 30µl de água e 60µl de isopropanol, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 12.000 rpm e descartadas. Após foram adicionados 400µl de etanol 80% e centrifugado novamente por 20 minutos a 12.000 rpm. Houve o descarte e os eppendorfs foram deixados para secar na estufa a temperatura de 30°C até estarem totalmente secos. As amostras foram levadas para o laboratório da UFPR em Curitiba onde foram analisadas e geradas as sequencias.

TABELA 1 - PRIMERS UTILIZADO PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S RRNA DAS AMOSTRAS.

PRIMER	SEQUÊNCIA
27F	5'- AGR GTT YGA TYM TGG CTC AG-3'
1492R	5'- RGY TAC CTT GTT ACG ACT 3'
S-D-Bact-0341-b-S-17	5'- CCTACGGGNGGCWGCAG-3'
S-D-Bact-0785-a-A-21	5'- GACTACHVGGGTATCTAATCC- 3'

4.5.4 Análises computacionais de sequência de DNA

4.5.4.1 Comparação das sequências com banco de dados

Após a reação de sequenciamento todas as sequências foram analisadas no programa Bio-Edit versão 7.2.6.0 e editadas manualmente a fim de separar apenas as regiões de boa qualidade. As sequencias foram editadas através das funções mode edit, após editadas foram gerados o contig de cada uma das amostras sequenciadas com determinados primers. O contig possibilita juntar sequencias do

mesmo isolado que foram sequenciadas com diferentes primers, primers esses que amplificam quantidade diferentes de pares de base. Por meio do banco de dados RDP, cada uma das sequencias editadas foram submetidas a função BLAST, onde foram comparadas com os dados depositados no banco de dados que já foram encontrados por meio de outros trabalhos. Através da ferramenta BLAST é possível identificar a similaridade com gêneros e espécies, juntamente com a porcentagem de identidade que corresponde a identificação.

4.6 ATIVIDADE NITROGENASE

A atividade de nitrogenase foi realizada pelo método de redução do acetileno a etileno (DILWORTH,1966; SCHOLLHORN e BURRIS, 1967 apud HUERGO, 2006). Isolados do gênero *Streptomyces* e *Bacillus*, os quais apresentaram crescimento em meio de cultura sem a adição de NH_4^+ foram submetidas ao teste quanto a atividade de nitrogenase em meio semi-sólido.

A atividade de nitrogenase em meio semi-sólido foi realizada em frascos de vidro 12mL contendo 4mL de meio M9 (sem NH_4^+) na proporção de 19,5mL do meio na forma liquido e 5,5mL do meio da forma solida. Como inóculo foi utilizado 10 μL a 200 μL da bactéria cultivada por meio de agitação com barra magnética em meio de cultura LB no período de 48 - 72horas a 30°C. Após 12 – 24horas de crescimento a 30°C, os frascos foram vedados com rolhas de borracha e então injetado acetileno gasoso (10% do volume da fase gasosa do frasco), a cultura foi incubada nas mesmas condições por 19 horas. Após esse período foi coletada uma amostra de 0,5mL da fase gasosa para análise do etileno formado por cromatografia. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso equipado com uma coluna de Porapak N e detector de ionização de chama. A temperatura da coluna foi mantida em 120°C e do detector em 200°C. O gás de arraste foi o nitrogênio. Para o cálculo do etileno formado foi utilizado um padrão de etileno fornecido pela White Martins S.A. A atividade da nitrogenase foi expressa como nmol de etileno total formado por minuto por miligrama de proteína total na cultura. (HUERGO, 2006).

4.7 ATIVIDADE CELULOLÍTICA

4.7.1 Meio de cultura

Os meios de cultura utilizados para verificar a produção de enzimas celulolíticas pelos isolados continham carboximetil celulose, Celulose Cristalina ou Xilana. Como meio base foi utilizado o meio mínimo M9 e amônio 40mM como fonte de nitrogênio. Como única fonte de carbono, foi adicionado Carboximetil celulose na concentração de 10,0g/L, Celulose Cristalina na concentração de 10g/L ou Xilana na concentração de 10g/L. O controle positivo de crescimento neste meio foi realizado utilizando Glucose 10g/L como fonte de carbono.

Para confirmação da produção de enzimas celulolíticas as placas de cultivo foram coradas com vermelho congo diluído em água destilada na concentração de 1% (0,3g para 300ml). Foi adicionado 15mL do corante vermelho congo, onde permaneceu em repouso por 20 minutos. O excesso do corante foi retirado e adicionado 15mL de NaCl (1mol/L) a placa, deixando em repouso por 30 minutos. O excesso de NaCl foi removido e os halos de degradação de carboximetil celulose e xilana foram determinados pela inspeção visual das placas.

5 RESULTADO

Os resultados foram divididos em duas partes, sendo resultado 1° correspondente ao primeiro ponto de coleta e resultado 2° correspondente ao segundo ponto de coleta.

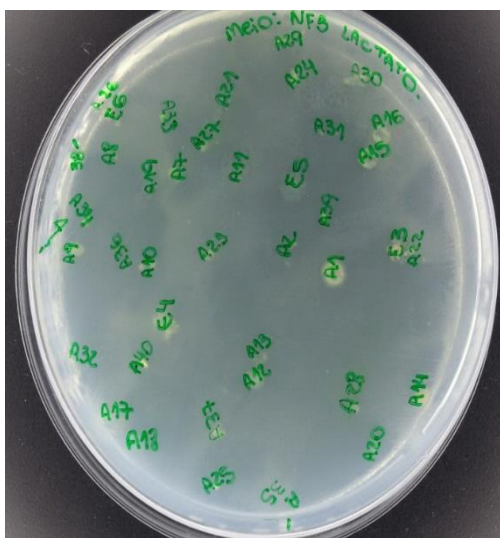
5.1 – 1° COLETA DAS AMOSTRAS DE MANGUE

Para o presente estudo foram determinados dois pontos de coleta. O primeiro ponto de coleta foi realizado no Sítio Sambaqui - Cabaraquara, localizado em Guaratuba, PR. As amostras foram coletadas manualmente e trazidas ao laboratório da UFPR em dois tubos falcon.

5.1.2 Prováveis bactérias fixadoras de nitrogênio.

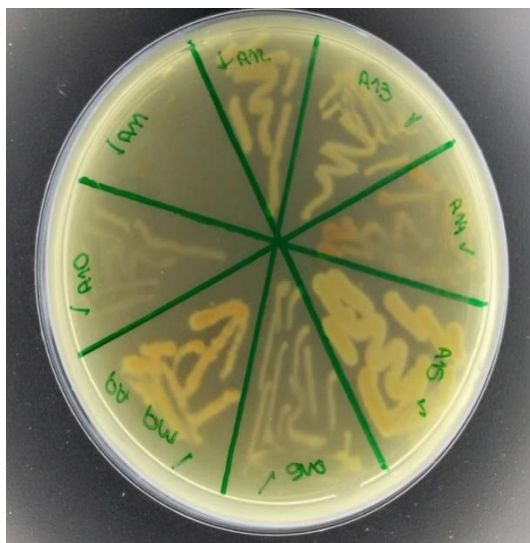
Com o objetivo de obter o crescimento de bactérias capazes de fixar nitrogênio, as diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-4} foram cultivadas no meio de cultura NFB Lactato sem NH_4 , possibilitando que haja o crescimento da bactéria a partir da fixação de nitrogênio. Após 24 – 144 horas de incubação na temperatura de 30°C , houve a identificação de 40 colônias. Foram selecionadas cada uma das colônias e identificadas de A1 a A40 (figura 4), as quais foram cultivadas no meio de cultura M9 sem NH_4 , em forma de quadrantes individuais como é possível observar na figura 5.

FIGURA 4 – BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS



Foram identificadas um total de 40 colônias nomeadas com as iniciais A1 a A40 que apresentaram crescimento em meio NFB lactato sem nitrogênio.

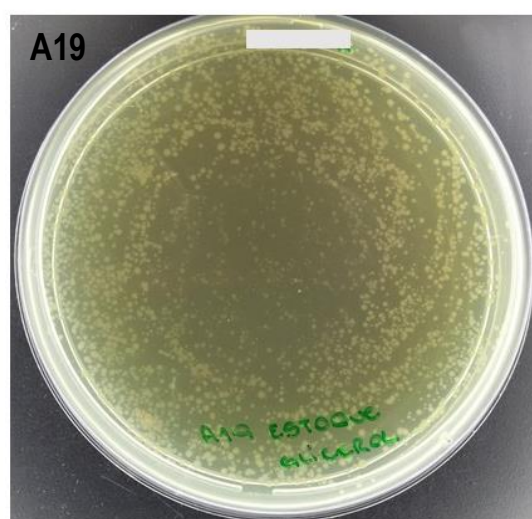
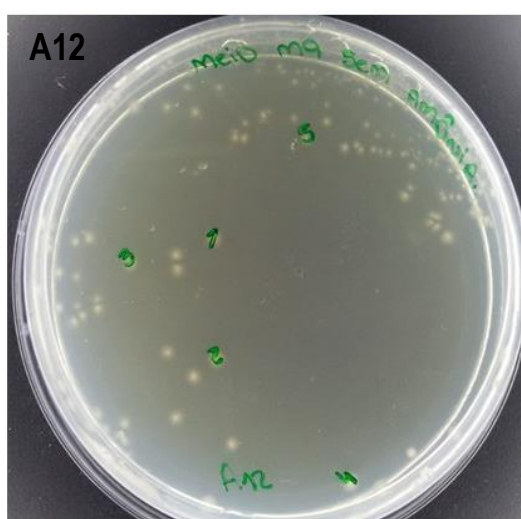
FIGURA 5 – BACTERIAS ISOLADAS EM QUADRANTES.



As bactérias foram cultivadas em meio de cultura M9 sem fonte de nitrogênio.

Após o cultivo das 40 colônias, houve a seleção de apenas 20 colônias que apresentaram bom desempenho no meio de cultura M9 sem nitrogênio. Cada um dos 20 isolados foram cultivados novamente apenas dois isolados, denominados A12 e A19, apresentaram bom crescimento (Figura 6).

FIGURA 6 – ISOLADOS A12 E A19



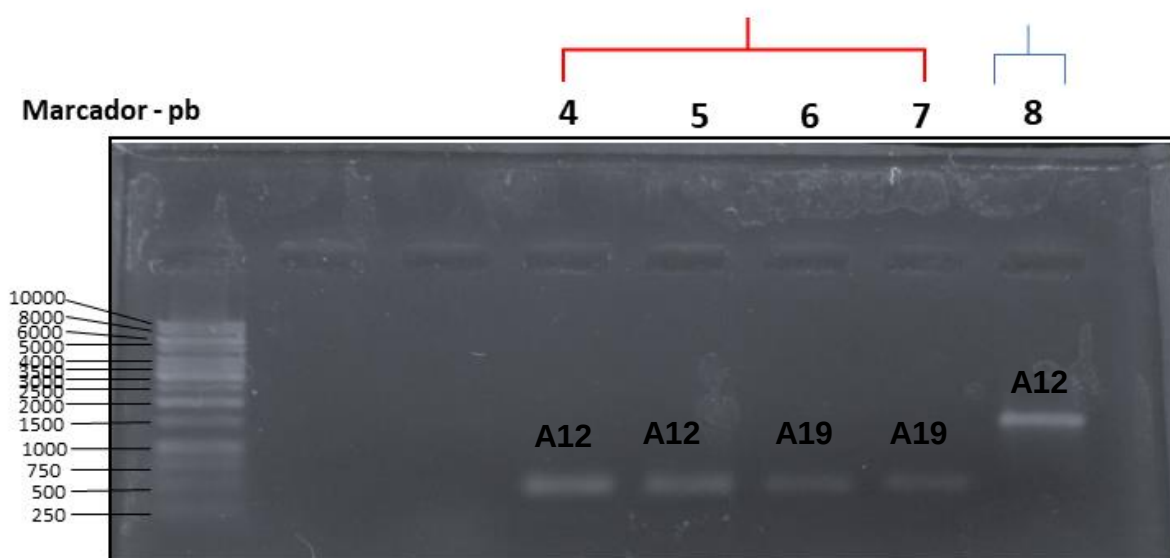
É possível perceber pequenas colônias concentrada ao redor de toda a placa. O crescimento foi obtido entre 12 – 24 horas à 30°C em meio M9 sem fonte de nitrogênio.

Os resultados obtidos na figura 6 sugerem que os isolados A12 e A19 são capazes de formar colônias em meio sem nenhuma fonte de nitrogênio o que sugere que estes isolados poderiam ser diazotróficos capazes de utilizar nitrogênio atmosférico.

5.1.3 PCR dos isolados A12 e A19.

A fim de se determinar a qual grupo taxonômico pertencem estes isolados o gene 16S rRNA foi analisado. Para isto foi realizada uma reação de PCR usando DNA molde dos isolados A12 e A19 e os primers 27F (5'- AGRGTTYGATYMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'- RGYTACCTTGTTACGACT 3') ou S-D-Bact0341-b-S-17 (5'- CCTACGGGNGGCWGCAG-3') e S-D-Bact-0785-a-A-21 (5'- GACTACHVGGGTATCTAATCC- 3'). O esperado era a amplificação do DNA dos isolados que correspondesse a quantidade de pares de bases de cada mix de primers. O resultado obtido foi uma banda de aproximadamente 1500 pb com o conjunto de primer 27F/1492R e uma banda de 500pb como conjunto de primer S-D-Bact0341-b-S-17/ S-D-Bact-0785-a-A-2. É possível notar na Figura 7, a reação de PCR amplificou o tamanho esperado.

FIGURA 7 – ELETROSFORESE DE DNA DOS ISOLADOS A12 E A19



Eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose horizontal conforme descrito por SAMBROOK et al (1989), com modificações. O DNA foi visualizado, após tratamento com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), em transiluminador de luz ultravioleta. A primeira linha corresponde ao marcador que indica os pares de base de DNA. As colunas 4 e 5 corresponde ao isolado A12 onde é possível observar à amplificação de 500pb. Nas colunas 6 e 7 corresponde ao isolado A19 onde é possível observar à amplificação de 500pb. A coluna 8 corresponde ao isolado A12 onde é possível observar à amplificação de 1500pb.

5.1.4 Sequenciamento, análise e identificação das sequências de 16S rRNA

Os isolados A12 e A19 tiveram os produtos de PCR purificados através do Kit – Purelink PCR Purification. Com o objetivo de obter a classificação taxonômica e identificação dos isolados, esses foram sequenciados a partir do gene 16S rRNA, com os primers 27F (5'- AGRGTTYGATYMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'- RGYTACCTTGTTACGACT 3') e S-D-Bact0341-b-S-17 (5'- CCTACGGGNGGCWGCAG-3') e S-D-Bact-0785-a-A-21 (5'- GACTACHVGGGTATCTAATCC- 3').

As sequências geradas foram analisadas no programa Bio-Edit onde foram editadas e analisadas por meio do banco de dados NCBI. Os isolados apresentaram similaridade com as espécies *Streptomyces mirabilis* e *Bacillus* como é apresentado na tabela 2. (Os pares de base podem ser encontrados no Apêndice 1).

TABELA 2 – RESULTADO DA IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS A12 E A19 POR MEIO DO SEQUENCIAMENTO GENE 16S RRNA

Código do isolado	Pares de base sequenciado	Similaridade		Identidade (%)	Banco de dados
		Gênero	Espécie		
A12	350 pb	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces mirabilis</i>	100%	RDP
A19	442 pb	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus nealsonii</i>	100%	RDP

O resultado da identificação de similaridade foi obtido através das sequencias de DNA alinhadas utilizando o programa BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) como mostrado na figura 8 e figura 9.

FIGURA 8 – ISOLADO A12 STREPTOMYCES MIRABILIS

Streptomyces mirabilis strain MadaFrogSkinBac.DB-.2906 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MF526752.1](#) Length: 752 Number of Matches: 1

Range 1: 395 to 744 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
647 bits(350)	0.0	350/350(100%)	0/350(0%)	Plus/Plus
Query 1	GAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT	60		
Sbjct 395	GAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT	454		
Query 61	ACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCT	120		
Sbjct 455	ACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCT	514		
Query 121	ACGTCGGGTGTGAAAGACCGGGGCTTAACCCCGGTTCTGCATTGATACGGGCTAGCTAG	180		
Sbjct 515	ACGTCGGGTGTGAAAGACCGGGGCTTAACCCCGGTTCTGCATTGATACGGGCTAGCTAG	574		
Query 181	AGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGG	240		
Sbjct 575	AGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGG	634		
Query 241	AACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG	300		
Sbjct 635	AACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG	694		
Query 301	GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGA	350		
Sbjct 695	GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGA	744		

FIGURA 9 – ISOLADO A19 BACILLUS NEALSONII

Bacillus nealsonii strain ARP2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MH517579.1](#) Length: 1427 Number of Matches: 1

Range 1: 96 to 537 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
817 bits(442)	0.0	442/442(100%)	0/442(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACCGGATAATCCTTTTCTACTCATGTAGAAAAGCTGAAAGACGGTTTACGCTGTCACTTA	60		
Sbjct 96	ACCGGATAATCCTTTTCTACTCATGTAGAAAAGCTGAAAGACGGTTTACGCTGTCACTTA	155		
Query 61	CAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCTACCAAGGCGACGATG	120		
Sbjct 156	CAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCTACCAAGGCGACGATG	215		
Query 121	CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA	180		
Sbjct 216	CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA	275		
Query 181	CGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG	240		
Sbjct 276	CGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG	335		
Query 241	TGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAG	300		
Sbjct 336	TGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAG	395		
Query 301	TAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG	360		
Sbjct 396	TAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG	455		
Query 361	CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAG	420		
Sbjct 456	CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAG	515		
Query 421	GCGGTCCTTTAAGTCTGATGTG	442		
Sbjct 516	GCGGTCCTTTAAGTCTGATGTG	537		

5.1.5 Atividade de nitrogenase com os isolados A12 e A19.

Com o objetivo de analisar a atividade de nitrogenase nos isolados A12 e A19 identificados pelo crescimento em meio de cultura sem a adição de NH_4 como sendo realmente bactérias diazotróficas, a atividade da enzima nitrogenase foi determinada pelo método de redução de acetileno a etileno. Foram utilizados 9 frascos de vidro, com a quantidade de 10 – 200 ml como inóculo, sendo todos os frascos identificados com a descrição do isolado A12 e A19 assim como a quantidade do inóculo adicionada a cada frasco (Figura 10). Com o inóculo adicionado ao meio de cultura semi-sólido, era esperado a formação de uma película abaixo da superfície do meio. Após 12 – 24 horas de crescimento foi possível observar a formação das películas em cada um dos frascos, possibilidade a provável identificação de bactérias capazes de fixar nitrogênio, corroborando os resultados obtidos para o cultivo em placa.

FIGURA 10 – CRESCIMENTO DO ISOLADO A19 NO MEIO SEMI-SÓLIDO



É possível observar a formação da película na parte superior do meio semi-sólido (mostrado com o auxílio de um círculo). Sucessivamente houve a formação da película em cada um dos frascos de vidro cultivados.

Após o crescimento em meio semi-sólido foi injetado o acetileno gasoso, era esperado que os isolados A12 e A19 convertessem o acetileno em etileno. A fase gasosa foi analisada por cromatografia gasosa mas apenas o acetileno foi

observado sem pico significativo de etileno, sugerindo a ausência da atividade da enzima nitrogenase. Com o cultivo em meio semi-sólido foi possível identificar a formação de película, levando a considerar a possível fixação de nitrogênio.

Duas hipóteses podem explicar a ausência de atividade da nitrogenase. Uma delas é que no momento em que o acetileno foi injetado a nitrogenase não estivesse ativa, desta forma seria necessária à realização de um experimento tipo curva de tempo a fim de determinar o melhor momento para avaliação da atividade da enzima. Alternativamente, estes isolados podem não ser fixadores de nitrogênio e apresentarem capacidade de crescer em meio sem nitrogênio devido a uma habilidade excepcional de extrair quantidades mínimas de nitrogênio fixado do meio ou mesmo do ar atmosférico. De fato, há relatos na literatura de isolados de *Streptomyces* que foram inicialmente caracterizados como diazotróficos devido a capacidade de crescer na ausência de nitrogênio fixado, porém, análises posteriores incluindo sequenciamento genômico, indicam que não se tratam de fixadores de nitrogênio

5.2 – 2º COLETA DAS AMOSTRAS DE SOLO DO MANGUE

As amostras de mangue foram coletadas no Rio Boguaçu nas proximidades do sítio arqueológico Sambaqui, localizado em Guaratuba, PR, o segundo ponto de coleta. Foram divididos o segundo ponto de coleta em seis áreas amostrais sendo 3 áreas estabelecidas no solo de manguezal e 3 áreas estabelecidas nas proximidades de sedimentos de Sambaqui (conchas).

5.2.1 Isolamento de bactérias

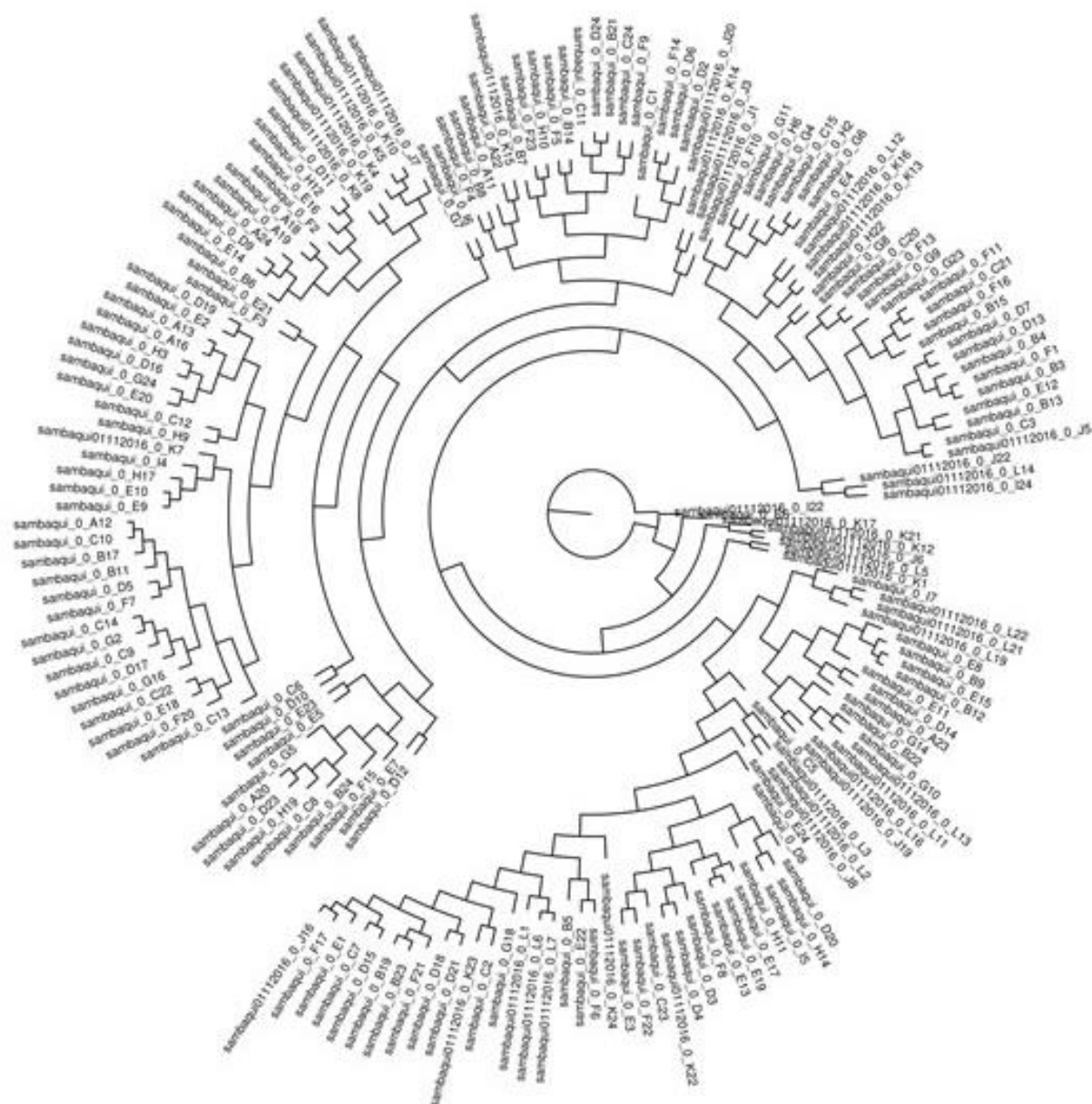
O isolamento de bactérias partiu de diluições seriadas 10^{-2} a 10^{-4} sendo cultivados em apenas dois meios de cultura LA e Tryptona Soya. No período de 24 – 120 horas a 30°C. Foi possível identificar após esse período o cultivo de 312 isolados nas diluições 10^{-2} e 10^{-3} . Foram identificados um baixo número de isolados na diluição 10^{-4} e foram descartadas.

5.2.2 Isolados submetidos a Espectrometria de Massa

Todos os 312 isolados de bactérias a partir das amostras nomeadas como mangue e sambaqui foram submetidas a análise de célula completa de MALDI-TOF MS e os espectros obtidos foram agrupados utilizando o algoritmo Speclust (Alm et al., 2006), resultando no cladograma mostrado na Figura 11. A aquisição e análise inicial dos espectros foram realizadas pelo Prof. Luciano F. Huergo.

A análise de espectrometria de massa possibilita identificar isolados que estejam duplicados na mesma placa ou que sejam muito próximos taxonomicamente, sendo um processo bem rápido, o objetivo de realizar a análise foi identificar os isolados muito próximos para remover a redundância em análises posteriores.

FIGURA 11 – DENDOGRAMA GERADO COM DADOS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS MALDI-TOF MS DE CÉLULA INTACTA



Cladograma de 259 bactérias isolados a partir do mangue/sambaqui com base em espectros de massa MALDI-TOF MS. O cladograma foi construído utilizando o método average linkage a partir de distâncias calculadas usando semelhança correlação métrica no software SPECLUST; incerteza de medição foi definida como 5.0 Da.

5.2.3 Identificação dos isolados através do sistema de MALDI-Biotyper.

Os espectros foram analisados através do sistema de MALDI-Biotyper que possibilita a identificação de identidade de microrganismos em nível de espécie comparando com banco de dados. Foi possível identificar 15 isolados cultivados do solo de manguezais, os quais apresentaram semelhanças com cinco gêneros de bactérias e quatro diferentes espécies de bactéria (Tabela 3). A baixa taxa de identificação era esperada, uma vez que a base de dados Biotyper é principalmente para espécies bacterianas clinicamente relevantes.

TABELA 3 – RESULTADO DE MALDI-BIOTYPER. OS ISOLADOS COM SCORE ENTRE 1,8 E 2 IDENTIFICA GÊNERO E ACIMA DE 2 ESPÉCIE.

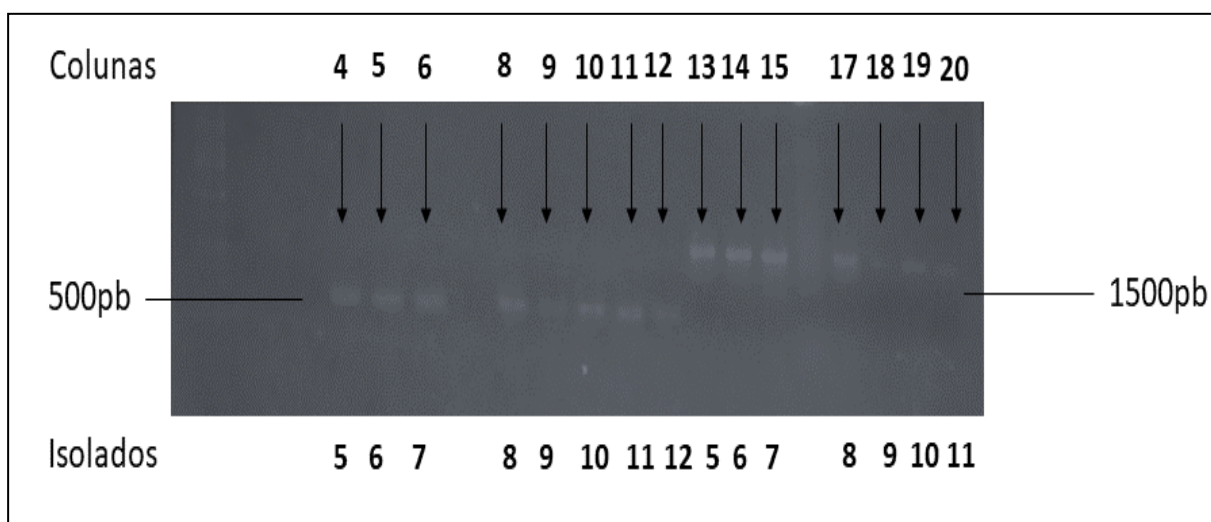
Código do Isolado	Score Biotyper	Gênero	Espécie
A12	1,988	<i>Vibrio</i>	?
A20	2,007	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>
B7	1,779	<i>Lysinibacillus</i>	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
B11	2,163	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
B17	2,007	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
C10	1,974	<i>Vibrio</i>	?
C11	2,032	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
C14	1,985	<i>Vibrio</i>	?
D5	1,731	<i>Vibrio</i>	?
D8	1,967	<i>Bacillus</i>	?
D15	2,048	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus vietnamensis</i>
E11	1,995	<i>Paenibacillus</i>	?
E16	1,750	<i>Vibrio</i>	?
F15	1,797	<i>Brevibacillus</i>	?
G16	1,851	<i>Vibrio</i>	?

5.2.4 Amplificação do gene 16S rRNA dos isolados cultiváveis.

Com os dados gerados ainda através da espectrometria de massa houve a seleção de 60 isolados. Os isolados foram cultivados novamente através de meios de cultura, entre 7 - 14 dias para obter o cultivo de todos os isolados. Entre os dias de cultivo observou-se o crescimento de apenas 10% dos isolados selecionados.

Dos isolados cultivados houve a seleção de 9 isolados supostamente distintos filogeneticamente os quais foram submetidos a reação de PCR com o mix dos primers 27F (5'- AGRGTTYGATYMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'- RGYTACCTTGTTACGACT 3') ou S-D-Bact0341-b-S-17 (5'- CCTACGGGNGGCWGCAG-3') e S-D-Bact-0785-a-A-21 (5'- GACTACHVGGGTATCTAATCC- 3'). O resultado obtido foi uma banda de aproximadamente 1500 pb para o primeiro conjunto de primers e uma banda do tamanho de 500pb para o segundo conjunto de primers. Através da figura 12 é possível observar a amplificação esperada.

FIGURA 12 – ELETROFORESE DE DNA DOS ISOLADOS SELECIONADOS



Eletroforese de DNA realizado com os mesmos métodos descritos por SAMBROOK et al (1989), com algumas alterações. Nas colunas 1,2,3,4,5,6,7 e 8, a reação de PCR amplificaram o esperado com 500pb, correspondente a ordem dos isolados 5,6,7,8,9,10,11,12. Nas colunas 9,10,11,12,13,14 e 15 à reação de PCR amplificou aproximadamente 1500pb, correspondente a ordem dos isolados 5,6,7,8,9,10 e 11.

5.2.5 Sequenciamento, Análise e identificação das sequências de 16S rRNA com o banco de dados RDP

Os 9 isolados tiveram os produtos de PCR purificados através do Kit – Purelink PCR Purification. Com o objetivo de obter a classificação taxonômica e identificação dos isolados, esses foram sequenciados a partir do gene 16S rRNA, com os primers 27F (5'- AGRGTTYGATYMTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-

RGYTACCTTGTTACGACT 3'), S-D-Bact0341-b-S-17 (5'-
CCTACGGGNGGCWGCAG-3'), S-D-Bact-0785-a-A-21 (5'-
GACTACHVGGGTATCTAATCC- 3'). As sequências geradas foram analisadas no programa Bio-Edit onde foram editadas e analisadas por meio do banco de dados NCBI. Os isolados apresentaram similaridade com gêneros *Bacillus* e *Lysinibacillus* como é apresentado na tabela 4. Mais de 50% dos isolados apresentaram 100% de identidade com determinados gêneros e espécies.

TABELA 4 - RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S

Código do isolado	Pares de base sequenciado	Similaridade		Identidade (%)	Banco de dados
		Gênero	Espécie		
5	1286 pb	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus xiamenensis</i>	100%	RDP
6	1430 pb	<i>Bacillus</i>	-	100%	RDP
7	1208 pb	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus koreensis</i>	100%	RDP
8	480 pb	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	99%	RDP
9	381 pb	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus xiamenensis</i>	100%	RDP
10	1300 pb	<i>Lysinibacillus</i>	-	100%	RDP
11	356 pb	<i>Vibrio</i>	-	99%	RDP
12	576 pb	<i>Bacillus</i>	-	100%	RDP
13	774 pb	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	100%	RDP

Foi possível identificar a mesma similaridade com a espécie de *B. xiamenensis* entre os isolados 5 e 9. Estes dois isolados tiveram suas sequencias de 16S rRNA comparadas entre si o que revelou 100% de identidade sugerindo que se trata do mesmo isolado, FIGURA 13. Todas as sequências foram depositadas no GenBank sob os números **MH156556**, **MH156563**, **MH156646** e **MH156647**.

FIGURA 13 – IDENTIDADE DE ESPÉCIE B. XIAMENENSIS

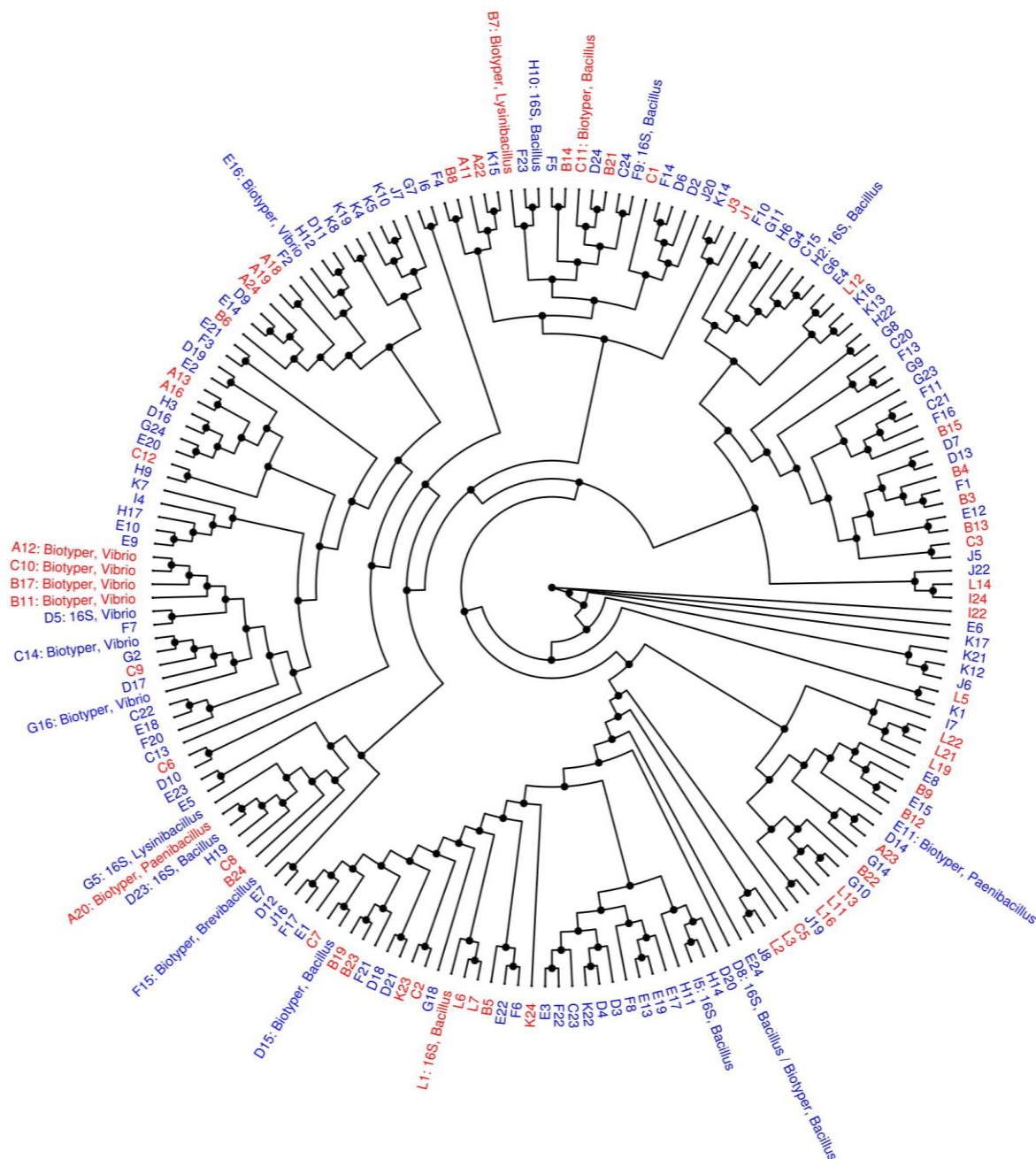
Sequence ID: Query_48793 Length: 381 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 381 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
704 bits(381)	0.0	381/381(100%)	0/381(0%)	Plus/Plus
Query 227	CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG	286		
Sbjct 1	CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG	60		
Query 287	TGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAAGAG	346		
Sbjct 61	TGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAAGAG	120		
Query 347	TAACTGCTTGACCATGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG	406		
Sbjct 121	TAACTGCTTGACCATGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG	180		
Query 407	CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAG	466		
Sbjct 181	CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAG	240		
Query 467	GCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACT	526		
Sbjct 241	GCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACT	300		
Query 527	GGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA	586		
Sbjct 301	GGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA	360		
Query 587	GATGTGGAGGAACACCACTGG	607		
Sbjct 361	GATGTGGAGGAACACCACTGG	381		

O sistema de MALDI-Biotyper e o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, possibilitou a identificação de um total de 22 isolados cultivados. O cladograma gerado através da espectrometria de massa foi editado por meio do programa Fig Tree v1. 4.3, tornando possível observar a proximidade de similaridade entre os isolados. (Figura 14).

FIGURA 14 – PROXIMIDADE ENTRE OS ISOLADOS IDENTIFICADOS POR MEIO DO MALTI- BIOTYPER E 16S.

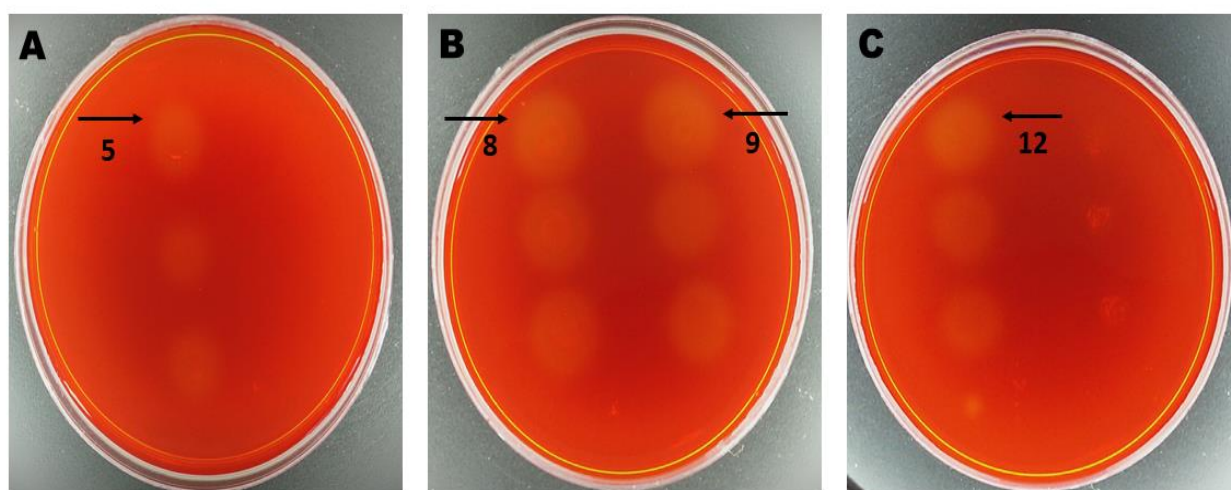


O cladograma foi editado usando as funções taxa e annotate no programa Fig Tree v1. 4.3. As letras seguidas por números apresentados no cladograma corresponde ao poço de cada um dos isolados. Os isolados são diferenciados pelo ambiente amostral que foram coletados. A cor azul identifica os isolados coletados no ambiente de manguezal e vermelho os isolados cultivados no ambiente de manguezal juntamente com conchas de sitio arqueológico Sambaqui. Foi possível obter a identificação de isolados por meio do MALTI – Biotyper e sequenciamento 16S rRNA descrito no cladograma.

5.3 ANÁLISE DE ATIVIDADE CELULOLÍTICA DOS ISOLADOS 5, 8, 9 E 12.

A produção de enzimas com atividade celulósica pelos isolados foi realizada por um método simples de cultivo em meio mínimo contendo Carboximetilcelulose, Celulose ou Xilana como únicas fontes de carbono, seguido de coloração da placa com vermelho congo que permite a visualização de halos de hidrólise destes polissacarídeos. Foram selecionados 9 isolados já identificados através do sequenciamento do gene 16S. Os isolados foram cultivados em três meios de cultura sendo no meio Carboximetilcelulose, apresentaram possibilidade quanto a atividade de degradação de celulose. Com o objetivo de analisar a atividade de cada um dos isolados, os mesmos foram submetidos ao teste com o corante vermelho congo já diluído em 1%. (Figura 15).

FIGURA 15 – RESULTADO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA



Com o auxílio de um prego esterilizado, os isolados foram plaqueados no devido meio de cultura de forma triplicata. **Figura A-** Isolado 5, **Figura B-** Isolado 8 e 9, **Figura C-** Isolado 12. É possível visualizar os halos nos 4 isolados os quais tiveram como única fonte de carbono Carboximetilcelulose. Todos os isolados foram identificados como gênero *Bacillus* a partir do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

6 DISCUSSÃO

6.1 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO A12 E A19

Utilizando os meios de cultura M9 e NFB Lactado sem fonte de nitrogênio foram selecionadas prováveis bactérias capazes de realizar fixação biológica de nitrogênio. A fixação biológica de nitrogênio é realizada por bactérias diazotróficas, que tem a capacidade de transformar (fixar) o nitrogênio atmosférico em formas assimiláveis, como a amônia (NH_3) (HUNGRIA, 2007). Bactérias diazotróficas podem ser encontradas no solo. Estudos já realizados descrevem o solo como o principal habitat para os microrganismos, principalmente os procariontes. De acordo com Das *et al* (2006), entre as atividades desempenhadas pelos microrganismos no ambiente de manguezais, estão a fotossíntese e a fixação de nitrogênio. Neste ambiente os microrganismos também se destacam pela produção de antibióticos e enzimas hidrolíticas capazes de degradar biomassa vegetal em decomposição.

A partir do sequenciamento parcial do gene que codifica para o 16S, os isolados apresentaram similaridade com os gêneros *Streptomyces* e *Bacillus*. O gênero *Streptomyces* se destaca pela grande demanda de estudos, devido ao impacto econômico obtido por meio dos metabólitos produzidos, dentre os quais destacam-se os policetídeos e peptídeos não ribossômicos (CRUZ, 2011). São bactérias de gram-positivas e aeróbias, segundo Rehm (1993 apud CRUZ 2011), *Streptomyces* são encontradas na natureza em solos ricos em detritos orgânicos e crescem em microcolônias, possuindo a função de degradar biopolímeros como lignocelulose, polifenóis, quitosanas, queratinas e pectinas. Antibióticos produzidos a partir do gênero *Streptomyces* possuem funções variadas entre elas: bactericidas e agentes antifúngicos. Já o gênero *Bacillus* apresentou 100% de similaridade com a espécie *B. nealsonii*. Chauhan *et al*, (2015) descreve o bom desempenho da espécie na produção de enzimas que podem ser aplicadas em indústrias diversificada em celulose, alimentos, entre outros. Segundo Venkateswaran *et al* (2003), são espécies gram-positiva que se desenvolve entre os pH 6-10 e podem produzir enzimas galactosidase, enzima essa com grande desempenho na produção de alimentos com baixo teor de lactose (SANTIAGO *et al.*, 2004).

Os isolados foram submetidos ao teste da atividade de nitrogenase após cultivo em meio M9 semi-sólido sem fonte de nitrogênio fixado. Os isolados apresentaram um ótimo crescimento nos meios de cultura semi-sólido, mas não

foram capazes de converter acetileno em etileno o que implica na ausência de atividade da enzima nitrogenase nas condições do ensaio.

No estudo realizado por MacKellar *et al* (2016), a espécie de *Streptomyces thermoautotrophicus* cepas apresentou a possibilidade de desempenho quanto a fixação biológica de nitrogênio, pelo “crescimento mínimo em meio isento de amônio”, no entanto, o autor constata o crescimento altamente eficientes da espécie e a proximidade com bactérias diazotróficas, mas não são bactérias fixadoras de nitrogênio pois não apresentam genes que codificam para a enzima de nitrogenase. Trabalho recente realizado por Dahal *et al* (2016, p.37), mostra o isolamento de bactérias *Streptomyces* que quando submetidas a testes apresentaram capacidade de fixar nitrogênio, embora o mesmo trabalho discuta a possibilidade da nitrogenase “destes isolados *Streptomyces* não serem tão promíscua como a nitrogenase Nif clássica e não reduza o acetileno”.

Espécies de *Bacillus* isolados a partir de amostras de solo de manguezal desempenham grande potencial quanto a fixação de nitrogênio. Ao estudar o manguezal de Cananéia – SP, Castro (2011), identificou a capacidade de fixação de nitrogênio em 47% dos isolados avaliados, sendo grande parte dos isolados do gênero *Bacillus*. Outros autores também relatam bons resultados quanto ao isolamento bacteriano em solo de manguezal e seu grande potencial biotecnológico entres outras funções (CORREIA *et al.*, 2014; ROCHA, 2008 e RIBEIRO, 2010).

Uma vez que o isolado submetido a atividade de nitrogenase não apresentaram índices quanto a fixação de nitrogênio, pode-se considerar que a formação da película no meio mínimo semi-sólido se deu a traços de nitrogênio presente no próprio meio de cultura. Podendo considerar também o momento inadequado na análise de nitrogenase onde os isolados não estariam realizando a fixação de nitrogênio. Com base em alguns autores Dahal *et al* (2016), descreve que a não identificação de fixação de nitrogênio pode ser devido a condições experimentais, “pois fatores como concentração de oxigênio, agente solidificante e tempo de incubação influenciam o nível de atividade fixadora de nitrogênio”.

6.2 IDENTIFICAÇÃO POR MEIO DO SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S

O sequenciamento do gene 16S é considerada como uma técnica muito eficiente para a classificação taxonômica de microrganismo de amostras ambientais (RONDON *et al.*, 1999 *apud* NETTO, 2007). O estudo realizado teve como um de

seus objetivos, identificar a diversidade de procariontes que se faz presente no ambiente de manguezal, assim como a função que desempenham no ambiente escolhido para ser estudado. No ambiente de manguezal, já se sabe que procariontes possuem a função de contribuir na formação dos solos e da vegetação, já outros procariontes podem ser redutores de sulfato, sendo os principais decompositores da matéria orgânica, uma vez que processos como a ciclagem dos nutrientes estão diretamente relacionadas com a atividade e diversidade das comunidades microbiana do solo (CURY, 2002).

Entre os gêneros de bactérias identificadas através do sequenciamento do gene 16S, com amostras do solo de manguezal no entorno do rio Boguaçu, Guaratuba – PR. O gênero *Bacillus* teve número de identificação, seguido pelo gênero *Lysinibacillus*. O gênero *Bacillus* é constituído por bactérias com formação de endósporo com grande resistência ao calor (SANHUEZA, 2007), tendo como principal habitat o solo, onde possuem um papel importante no ciclo do carbono e do nitrogênio (GARRITY *et al.*, 2007). No trabalho realizado por Castro (2011), com o objetivo de estudar a comunidade bacteriana endofítica associadas aos manguezais, o gênero *Bacillus* se destaca como sendo um dos gêneros com maior isolados identificados.

Além da determinação do gênero de cada um dos isolados, foi possível identificar a similaridade com 4 espécies de *Bacillus* e 1 espécie de *Lysinibacillus*. Entre as espécies identificação, a espécie de *Bacillus pumilus* faz parte da diversidade de bactérias endofítica que desempenham funções quanto ao crescimento vegetal das plantas e a defesa da planta contra patógeno. (MELO, 2005). Melo (2005), descreve a atividade de *B. pumilus* em inibir o crescimento de fungos patogênicos bioativos. No presente trabalho o isolado que apresentou similaridade a espécie de *B. pumilus* demonstrou desempenho quanto a produção de enzimas com atividade celulolítica, juntamente com o isolado similar a espécie de *B. xiamenensis*.

Com o resultado obtido é possível sugerir que os procariontes que vivem no ambiente de manguezal têm grande potencial biotecnológico. Estudos já realizados demonstram a diversidade estrutural e funcional desses procariontes no ecossistema manguezal. Correia *et al* (2014), ao isolar bactérias de sedimentos de mangue da Lagoa de Araçá – PE, identificou bactérias capazes de produzir enzima amilase,

protease, lipase, catalase, fosfolipase e citrato sintase com percentuais entre 59% e 83% respectivamente.

Alguns trabalhos já realizados descrevem a importância de realizar estudos sobre a atividade e diversidade de bactérias em solo de mangue brasileiro, visto que esses estudos são quase inexistentes. Em seu trabalho Cury (2002), tendo como objetivo estudar as variações de atividade e diversidade metabólica e genética da comunidade microbiana em solo de mangue contaminado com petróleo, o autor ressalta a importância do desenvolvimento desses estudos de forma a ser úteis para a avaliação do impacto causado por ações antrópicas, contribuindo para a geração de índices de qualidade biológica de solos e para o melhor entendimento desse ecossistema pouco estudado.

7. CONCLUSÕES

- Foram identificados ao todo 6 gêneros e 10 espécies de bactérias em dois pontos amostrais do solo de manguezal;
- O gênero *Bacillus* teve o maior número de isolados identificados;
- Dentre os isolados cultiváveis, 4 isolados apresentaram resultado quanto a atividade celulolítica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, A. et. al. **A proteção dos ecossistemas de manguezais pela legislação ambiental brasileira.** Revista GEOgraphia. ano17, n. 33, abril. 2015.

ALMEIDA, R. N. A. **Desenvolvimento, validação e aplicação de métodos molecular baseado na análise do rRNA para a identificação das bactérias formadoras de biofilme metabolicamente ativas na superfície de membrana de osmose reserva.** Área de concentração: Biotecnologia. USP/Instituto Butantan/IPT. (Dissertação Mestrado). São Paulo, 2009.

ATLAS dos Manguezais do Brasil. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2018.

BARCELLOS, P. A. O. et al. **As representações sociais dos professores e alunos da escola municipal Karla Patrícia, Recife, Pernambuco, sobre o manguezal.** Ciência & Educação, v.11, n. 2, p. 213-222, ano. 2015.

BRASIL. Lei nº12.651, de 25 de maio de 2012. Dispõe sobre o novo Código Florestal.

CASTRO, R. A. **Estudo da comunidade bacteriana endofítica cultivável associada aos manguezais de Cananéia e Bertioga – SP.** Área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo. (Dissertação Mestrado). Piracicaba, 2011.

CHAUHAN, P. S. et al. **Cloning, molecular modeling, and docking analysis of alkali-thermostable β -mannanase from *Bacillus nealsonii* PN-11.** Appl Microbiol Biotechnol, maio. 2015.

COELHO, R, S, et al. **Identificação de bactérias degradadoras de fluidos de corte por análise dos ácidos graxos.** Revista ACTA Tecnológica - Revista Científica - ISSN 1982-422X, v. 6, n. 2, p. 64-68, jul-dez. 2011.

Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 20., 2004, Florianópolis – SC. CORREIA, J.L.A.; SANTOS, T.R. dos.; SILVA Jr, A. A.; MARQUES, O.M. **Isolamento, Identificação e Avaliação do Potencial Enzimático de Bactérias Autóctones de Sedimento de Manguê da Lagoa do Araçá** – PE. Florianópolis – SC: COBEQ, 2014.

Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, 5º., 2011, Campinas – SP. GIOVEDY, J, S. et al. **Isolamento e Caracterização de Bactérias Celulolíticas de Serrapilheira da Caatinga**. Campinas – SP, 2011.

CORREIA, M. D.; SOVIERZOSKI, H. H. **Ecosistema marinho: recifes, praias e manguezais**. Editora da Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2005.

CRUZ, P. L. R. **Mapeamento do potencial Biossintético em linhagem de *Streptomyces***. Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Química. (Dissertação Mestrado). Campinas, SP, 2011.

CURY, J. C. **Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de manguê contaminado por petróleo**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

DAHAL, B. et al. **Diversity of free-Living nitrogen fixing *Streptomyces* in soils of the badlands of South Dakota**. Microbiological Research, v. 3. n. 195, p. 31-39, nov. 2016.

DAS, S.; LYLA, P. S.; KHAN, S. A. **Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives**. Current Science, v. 90, n. 10, 2006. Disponível em: <http://www.iisc.ernet.in/~currsci/may252006/1325.pdf> . Acesso em: 08/02/2016.

DENG, Y. WANG, S. Y. **Complex carbohydrates reduce the frequency of antagonistic interactions among bacteria degrading cellulose and xylan**. FEMS Microbiol Lett. mar. 2017.

GARRITY, G. M. et al. **The Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea**. TOBA Release 7.7, Michigan State University Board of Trustees, 2007.

GOI, S.R.; DE SOUZA, F.A. **Diversidade de Microrganismos do solo**. Departamento de Ciências Ambientais, IF, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Rio de Janeiro, 2006.

HUERGO, L. F. **Regulação do Metabolismo de Nitrogênio em Azospirillum brasilense**. Tese (apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

HUNGRIA, M. A; CAMPO, R. J; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação de nitrogênio para a cultura de soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro** - Londrina: Embrapa Soja, Embrapa Cerrados, 2007.

JAG, V. et al. **Genome sequencing and description of Oerskovia enterophila VJag, an agar- and cellulose-degrading bacterium**. Standards in Genomic Sciences, maio. 2017.

JESUS, M. S. RODRIGUES, T. B. **Isolamento e purificação de bactérias associadas a amostras de solo do Bioma Caatinga com potencial celulolítico e lignolítico**. Revista de Inovação, Tecnologia e Ciências (RITEC), v. 1, n. 1, p. 1-11, 2015.

JÚNIOR, F; REIS, V.M. **Algumas limitações à fixação biológica de nitrogênio em leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008.

LIMA, L. R. et al. **Nanocristais de Celulose a partir de Celulose Bacteriana**. Quim. Nova, v. XY, n. 00, p. 1-8, agot. 2015.

MACKELLAR, D. et al. **Streptomyces thermoautotrophicus does not fix nitrogen**. Scientific Reports, 2016.

MELO, F. M. P. **Atividade antifúngica secundários produzidos pelo endófito de mandioca *Bacillus pumillus* MAIIM 4^a**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. (Dissertação Mestrado). Piracicaba, 2005.

MOREIRA, F. M. S. et al. **Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicação**. Comunicata Scientiae 1(2). pg 74-99. 22 novembro 2010. Seção Solo e Água.

NETTO, O. V. C. **Identificação de bactérias contaminantes de fermento de cachaça por sequenciamento de gene 16S rDNA**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. (Dissertação Mestrado). Piracicaba, 2007.

RIBEIRO, C. G. **Diversidade Procariótica em Sedimentos de dois Manguezais, com distintos níveis de Poluição, no Complexo Estuarino de Paranaguá, Paraná, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Sistemas Costeiros e Oceânicos) - Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, Pontal do Sul, 2010.

ROCHA, L. L. **Estudo de comunidade bacterianas de solos do manguezal da Barra Grande, Icapui – CE e seleção de cepas com potencial para degradar hidrocarbonetos**. Área de concentração: Utilização e Manejo de Ecossistema Marinho (Dissertação Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do mar. Fortaleza, 2008.

ROESCH, L. F. W. et al. **Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho**. Revista Brasileira de Ciências do solo (online). v. 31, n.6, p. 1367-1380, 2007.

SÁ, B. L. A. **Diversidade de Rizobactérias Endoglucolíticas Isoladas de Mangue Vermelho. (*Rhizophoramangle*)**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo - Tese defendida pelo Programa de pós-graduação em Biotecnologia. São Paulo, 2008.

SACCO, L. P. **Isolamento de bactérias produtoras de enzimas de interesse em processos biotecnológicos**. Dissertação mestrado - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2013.

SANHUEZA, R. M. V.; MELO, I. S. **Métodos usados no biocontrole de fitopatógenos**. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, 2007.

SANTIAGO, P. et al. **Estudo da produção de b-galactosidade por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus***. Ciência, Tecnologia e Alimentos. Campinas, v. 24, p.567-572, out-dez. 2004.

SILVEIRA, É. L da. **Identificação de Comunidades Bacterianas de Solo por Sequenciamento do GENE 16S rRNA**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, São Paulo, 2004.

SU, X. et al. **Resuscitation of viable but non-culturable bacteria to enhance the cellulose-degrading capability of bacterial community in composting**. Microbial Biotechnology, v. 11, n. 3, p. 527-536, mar. 2018.

VAL-MORAES, S. P. et al. **Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças**. Revista Ciências Agronômica, Fortaleza – CE. v. 40, n. 1, p. 7-16, jan-mar. 2009.

VENKATESWARAN, K. et al. **Bacillus nealsonii sp. nov., isolated from a spacecraft-assembly facility, whose spores are γ -radiation resistant**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. n. 53, p. 165-172, 2003.

VIEIRA, D. A. de P.; QUEIROZ, N.C. de A. **Microbiologia Geral**. Inhumas: IFG. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

WETLER-TONINI, R. M. C. REZENDE, C. E. GRATIVOL, A. D. **Degradação e Biorremediação de compostos do petróleo por bactérias**. Oecologia Australis, n. 14, p. 1010-1020, dez. 2010.

ZILLI, E. J. et al. **Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo**. Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília. v. 20, n. 3, p. 391-411, set/dez. 2003.

APÊNDICE 1

Pares de base do sequenciamento 16S do isolado A12:

GAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCT
CGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGGTGTGAAAGACCGGGGCTTAACCCCGGTTCT
GCATTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTG
TAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCT
CTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGA

Pares de base do sequenciamento 16S do isolado A19:

ACCGGATAATCCTTTTCTACTCATGTAGAAAAGCTGAAAGACGGTTTACGCTGTC
ACTTACAGATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC
AAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG
ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTA
AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACG
GTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTC
CTTTAAGTCTGATGTG

ANEXO I – ARTIGO APROVADO PARA PUBLICAÇÃO

Partes dessa monografia foram usadas na publicação do artigo *Influence of ancient anthropogenic activities on the mangrove soil microbiome*.



Influence of ancient anthropogenic activities on the mangrove soil microbiome

Luciano F. Huergo^{a,*}, Daniel V. Rissi^b, Andressa S. Elias^a, Maria V. Gonçalves^a, Marcos V. Gernet^a, Flávio Barreto^a, Gilson W. Dahmer^a, Rodrigo A. Reis^a, Fábio O. Pedrosa^c, Emanuel M. Souza^c, Rose A. Monteiro^c, Valter A. Baura^c, Eduardo Balsanelli^c, Leonardo M. Cruz^{c,*}

^a Setor Labor, UFPR, Marilândia, PR, Brazil

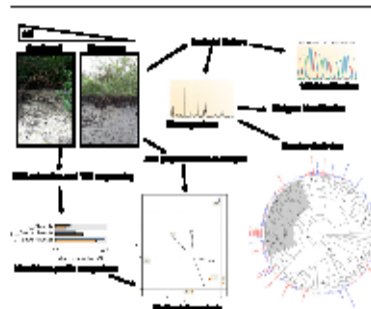
^b Programa de pós-graduação em Bioinformática, SEPT, UFPR, Curitiba, PR, Brazil

^c Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR, Curitiba, PR, Brazil

HIGHLIGHTS

- Impact of archeological Sambaqui soil on mangrove microbiome
- Changes in microbiome of pristine and archeological Sambaqui in mangrove soils
- Resilience of microbiome mangrove soil to changes in soil pH

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 April 2018

Received in revised form 7 July 2018

Accepted 8 July 2018

Available online xxx

Editor: Frederic Guibin

Keywords:

Biodiversity

Mangrove

16S sequencing

MALDI-TOF/MS

Sambaqui

ABSTRACT

Mangroves are highly productive ecosystems located at the transition between the terrestrial and marine environments. Mangroves play an important role in carbon storage, nutrient cycling and support for the marine food web. Mangrove soils are formed by fine particles rich in organic carbon and are subject to constant fluctuations in oxygen, salinity and nutrient availability due to fresh water flux and tidal variations. Microbes play an important role in nutrient cycling in mangrove soils; however, studies on the mangrove soil microbiome are scarce. Here we compare the microbiome of pristine mangrove soil located in an environmentally protected area in Guaratuba, Southern Brazil, with the microbiome of mangrove soil affected by the presence of carbonaceous debris eroding from an archeological site known as Sambaqui. We show that although the Sambaqui site has a major effect on soil chemistry, increasing the soil pH by 2.6 units, only minor changes in the soil microbiome were detected indicating resilience of the microbial community to pH variations. The high alpha diversity indexes and predicted metabolic potential suggest that the mangrove soil microbiome not only provides important ecological services but also may host a broad range of microbes and genes of biotechnological interest.

© 2018 Published by Elsevier B.V.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: huergo@ufpr.br (L.F. Huergo), leonardo@ufpr.br (L.M. Cruz).

1. Introduction

The Atlantic forest biome hosts a significant portion of Brazilian biological diversity and is considered as a “hot spot” of biodiversity by UNESCO. This biome is one of the most threatened on the planet with <8% of its original forest remaining (Caramori et al., 2006). The major remnants of continuous Atlantic forest are located on the coast of the Paraná state, due to the presence of several Public and Private Conservation Units within this region (Tiepolo, 2015).

A particularly important ecosystem within the Atlantic forest is the mangrove, representing waterlogged areas located at the transition between the terrestrial and marine environments in estuarine regions (Alongi, 2014). Due to their typical characteristics such as salinity, oxygen and pH variations, there are just few plant species adapted to survive under these conditions (Alongi, 2014). Mangrove ecosystems are important environments for the protection and reproduction of many animal species, including arthropods, fish, amphibians, reptiles, birds and mammals (Hassain and Nuruddin, 2016).

Mangroves occupy 0.5% of the global coastal area (approximately 138,000 km²), and Brazilian mangroves represent 7% of the global mangrove area (Alongi, 2014; Gidi et al., 2011). Mangroves are highly productive ecosystems, providing support to the marine and terrestrial food web and contributing 10–15% to coastal sediment carbon storage; they export of 10–11% of the particulate terrestrial carbon to the ocean (Alongi, 2014). It has been estimated that the carbon biomass in mangrove soil is about three times the biomass that makes up the mangrove vegetation (Hassain and Nuruddin, 2016). The mangrove ecosystem is claimed to play an important role in climate regulation, contributing to carbon sequestration and helping counterbalance anthropogenic CO₂ emissions (Alongi, 2014). However, this ecosystem is disappearing at an alarming rate and its loss will contribute to climate change (Atwood et al., 2017). Anthropogenic activities such as city expansion, ports, contamination by oil spills, domestic sewage, agriculture and other uses are the main threat to this ecosystem (Alongi, 2014).

Mangrove sediments in Brazil are typically formed by river and marine alluvium deposits, with the texture mainly comprising silt and clay in the fine fractions, combined with high concentrations of organic

matter and salts, resulting in a dark grey colour commonly defined as mud (Hassain and Nuruddin, 2016). The water tidal cover, along with fine texture and organic matter observed in mangrove sediments produce a gradient from aerobic conditions (on the surface), where degradation of organic matter occurs mainly through aerobic respiration, to anaerobic processes, creating conditions for anaerobic decomposition including sulphate reduction that produces H₂S giving the mangrove soil a typically strong odour (Hassain and Nuruddin, 2016; Ghisellini et al., 2012).

Given the unique physicochemical characteristics of mangrove soil such as oxygen, salinity and pH variations, this ecosystem is very diverse in microbial life forms (Mendes and Tied, 2018) and hence it is a promising repository of microbes and genes of biotechnological interest (Dantas et al., 2013). There are only a few studies that describe the composition, ecology and dynamics of the mangrove soil microbiome in Brazil (Ghisellini et al., 2012).

Shell middens are archaeological sites found in coastal zones all over the globe. These sites are spread all over the Brazilian coast line and are known as *Sambaquis* (Oliveira and Egers, 2005; Gernet et al., 2014). *Sambaquis* consist mainly of mollusk shells that are waste products of meals eaten by groups of hunter-gatherer-indigenous people that lived in the area between 2000 and 10,000 years ago (Schmidt-Ybert, 2001). Sites reaching up to several metres high and areas up to 300,000 m² have been described (Pacina and Kippel, 1974; Esteviz et al., 2001).

The structure of *Sambaqui* is typically arranged in layers with varying composition that are likely to reflect the occupation of these sites by different groups (Fig. 1), with the bottom layer representing the debris of the most ancient groups. It is common to find stone artifacts, cooking fire and human remains inside the *Sambaqui* suggesting that these sites were general waste deposits. Some *Sambaqui* sites have been characterized at the social-cultural anthropological perspective (Pacina and Kippel, 1974; Shipman and Barrett, 1986). However, there is no report on pedology or microbiome analysis of *Sambaqui* soils.

Several *Sambaqui* sites have been described along the coast of Paraná state in Brazil (Bignarella, 2011). In this study we focused on a

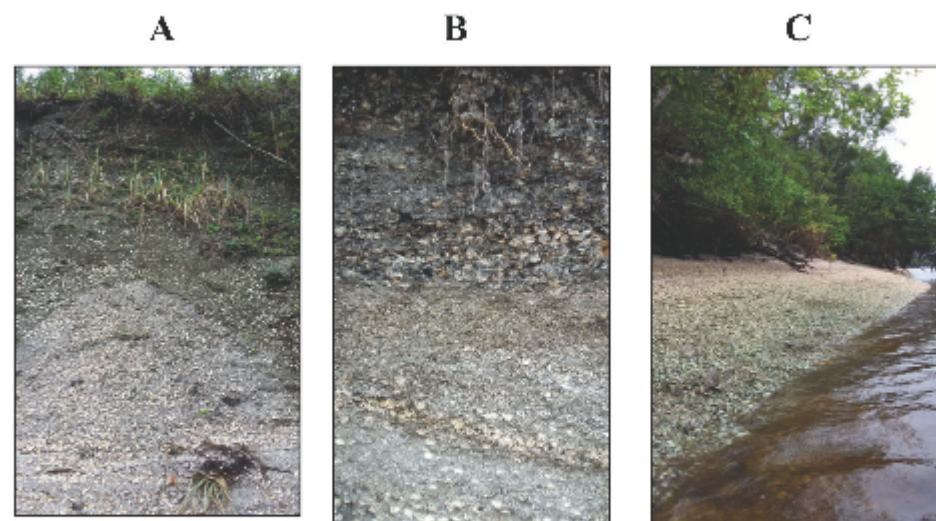


Fig. 1. The Sambaqui do Baguari, Southern Brazil. (A) View of the Sambaqui from the left margin of the Baguari river. The top is 7 m high from the directed stream bed. (B) Different layers of shell debris that represent the chronological history of the site. (C) View from the base of the Sambaqui at the left margin of the Baguari river.

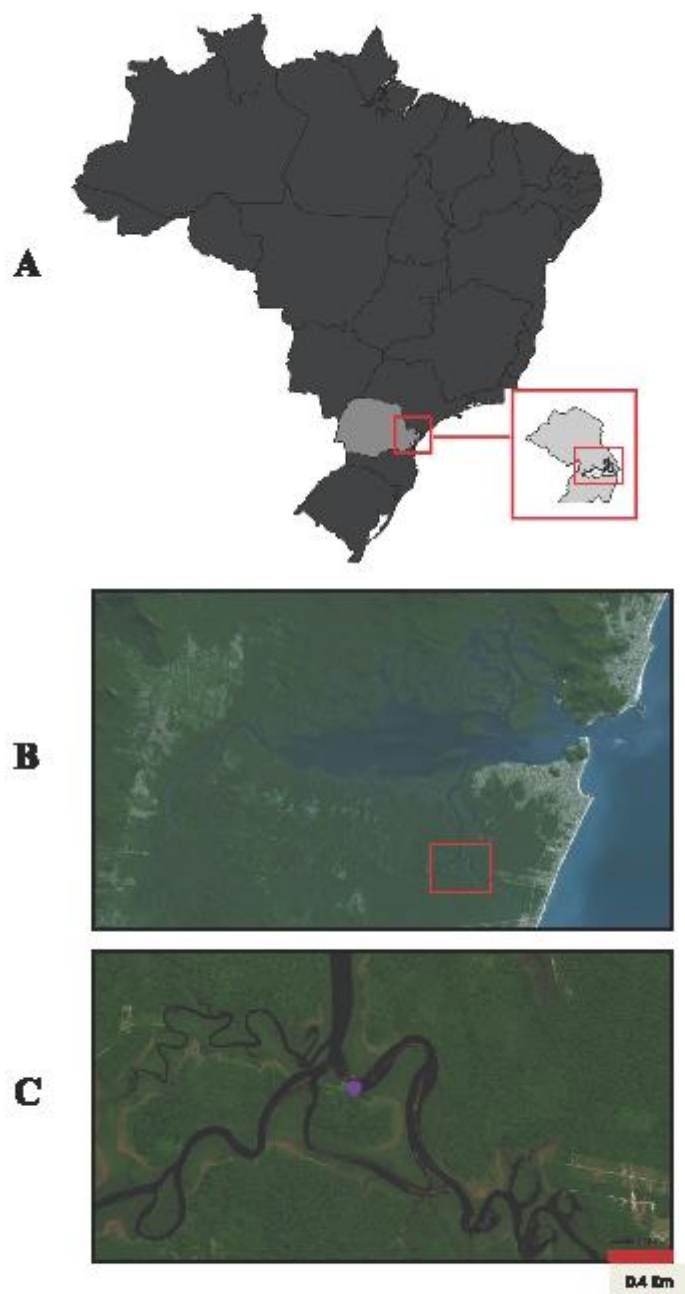


Fig. 3. The site of study and sampling location at São José do Bonfim, Pernambuco, Brazil. (A) Map of Brazil showing the location of Pernambuco state in gray. Pernambuco is shown in the inset and the location of São José do Bonfim is indicated in red. (B) Satellite image of the São José do Bonfim Bay, the study area is marked by red square and amplified in the image. (C) Satellite image of the collection site indicated with a purple dot (red bar scale = 0.4 km). Maps were generated using Qgis (http://qgis.org/en/site/whats_new/index.html). Satellite images were acquired from <http://www.google.com/maps/>. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Sambaqui built over a mangrove area in the Beaguary River which is part of the Guasubaba bay estuary (Figs. 1 and 2). We analyzed how the presence of this Sambaqui site influences the physicochemical and microbial composition of the nearby mangrove soil.

2. Material and methods

2.1. Sampling and experimental design

The Sambaqui Beaguary is located at the margin of the Beaguary river at Ilha do Campeiro, Guaratuba Bay estuary, Paraná, Brazil (25° 55' 11" S/48° 37' 33" W). This Sambaqui is 7 m high and is likely to date between 10,000 and 2000 years ago (Nogueira, 2011). Two sampling areas were defined. One consisting of pristine mangrove soil located 30 m from the Sambaqui site (Figs. 1 and 2). The other area is where the mangrove soil is covered and naturally mixed with the shells that are eroding from the Sambaqui itself (Fig. 1). Three samples were collected from each site for statistical comparison. In order to reduce local variations, each of these three samples was made up of a composite sample of three sub-samples 2 m distant from each other along the same tide line.

Samples were collected at low tide on October 25, 2016. PVC pipes with 10 cm diameter and 15 cm in length were used to collect blocks of soil (Fig. S1), three blocks (sub-sample) were collected in a plastic bag and homogenized to make up one composite sample. Loose shells were manually removed from the soil surface before collection. Samples had their total DNA extracted and were diluted for bacterial cultivation 2 h after collection at the Setor Liberal, Universidade Federal do Paraná, Marilhões, Paraná, Brazil.

2.2. Heterotrophic bacteria counts, mass spectrometry and 16S rRNA gene sequencing

A 1 g sample of each replicate of the pristine and Sambaqui-affected soils were diluted with 9 mL of sterile saline (10^{-1} dilution), after vigorous vortexing for 10 min, 100 μ L of serial dilutions 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4} were spread on LB agar containing cycloheximide 50 μ g mL $^{-1}$ to inhibit the growth of fungi. Plates were incubated aerobically at 30 °C for 48 h for counts of Colony Forming Units (CFU) counting. A sample of each isolates (259 colonies) were collected with a toothpick, spread on a MALDI plate and subjected to whole cell mass spectrometry data analysis exactly as described previously (Stein et al., 2013). Mass spectra were acquired automatically. Low quality spectra were removed after manual inspection, leaving 165 isolate spectra to be selected for further analysis.

Mass spectra data were submitted to Bruker Daltonics Biotyper 3.1 software; bacterial identification was achieved through comparison against a database with reference spectra from 7381 organisms. MALDI-TOF MS data were also submitted to an in house automated pipeline (MS analyzer) which uses the peak lists from each isolate and performs hierarchical clustering (UPGMA method) from calculated distances using a correlation similarity metric as implemented in SPICKET (Ali et al., 2006) and with a mass error tolerance of ± 5 Da.

Some isolates were subjected to partial 16S rRNA gene sequencing as described previously (Stein et al., 2013). Isolates were identified by comparing the DNA sequences with those deposited in the Genbank database. All sequences were deposited in Genbank under the accession numbers MH159558 to MH159563, MH159848, and MH159849.

2.3. Soil analysis

The physicochemical characterization of the soil was performed at the Laboratory of Soil Chemistry and Fertility, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil. All the routine analysis was performed according to the Manual de Métodos de Análise de Solo – EMBRAPA (Donagemana et al., 2011). pH was determined in the presence of 10 mM CaCl $_2$ as described (Alvares Jr. et al., 2003).

2.4. Total DNA extraction and Illumina sequencing of the 16S rRNA gene

Total DNA extraction from the soil was performed using the MO BIO Laboratories, Inc. "Power Soil DNA Kit". DNA quality was determined by agarose gel electrophoresis (Fig. S2) and quantity was determined by the Qubit HS dsDNA kit (Thermo). PCR amplification, barcoding and Illumina sequencing was performed as described (Caporaso et al., 2012). Briefly, the V4 region of the 16S rRNA gene was PCR amplified in 10 μ L reactions using 20 ng of template DNA; 1 μ M primer 515P; 1 μ M primer 806R, included in Illumina primers for sequencing; and 5 μ L KlenTag DV ReadyMix (Sigma-Aldrich). The PCR cycles were 94 °C 3 min, 10x (94 °C 45 s, 50 °C 30 s, 68 °C 1 min), 72 °C 10 min. Three PCR technical replicates were performed for each sample. Amplicons were quantified by qPCR with the Kapa HCS quantification kit (Roche) and quality assessed using a 2100 Bioanalyzer (Agilent), and equimolar amounts of the technical replicates were mixed. All batch PCR amplification included a negative control without DNA template in the reaction tube. Two biological replicates amplification and sequencing reactions were performed for each sample using a MiSeq platform and MiSeq 500v2 Reagent Kit (Illumina) single-end reads (250 pb) at the Department of Biochemistry, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil. DNA sequencing data were deposited in GenBank under accession number: (BioProject: PRJNA434505).

2.5. Processing and analysis of DNA sequence data

The sequences were quality analyzed using the fastq tool (Abraham Weinmiller at Babraham Institute, Cambridge, UK; www.biolinformatics.babraham.ac.uk). The sequence datasets of the two biological DNA sequencing replicates for each sample were joined and processed using QIIME v1.9.0 (Kuczynski et al., 2012). The reads were clustered into Operational Taxonomic Units (OTUs) and taxonomy assigned using the 16S SILVA v128 (Quast et al., 2013). Suspect mitochondrial and chloroplast sequences were removed. In order to perform statistical analyses, samples were normalized by the sample with the lowest number of reads. Additional analyses were performed from the abundance table exported in Biom format (McDonald et al., 2012) and imported (directly or in appropriate format) in MetaCoMET (Wang et al., 2016), STAMP (Parks et al., 2014), and R (R Development Core Team), using the Vegan package, for further quantitative and multivariate statistical analyses. Canonical correspondence analysis (CCA) was performed using "ade4" function in Vegan package. Specific parameters, methods and/or equations for each analysis are presented in details along the text and/or in the figures. Functional prediction based on 16S rRNA gene sequences was performed using Tax4Fun (Anisimov et al., 2015), using SILVA database release 123, and Parallel META-3 (Jing et al., 2017), using the KEGG database (Ogata et al., 1999).

4. Results

In this study we focused on Sambaqui located over a mangrove area in the Beaguary River which is part of the Guaratuba bay estuary (Figs. 1

Table 1
Physicochemical analysis of soil.

Sample	Humd	SD	Clay	pH	AP ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	P	C
M1	723	109	113	4.7	8.5	3.1	4.5	0.73	45	32
M2	713	124	163	3.6	2.8	3.6	4.8	0.77	60	34
M3	723	113	108	3.9	1.9	3.3	4.8	0.72	60	30
A1	784	88	125	5.5	ND	5.3	4.1	0.80	119	18
A2	784	113	100	5.0	ND	3.6	4.8	0.53	123	16
A3	784	100	113	5.5	ND	7.0	4.5	0.54	119	22

Humd, SD and Clay are given in g kg $^{-1}$, pH was determined in the presence of CaCl $_2$ 10 mM, AP⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ and K⁺ soils are cmol dm $^{-3}$, P and C are given in mg kg $^{-1}$ and g kg $^{-1}$, respectively. C represents organic carbon, ND, not detected.

^a Significant differences at $p < 0.05$.

and 2), an environmental protected area. The Sumbagat Boguapí is 7 m high and the Boguapí river flow, tidal variations and wind erosion spreads the Sumbagat shells all over the nearby mangrove area (Fig. 1 and Fig. S1). We hypothesized that the shell deposition over the mangrove soil would create a unique alkaline environment due to carbonate release from the shells and this would affect the soil microbial community. Hence, we initiated a study to compare the physicochemical and microbial composition between gyttie and Sumbagat affected mangrove soil on the Boguapí river, Guaraná, Paraná, Brazil.

Samples from the Sambajal affected soil and nearby pristine mangrove soil (from here on simply named S and M, respectively) were collected and compared with respect to physicochemical properties and microbial composition. In order to determine the number of heterotrophic bacteria, soil samples were serially diluted and plated on LB agar. After 48 h at 30 °C, 5.2×10^4 CFU/g and 7.9×10^5 CFU/g were counted for M and S samples, respectively, suggesting a lower number of bacteria in the Sambajal affected area. The CFU counts are in agreement with lower amounts of total DNA extracted per mg of sample in the

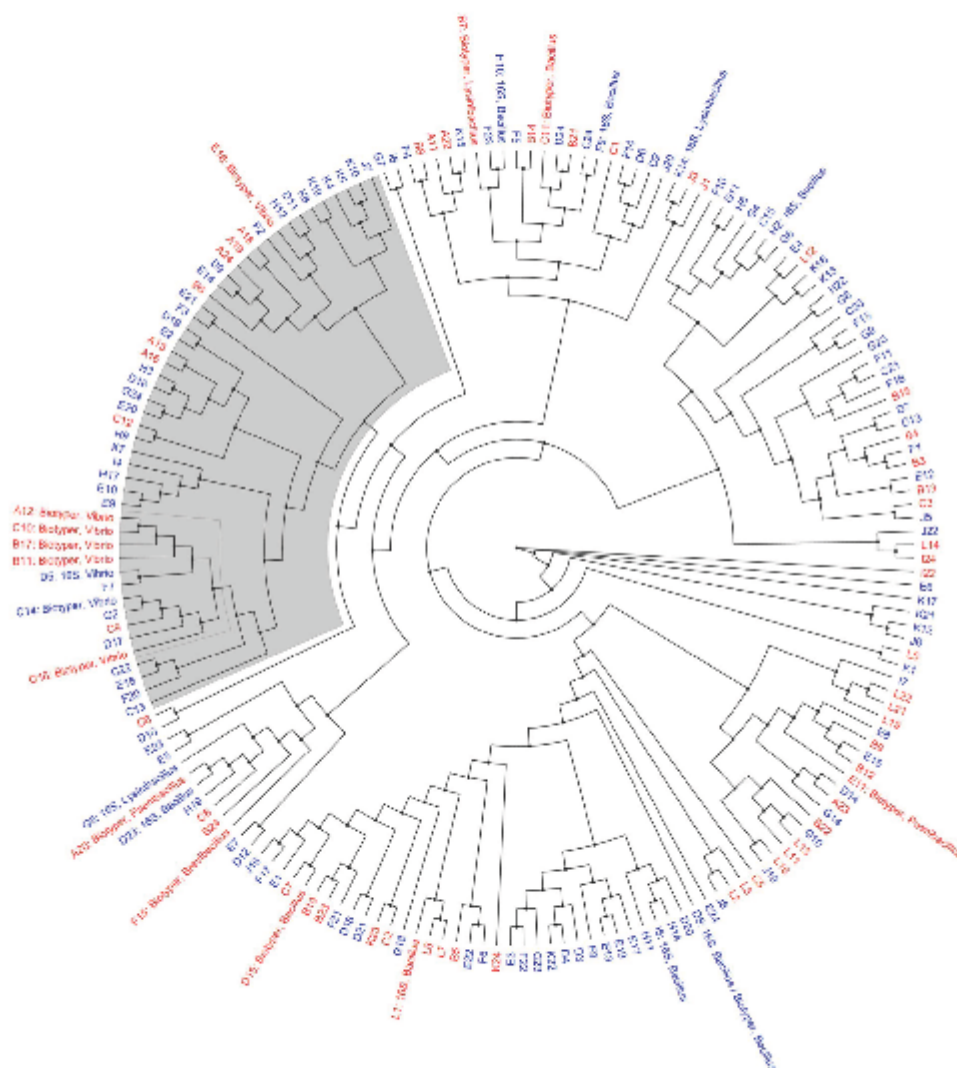


Fig. 3. Phylogenetic tree of *AMV*-YOF virus sequences from cultured isolates from polistine wasps and *Saccharal* complex from *Saccharal* sp. (Bogdan, Pristina, Bosnia). Each node represents an isolate from polistine: *Megachile* spp. (blue) or *Dacnusa* spp. (red). The isolates which had positive genus identification by Rader Hultner and/or by 16S rDNA gene sequencing are indicated. The branch to *Gyrodactylus* is by comparison of *Variation*. All the other identified organisms belong to *Acetivorus*. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Sambaqui area (Fig. S2) and reduced levels of carbon detected in the soil (Table 1). These data suggest that the Sambaqui soil is less dense in microbial life forms; this may be caused either by its unique chemical composition and/or due to the presence of a high mass of inorganic shell pieces (Fig. S1C).

4.1. Soil physicochemical properties

The physicochemical properties of the pristine and Sambaqui affected mangrove soil were determined. The silt and clay contents were similar for both M and S types of soils. The sand fraction was significantly higher in S samples (Table 1) and this is probably caused by the shell pieces that accumulate in the sand fraction of these samples (Fig. 1). The high amount of shell material may influence pH by carbonate release and H^+ ions neutralization in soil Sambaqui. Although it is not a tested hypothesis, the pH values in Sambaqui samples were significant higher (up to 2.0 units in average) than those values measured in the natural mangrove area (Table 1).

The Ca^{2+} levels were not significant different between the M and S samples, although higher trends were observed in the S samples (Table 1). The detected Ca^{2+} levels in both M and S are high in comparison to most soil types in Brazil (Abrão Jr. et al., 2003), possibly influenced by decomposing shell material and tidal, contributing to spread Ca^{2+} outside Sambaqui soil.

Higher amounts of K^+ and P were detected in the Sambaqui soil. Given that this type of soil exhibited lower organic carbon (Table 1), C/N ratio (see above) and DNA yields (Fig. S2) than pristine soil, the most likely explanation for the increased levels of K^+ and P would be the presence of ancient anthropogenic waste materials such as small pieces of shells and/or bones.

4.2. Heterotrophic bacterial identification and clustering

Aerobic heterotrophic bacteria that were isolated using LB medium were subject to MALDI-TOF mass spectrometry analysis. Out of a total of 258 isolates that were submitted to mass spectrometry, 185 produced good quality data and were subjected to further analysis. Spectra comparison against the Bruker Biotyper database resulted in genus identification for 19 isolates (Table S1) including *Vibrio*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* and *Brevibacterium* (Table S1). The low identification rate was expected since the Biotyper database is mainly composed of clinical relevant bacterial species. Ten randomly selected isolates were subjected to identification by 16S rDNA DNA sequencing (Table S2). This analysis confirmed that *Bacillus*, *Corynebacterium* and *Vibrio* were the most prevalent genera of the isolates cultured in LB medium.

In order to determine the relationship between the isolates, mass spectra data was subjected to clustering (Fig. 3). This analysis, along with the biotyper and 16S rDNA gene based-based identification, allowed to distinguish a branch of isolates that are likely to belong to *Vibrionales*. The remaining isolates belong to different branches and were classified as *Bacillales* (Fig. 3). All the deeper shell nodes identified within the tree contained members shared from both pristine and sambaqui soils (Fig. 3). Hence, despite the different physicochemical properties in these two types of soil they host similar culturable bacteria.

4.3. Metagenomic prokaryotic biodiversity

Total DNA extracted from triplicate M and S samples was subjected to PCR amplification of the V4 region of the 16S rDNA gene and subjected to next generation Illumina sequencing using primers and methodology described in (Caporaso et al., 2012). A total of 73,881 reads of 250 bp in length were considered for 16S rDNA gene biodiversity analysis. Average reads per sample were 12,330 with counts ranging from 8222 to 16,077. Rarefaction plots are shown in Fig. S3.

In all subsequent analysis, samples were normalized by the sample with lowest number of reads, leading a total of 55,332 reads, 8222

Table 2
Alpha diversity analysis.

Sample	Clamp	Shannon	OTUs	PS Type
M1	5745	10.89	3272	197
M2	6281	10.86	3285	197
M3	5584	10.98	3138	180
S1	6388	10.83	3132	177
S2	5407	10.83	3217	183
S3	5576	10.85	3251	183

reads per sample, comprising a total of 7816 OTUs. The two most abundant phyla observed were Proteobacteria 46.0%, Chloroflexi 11.6%, Bacteroidetes 6.4%, Planctomycetes 3.6%, Euryarchaeota 3.3%, Acidobacteria 2.6%, Deferribacteres 2.6%, Latescibacteria 2%, Bathyarchaeota 1.9% and Spirochaetes 1.9% (Fig. S4). Venn diagram (Fig. S5) indicates that, roughly, 50% of all OTUs (3933) were shared between M and S samples and 25% were unique for each sample (1972 and 1911 for the M and S samples, respectively). Alpha diversity indexes were similar between M and S samples (Table 2). Despite the significant differences in soil chemical composition, the general microbial community profile was strikingly similar between M and S samples when compared at the phylum level (Fig. 4). Among the two most representative families were Desulfobacteraceae, Desulfococcaceae and Desulfobulbaceae (Fig. S6), comprising groups of anaerobic sulphate-reducing bacteria typically found in marine sediments.

Even though the two environments had similar Alpha diversity indexes, Beta diversity analysis suggests differences in the abundance of OTUs in each type of soil. This was revealed by the clear separation of the M and S samples in Principal Component Analysis plots when analyzed at lower taxonomic level (Fig. 5, see PCA plots, PC1 vs PC2 and PC1 vs PC3). The hierarchical clustering heat map also separated the M and S samples into different groups and clear differences in the relative abundance of a few OTUs were readily detected (Fig. S7). The distinctive nature of the microbiome composition in the two environments was also detected using UPGMA clustering (Fig. S8).

To identify differences in the abundance of OTUs between the S and M samples, statistical analyses were performed using normalized data. OTUs representing <0.2% of each sample were removed to reduce bias occurring in less representative groups and results were filtered to $p < 0.05$. Chloroflexi and Bacteroidetes decreased, whereas Crenarchaeota increased in the Sambaqui affected soil (Fig. 6A). At the family level,

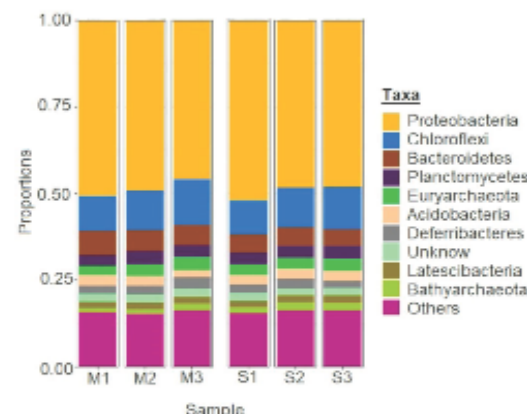


Fig. 4. Relative proportion of OTUs in pristine mangrove (M) and Sambaqui (S) samples from Itaipu, São Paulo, Southern Brazil. (A) The reads from each sample were classified at Order level and the percent of each Order counts is shown in colored bars. (B) OTUs classification using all three replicate S and M samples combined.

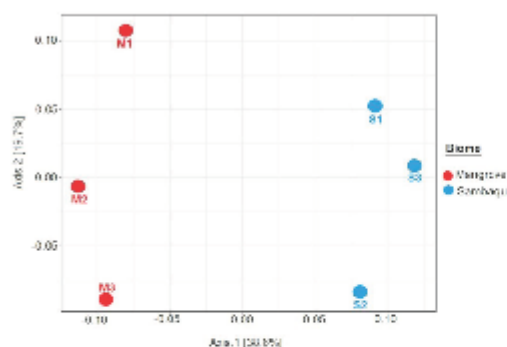


Fig. 8. Principal component analysis (PCA) of OTUs between pristine mangrove (M) and Sambaqui (S) samples from Sambaqui lagoon, Southern Brazil. PCA plots were generated in R7.0.0 using Welch's t-test two sided ($p < 0.05$). OTUs were analyzed at genus level. M and S samples are indicated using blue and orange dots, respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Thiotrichaceae, Phyllobacteriaceae and Ignavibacteriaceae decreased, whereas Comastellaceae, Helicobacteriaceae and Rhodospirillaceae increased in the Sambaqui affected soil (Fig. 6B). Furthermore, a few groups of unclassified bacteria were also significantly different when comparing S vs M samples (Fig. 6B).

Canonical correspondence analysis (CCA) was performed using Bray-Curtis dissimilarity and permutation test with Pseudo F-ratios in order to explore which set of environmental variables had the most influence on the community composition. The CCA plot confirmed the separation between S and M and revealed that pH, Ca, K, Al and Mg are the major factors influencing the M community composition (Fig. 7).

Although the pH was the most evident soil parameter changing between pristine mangrove and Sambaqui soils, beta diversity was partly explained by different soil parameters, other than pH, significantly different in sampling sites (Table 1). Pristine mangrove and Sambaqui soil communities were shaped by gradients of pH and P, in the direction of Sambaqui soil, or K and C, in the direction of pristine mangrove soil (Fig. 7).

4.4. Functional prediction of the microbial community based on 16S rDNA gene sequences

In order to explore the metabolic potential of the microbial communities, a functional prediction based on the 16S rDNA gene sequences

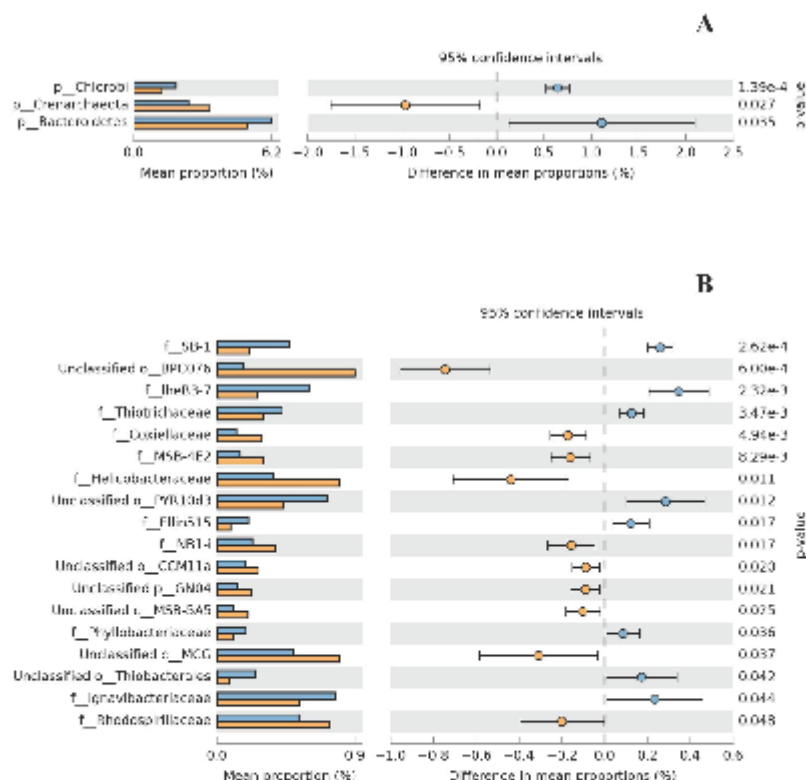


Fig. 9. Statistical significant abundance in OTUs between pristine mangrove (M) and Sambaqui (S) samples from Sambaqui lagoon, Southern Brazil. Mean proportions (bars of significant groups at Phylum (A) and Family (B) levels were generated by R7.0.0 using t-test. Data were filtered for OTUs representing at least 0.2% of the total reads. M and S samples are indicated using blue and orange dots, respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

was performed using TrimAl and Parallel MRETA-3. These computational approaches have a strong correlation with overall shotgun metagenomic sequencing (Amann et al., 2015; Jing et al., 2017). A significant difference between KEGG orthology occurrence between M and S samples was observed (Wilcoxon test $p = 0.00184$), which was expected given the differences in microbial community composition (Fig. 6). However, the general functional profile was very similar between all samples (Fig. S9), confirming and complementing previous diversity analysis at high taxonomic level. Furthermore, from a total of 9851 KEGGs identified, only 70 were statistically significant ($p < 0.01$) between M and S samples (Table S3). Particularly, 19 KEGGs involved in pathogens were more represented in the S samples (Table S3), and this could be explained by the increased counts of potential pathogenic organisms from the Helicobacteriaceae and Clostridiaceae families in the S samples (Fig. S8).

Most of the KEGG hits were mapped to central metabolic pathways (Fig. S10) in both samples. Several hits for KEGGs involved in the biosynthesis of secondary metabolites and antibiotics were found (Fig. S9). Functional prediction identified KEGGs related to carbon, sulphur and nitrogen cycling. Particularly, methane metabolism was well represented (Figs. S9 and S10). All steps of the nitrogen cycle were represented including nitrification, denitrification and nitrogen fixation.

5. Discussion

In this study, we focused on an archaeological Sambauqui site located in Southern Brazil that is eroding over a mangrove soil in order to determine the effects of ancient anthropogenic activities on soil physicochemical properties and in the composition of both the unculturable and culturable microbiome. The comparative analysis between pristine vs Sambauqui-affected mangrove soil revealed that the sea shell deposits in the soil resulted in a pH increase of 2.6 units on average (Table 1). Despite this ~400x difference in molar H^+ concentration, the general unculturable and culturable microbiome profiles of M and S samples

were strikingly similar (Figs. 3 and 4). These data suggest that the overall profile of the mangrove soil microbiome does not change in response to pH which is in stark contrast with dry land soils where pH changes strongly influences the microbial communities (Mendes and Tsai, 2018; Rauer and Jackson, 2009; Lachner et al., 2008). Influence of pH, directly or indirectly (through changes in soil element availability), and other soil parameters was previously reported (Lammert et al., 2013; Zechina et al., 2015), including those observed in this work (i.e., pH, P, K, and C; Fig. 7).

The heterotrophic culturable isolates in this study were classified as Vibrionales and Bacillales corroborating a previous study in Brazilian mangrove sediment (Iltis et al., 2008). The MALDI-TOF biotyper and spectra cluster analysis correlated well with identification results derived from 16S rRNA gene sequencing (Table S1, S2, Fig. 3). These data support that MALDI-TOF as a reliable tool for high-throughput classification and de-replication of environmental isolates, but also showed the need to improve databases with reference spectra from environmental samples.

The mangrove microbiome characterized in the current study (Fig. S4) correlates well with previous microbiome studies performed in mangrove soils in other regions of Brazil with Proteobacteria being the most represented Phylum, followed by Bacteroidetes, Chloroflexi, Acidobacteria, Bacteroidetes and Planctomycetes (Mogach et al., 2015; Dos Santos et al., 2011). Our data show that mangrove soil hosts a broad diversity of microbial life as suggested by the high number of OTUs and high diversity indexes (Table 2). Given that mangrove is located at the transition between freshwater, marine and terrestrial environments, the high microbial diversity may be explained by the coexistence of microorganisms from all three different environments (Mendes and Tsai, 2018). Furthermore, mangroves are very diverse and dynamic environments considering the oxygen level stratification, constant fluctuation in salinity, and the abundance of nutrients due to fresh water flux and tidal variations. These dynamics may contribute to the formation of diverse microbial niches, thereby explaining the high microbial diversity. This diversity correlates with the notable diverse range of metabolic pathways operating in the mangrove soil microbiome, as suggested by *in silico* metabolic reconstruction (Figs. S9 and S10). Genes involved in cycling of major nutrients and in the production of secondary metabolites and antibiotics were very abundant (Fig. S9).

Given that a significant fraction of the 16S rRNA gene sequences were assigned to uncultured and/or unclassified microorganisms (Fig. S4), mangrove soils are promising sites for mining novel microbes and/or genes of biotechnological interest. Furthermore, some of the heterotrophic culturable isolated bacteria in the current study belong to biotechnological relevant families, and some isolates were able to produce xylanase and cellulase (manuscript in preparation).

6. Conclusions

We conclude that the archaeological Sambauqui site on the Bogaço River, on the Guaratuba bay estuary, Southern Brazil (originating from 2000 to 10,000 years ago), has a major effect on the nearby mangrove soil pH. However, it has caused minor impacts on the composition of the nearby mangrove microbiome indicating the resilience of the mangrove soil to pH variations. This work highlights the high degree of microbial diversity associated with the mangrove soil, suggesting that these sites are very important microbial and genetic repositories that could be further explored to identify novel enzymes and/or biological active compounds. Our data also provide further evidence that the mangrove microbiome provides a vast range of ecological services including carbon storage and cycling of major nutrients, thereby helping to support other forms of life. Urgent conservation actions are thus needed to protect mangroves all over the world.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.064>.

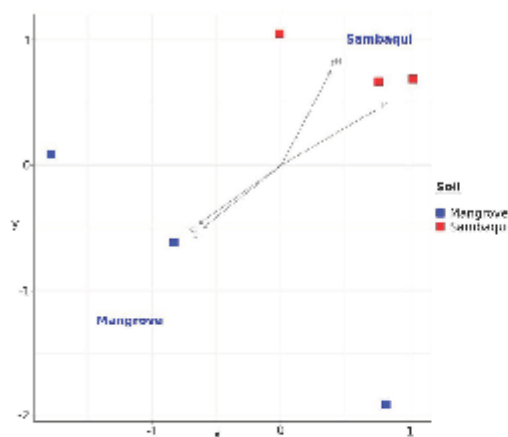


Fig. 2. Canonical correspondence analysis (CCA) of OTUs abundance along with physicochemical soil variables. The *ade4* function in vegan package for R was used to create the CCA plot from microbial biodiversity and environmental variables that significantly ($p < 0.05$) affected the community composition shown as vectors; samples with zero values were filtered and occurred to relative frequency; Bray-Curtis dissimilarity and permutation test was applied; Mangrove (M) and Sambauqui (S) samples are indicated using blue and orange dots, respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

ANEXO II – INTEGRAÇÃO CULTURAL HUMANÍSTICA, ICH

1º SEMESTRE DE 2015: 1º ICH - REDAÇÕES DE ARTIGOS CIENTÍFICOS.

O ICH teve como objetivos trabalhar e ajudar os alunos com a elaboração de artigos científicos. Junto com duas alunas do mesmo ICH, trabalhei na construção de um pequeno artigo, o qual tinha como objetivo “Estudar a percepção dos ribeirinhos em relação a poluição no rio Itiberê”. ICH ofertado pela professora MARILIA.

Poluição no Rio Itiberê: estudo sobre a percepção dos ribeirinhos na Ilha dos Valadares.

Andressa dos Santos Elias

Amanda Gabriela Figueiredo Ramirez

Pâmela Ribeiro

RESUMO

Este artigo teve como objetivo saber qual é a concepção da população ribeirinha sobre a poluição entorno do rio Itiberê. De uma forma simples e direta esclarecer e orientar a população dos danos que a poluição trás ao rio, afetando diretamente aos mesmos. A pesquisa foi realizada com os moradores localizados as margens do rio Itiberê, na Ilha dos Valadares. Foram entrevistados 20 moradores, sendo eles de sexos opostos (feminino e masculino) que fossem maiores de 18 anos, aplicando um questionário de 12 perguntas simples, no qual as respostas do questionário foram coletadas pelos próprios pesquisadores. Depois da realização da pesquisa, foram analisadas todas as respostas individualmente para obter um levantamento de dados e para se chegar ao devido objetivo. A partir da pesquisa observou-se que o rio é muito importante para a população, porém a pesca não se encaixa em uma dessas importâncias. Constatou-se que em dias de chuva a população não é afetada, e que poluição é marcada por lixo e esgoto. Mesmo o sistema portuário estar relacionado com o rio, definiu-se que não acarretam danos ao rio. As conseqüências disso não afetam gravemente a população, apenas surgem micoses na pele. Isso ocorre devido o rio ser, segundo os

2º SEMESTRE 2015: 2º ICH - APROVEITAMENTO INTEGRAL DOS ALIMENTOS.

Partindo de práticas de uma alimentação saudável, o ICH teve como objetivo ensinar a aproveitar cada parte do alimento como um todo. Ao final do ICH foi elaborado uma cartilha com todas as receitas e pratos preparados durante as aulas. ICH ofertado pelo professor DIOMAR.



3º SEMESTRE 2016: 3º ICH - ENTALHE EM MADEIRA.

O ICH ofertado por alunos do curso de Artes, teve como objetivo ensinar sobre entalhe em madeira. Durante as aulas eram passadas as técnicas para trabalhar com a madeira, junto com o processo de pintura e moldura na mesma. O ICH foi finalizado com a produção de uma placa de identificação para o próprio auditório da UFPR LITORAL.





4º SEMESTRE 2016: 4º ICH – PERMACULTURA

O presente ICH teve como objetivo mostrar e ensinar as práticas da Permacultura já desenvolvidas por alunos da própria UFPR. Foram realizadas visitas as casas dos alunos, assim como café e plantações de algumas mudas de plantas. ICH ofertado pelo professor ELOY.

5º SEMETRE 2017: 5º ICH - IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS

Junto com alunos do curso de agroecologia e a professora MARINA formada em biologia, o ICH teve como objetivo apresentar os métodos utilizados para identificar e diferenciar cada parte presente em uma planta. Foram trabalhadas chaves de identificação, visita ao parque Rio da Onça e a construção de exsicatas.



6º SEMESTRE 2017: 6º ICH - PANC: PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS.

Muitas das plantas presentes em nosso dia a dia, aparentemente pensamos que não próprias para consumo, no entanto, o que poucas pessoas sabem é que muitas plantas são consideradas PANC - PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS, e além de serem próprias para consumo, trazem bons benefícios para a saúde. O ICH apresentou além do preparo de receitas com as plantas PANC, ensinou formas de cultivar e identificar essas plantas. ICH ofertado pelos professores DIOMAR e FERNANDO.



7º SEMESTRE 2018: 7º ICH - CULTURA CAIÇARA CAMINHADA COM O Sr. RIBEIRO.

O presente ICH teve como objetivo mostrar um pouco sobre a cultura caiçara dita por um próprio caiçara Sr. Ribeiro. O ICH foi ofertado na cidade de Paranaguá, com encontros realizados no museu de arqueologia da UFPR e visitas em vários locais no centro histórico de Paranaguá. ICH ofertado pelo professor EDUARDO.



8º SEMESTRE 2018: 8º ICH – BAGRICH

O ICH realizado no museu de arqueologia da UFPR na cidade de Paranaguá, é voltado para alunos que moram na cidade de Paranaguá, assim como também não deixa de estar aberto para a comunidade. O ICH possui um caráter bastante social, e tem como um dos seus objetivos atender alguns colégios da Ilha dos Valadares através de ações sociais.



ANEXO III – PROJETOS DE APRENDIZAGEM, PA

Durante os quatro anos de graduação desenvolvi dois projetos de aprendizagem. No período de 2015/2016, juntamente com as aulas de metodologia ao projeto de aprendizagem – PA, desenvolvi o projeto de aprendizagem relacionado com o uso de agrotóxicos no município de Antonina. Orientada pelo professor Paulinho, foram desenvolvidos métodos de pesquisa através de mapas e foram realizados estudos através de revisões bibliográficas. No final do segundo semestre de 2015, consegui realizar uma visita a minha área de estudo. Por meio de fotos e entrevistas foi possível conhecer um pouco sobre a área determinada para o presente estudo.

USO DE AGROTÓXICOS NA PRODUÇÃO AGRÍCOLA, NO MUNICÍPIO DE ANTONINA- PR, TENDO COMO BASE PRODUIR ALIMENTOS SEM O USO DO MESMO.

Fotos da primeira visita de campo realizada – 12 de Outubro de 2016.

Andressa dos Santos Elias



Plantação de Maracujá – com agrotóxicos.

Foto tirada sem entrevista, tirada no caminho da área a ser estudada.



Caixa de vagem vendida para o Ceasa por R\$ 12,00 reais.

Entrevistado 02.



Plantação de vagem – com agrotóxico.

Entrevistado 02.

O segundo projeto de aprendizagem e atual TCC, foi desenvolvido no período de 2017/2018, na área de microbiologia ambiental. Com o auxílio da bolsa de Iniciação Científica – CNPQ, o projeto foi desenvolvido no laboratório de pesquisa na UFPR, com coletas nas áreas de manguezal na baía de Guaratuba – PR. O projeto teve como objetivo isolar novas linhagens de bactérias localizadas no solo de manguezal.



Isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio no entorno do sítio Sambaqui – Guaratuba, PR.

Aluna: Andressa dos Santos Elias

Orientador: Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo

ANEXO IV – VIVÊNCIAS EM GESTÃO AMBIENTAL

Durante o período do curso de Gestão Ambiental, tive a oportunidade de trabalhar como bolsista no projeto de INICIAÇÃO CIENTÍFICA no período de 2017/2018. O professor Luciano Huergo foi o meu orientador durante todo o período em que estive desenvolvendo o projeto. O projeto que trabalhei durante os dois últimos anos no laboratório de pesquisa da UFPR, se tornou o atual projeto de conclusão de curso. O projeto foi desenvolvido através de pesquisa na área de manguezal, na baía de Guaratuba, o qual tinha por objetivos estudar os microrganismos presentes no solo de manguezal, e saber quais são as atividades que esses microrganismos desempenham no mesmo. As amostras foram coletadas através de dois esforços amostrais, e trazidas junto ao laboratório de pesquisa do setor. O projeto também contou com a ajuda do laboratório do setor da bioquímica da UFPR de Curitiba.

Todo esforço desenvolvido no projeto foi adaptado para a elaboração do TCC. O trabalho é descrito a identificação de prováveis bactérias fixadoras de nitrogênio e bactérias com probabilidade de degradar celulose presentes no solo de manguezal. Atualmente não existe um grande percentual de estudos no ambiente de manguezal que estejam relacionados com os microrganismos. O ecossistema manguezal possui uma grande importância para o ambiente marinho, tanto como terrestre. Os manguezais estão presentes em várias regiões do mundo e trazem grandes benefícios principalmente para a biodiversidade marinha. No entanto, apesar dos grandes benefícios proporcionados pelo ecossistema manguezal, o ambiente vem sendo alvo de grande degradação ambiental, e a gestão ambiental pode trabalhar de maneira direta com a preservação e a realização de estudos que mostrem a importância, os benefícios e a valorização do ecossistema manguezal.

Além do resultado obtido nesse estudo, o mesmo teve como alvo mostrar um pouco que o ecossistema manguezal apresenta muitos microrganismos já descritos na literatura com grandes desempenhos biotecnológicos e microrganismos ainda desconhecidos que podem ser de grande importância.