

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
MESTRADO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

FERNANDA ARAUJO PAES

**ANÁLISE DE COMUNIDADES MICROBIANAS DE SOLO DE MANGUEZAL
POR T-RFLP E MICROARRANJOS DE DNA**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. VÂNIA MARIA MACIEL MELO

**FORTALEZA - CE
2008**

Fernanda Araujo Paes

**ANÁLISE DE COMUNIDADES MICROBIANAS DE SOLO DE MANGUEZAL
POR T-RFLP E MICROARRANJOS DE DNA**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo

Fortaleza – Ce
2008

Esta dissertação foi submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre, outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

A transcrição de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita em conformidade às normas da ética científica.

Fernanda Araujo Paes

Dissertação Aprovada em: 24/04/2008

Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo

Depto. de Biologia

Universidade Federal do Ceará

Orientadora

Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo

Depto. de Engenharia de Pesca

Universidade Federal do Ceará

Examinador

Prof. Dra. Vivian Helena Pellizari

Instituto de Ciências Biomédicas II

Universidade de São Paulo

Examinadora

A meus pais, *Iolanda e Aloizio*
e aos meus irmãos, *Luciana e Thiago*,
dedico com carinho.

*“Se eu fui capaz de ver um pouco mais adiante do que outros homens,
é porque eu montei nos ombros de gigantes.”*

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo, pela orientação, pelo carinho, pelo conhecimento compartilhado, pela ajuda e por ter sido o alicerce na construção deste trabalho, ofertando-me oportunidades e apoio. Meu reconhecimento sincero pelo seu exemplo de dedicação verdadeira e apaixonada pelo trabalho e, também, por acreditar e lutar pelo sucesso de todos que a cercam. Agradeço pela amiga que é, e pelo papel de mãe que agrega, no sentido de cuidar, incentivar, elogiar, responder, aconselhar, algumas vezes com risos e lágrimas, mas sempre verdadeira e cheia de amor. Foram inesquecíveis os momentos vividos em equipe, ao longo desses anos, em especial as emoções divididas em 2007 (dos dias longos na frente do computador dedicando-se às análises de T-RFLP, às conversas amenas na varanda, regadas a alguma cerveja e lua cheia). Sou grata por sua relevante influência exercida em minha formação profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. James Tiedje, pela oportunidade concedida e ajuda ofertada. Por haver viabilizado a realização dos experimentos deste trabalho, em seu laboratório, além da orientação complementar nos temas que circundam a biologia molecular.

Ao Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo e à Profa. Dra. Vivian Pellizari, pela honra de tê-los como participantes da comissão avaliadora deste trabalho.

Aos demais professores do curso de Ciências Marinhas Tropicais, responsáveis direta ou indiretamente pela minha formação enquanto estudante, profissional e cidadã, agradeço a oportunidade de tê-los conhecido.

À Profa. Dra. Ana de Fátima F. U. de Carvalho pelo exemplo de cientista e educadora. Às Profas. Suzana Silveira Martins e Claudia Miranda, pela convivência nos corredores do Laboratório de Microbiologia da UFC.

À Fundação Cearense de Amparo ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pela bolsa concedida.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia da UFC: Alysson Angelim, Caio Leão, Denise Hissa, Geórgia Colares, Glauber Melo, Luína Benevides, Tallita Tavares, Vanessa Rodrigues, Yuri di Cavalcanti, Tecia Carvalho. À Lidianne Rocha, pelo companheirismo e amizade intensificados durante esse curso de mestrado. À Raphaela Gomes, pelo grande carinho e ajuda dispensada nos momentos difíceis, incluindo a formatação deste trabalho. Aos demais amigos que fiz neste laboratório, mas que já tomaram outros rumos: Gardênia Lima, Natasha Pinto, Samantha Costa e Sarah Pinheiro.

À Rivalda Carmo, técnica de laboratório, por sua alegria, força e carinho. Ao Valdenor de Oliveira, auxiliar de limpeza, que sempre zelou pelo ambiente de trabalho.

Aos meus colegas do Centro de Ecologia Molecular Microbiana da MSU: Brian Campbell, Bob Stedtfeld, Cristina Harzman, Dra. Deborah Himes-Yoder, Dieter Turlousse, Fan Yang, Gregorie Seyrig, Jie Dang, Dr. Jorge Rodrigues, Patrick Chain, Dr. Peter Bergholz, Dra. Shoko Iwai, Dr. Stephan Gardner, Tiffany Stedtfeld, Woo Jun Sul, Dra. Youfeng Zhu e Yu Yang. Em especial, à Dra. Debora Rodrigues, uma amiga cujo apoio foi fundamental para a existência deste trabalho, e à Dra. Aijie Wang pelas muitas horas de trabalho compartilhadas e amizade construída. À Dra. Claudia Etchebere e à Erick Cardenas, pela ajuda nas análises dos dados de microarranjos de DNA apresentados nessa dissertação.

À Maryam Thompson, técnica de laboratório, por ter sempre me ajudado tanto dentro do laboratório como fora dele, resolvendo questões burocráticas da universidade.

A todos os meus colegas da turma de 2006.1 do curso de Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais, pelos momentos de crescimento e de estudo dentro e fora das salas de aula, em especial, à Claudia Brandão, Rosa Rebolças e Samara Cardoso que, juntamente com Lidianne Rocha, compartilharam muitas leituras de artigos científicos e cafezinhos na sala de informática do Instituto. Ao colega Marcelo Sousa, pela ajuda no uso dos programas estatísticos.

Aos amigos sempre presentes em minha vida, mesmo aqueles cuja distância geográfica dificulta um pouco: Caroline Beserra, Dayane Castro, Felipe Bottona, Gerson Moura, George Tabatinga, Georgia Tavares, Jeanylle Nilin, Lia Sales, Luciana

Gil, Luciana Leitão, Marcel Coelho, Dr. Marcellus Caldas, Marcionília Pimentel, Marina Viana, Dra. Martha Smith, Paulo Mesquita, Priscila Freitas, Raquel Moutoilas, Raquel Gomes, Rodrigo Marco, Rômulo Freitas, Rosie Quackquarini, Sara Brasil, Sidarta Lopes, Ticiane Bezerra e Tulio Oliveira. Em especial, aos meus grandes apoios durante o ano de 2007 em Michigan: à Dra. Alejandra Manzan, que além de vizinha tornou-se uma amiga muito querida. À minha irmã e *roomate* Manuela Melo, que existiu em todos os meus momentos, humores e decisões, fossem bons ou ruins, certos ou errados, pessoa maravilhosa de quem guardo muitas saudades. À Ritaumaria Pereira, grande amiga com quem dividi almoços, conversas, caminhadas e desabafos. Todos vocês tornaram (e tornam) a minha vida mais leve!

Aos meus amados pais, Iolanda Araujo e Aloizio Paes, pela dedicação e apoio desprezencioso e incondicional. Pelo suporte afetivo, psicológico e financeiro durante toda a minha vida, particularmente nesses meus anos acadêmicos, por investirem no meu potencial intelectual, acreditarem e sonharem comigo. À minha querida irmã Luciana Paes e ao cunhado Alexandre Lasmar, pelo amor e amizade que temos, pelas longas conversas, via internet, todos os domingos, pelo apoio e conselhos, sei que posso sempre contar com vocês. Ao meu estimado irmão Thiago Paes, por estar sempre me apoiando, acreditando e sonhando com minha carreira (até demais), por ter me acompanhado nas muitas madrugadas que dediquei à escrita deste trabalho, incluindo o período final, de maior exaustão e irritação, pelo amor e cumplicidade que tem por mim. À Joana Rodrigues, pela dedicação a esta família. O apoio máximo de todos vocês foi essencial e sou muito grata por isso.

A Deus, pela concessão da vida e da inteligência, por representar a calma, nos momentos de sufoco, a esperança, nas noites em claro, o conforto, nos momentos de dor e a força diante dos obstáculos julgados intransponíveis.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE QUADROS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. O Ecossistema Manguezal	3
2.2. Impactos causados pelo petróleo no Ambiente	9
2.3. A Indústria do Petróleo na Baía de Todos os Santos.....	13
2.4. Técnicas Moleculares Aplicadas a Estudos de Ecologia Microbiana	17
3. OBJETIVOS	29
3.1. Gerais	29
3.2. Específicos	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1. Sítios de Amostragem, Coleta e Variáveis Físico-químicas	30
4.2. Extração de DNA Total do Solo.....	33
4.3. T-RFLP	33
4.3.1 PCR	34
4.3.2 Purificação do DNA.....	35
4.3.3 Digestão Enzimática.....	35
4.3.4 Geração dos Padrões de T-RFLP.....	36
4.3.5 Análise dos Dados.....	36
4.4. Microarranjos de DNA.....	37
4.4.1. Preparação das Lâminas de Microarranjos de DNA.....	37
4.4.2. Amplificação com Iniciadores Randômicos.....	39
4.4.3. Marcação das Amostras.....	40
4.4.4. Hibridização.....	41
4.4.5. Lavagem das Lâminas	42
4.4.6. Escaneamento, Geração e Tratamento da Imagem	43
4.4.7. Análise de Dados	43
4.5. Análise da Diversidade Genética.....	44

5. RESULTADOS.....	45
5.1. Dados Abióticos	45
5.2. T-RFLP	45
5.3. Microarranjos de DNA	52
5.4. Índices de Diversidade	59
5. DISCUSSÃO	61
6.1. Variáveis Abióticas.....	61
6.2. T-RFLP	64
6.3. Microarranjos de DNA	68
6.4. Índices de Diversidade.....	73
7. CONCLUSÃO	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXOS.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Mapa da região da baía de Todos os Santos	13
Figura 2.	Esquema geral da técnica do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminais (T-RFLP).....	25
Figura 3.	Esquema geral da técnica de microarranjos de DNA (DNA <i>microarrays</i>).....	27
Figura 4.	Mapa da baía de Todos os Santos (A) com localização dos sítios de amostragem (B).	32
Figura 5.	Protocolo experimental da técnica do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminais (T-RFLP).....	34
Figura 6.	Protocolo experimental da técnica de microarranjos de DNA	37
Figura 7.	Esquema de funcionamento do kit comercial <i>Templiphi Amplification Kit</i>	40
Figura 8.	Eletroforese de gel de agarose 1 % marcado com SYBR [®] <i>Safe DNA</i>	46
Figura 9.	Número total de T-RFs de comunidades bacterianas encontrados em amostras de solos da baía de Todos os Santos (BA) revelados por digestão enzimática com <i>HhaI</i> e <i>MspI</i>	47
Figura 10.	Perfis de T-RFs obtidos pela digestão com <i>HhaI</i> para S1 (verde) e S2 (cinza) da baía de Todos os Santos (BA).....	48
Figura 11.	Perfis de T-RFs obtidos pela digestão com <i>MspI</i> para S1 (verde) e S2 (cinza) da baía de Todos os Santos (BA).....	49

Figura 12.	T-RFs comuns a S1 e S2 da baía de Todos os Santos (BA) revelados com a enzima <i>HhaI</i>	50
Figura 13.	T-RFs comuns a S1 e S2 da baía de Todos os Santos (BA) revelados com a enzima <i>MspI</i>	50
Figura 14.	Proporção entre as unidades taxonomias cultiváveis e não cultiváveis relacionadas com os T-RFs gerados com a enzima <i>HhaI</i> para S1 e S2 da baía de Todos os Santos (BA) utilizando a ferramenta MICA para o acesso a bancos de dados.	51
Figura 15.	Proporção entre as unidades taxonômicas cultiváveis e não cultiváveis relacionadas com os T-RFs gerados com a enzima <i>MspI</i> para S1 e S2 da baía de Todos os Santos (BA) utilizando a ferramenta MICA para o acesso a bancos de dados	52
Figura 16.	Eletroforese de gel de agarose 1 % marcado com SYBR [®] <i>Safe DNA</i>	53
Figura 17.	Proporção dos grupos genéticos das comunidades microbianas de S1 e S2 da baía de Todos os Santos (BA) mostrada através da hibridização com microarranjos de DNA.	55
Figura 18.	Perfil detalhado dos tipos de sequências genéticas pertencentes ao grupo de genes de remediação orgânica detectadas em amostras de solo de dois sítios (S1 e S2) da baía de Todos os Santos (BA)	56
Figura 19.	Principais grupos de organismos cujas sequências genéticas relacionadas à remediação orgânica hibridizaram com o DNA total do solo de amostras de S1 da baía de Todos os Santos (BA).	57
Figura 20.	Principais grupos de organismos cujas sequências genéticas relacionadas à remediação orgânica hibridizaram com o DNA total do solo de amostras de S2 da baía de Todos os Santos (BA)	58

Figura 21. Diagrama de Venn mostrando o valor total das sequências hibridizadas únicas e compartilhadas de cada um dos sítios (S1 e S2) estudados na baía de Todos os Santos (BA)..... 59

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1. Vantagens e desvantagens das metodologias baseadas na bioquímica dos microrganismos para estudo da diversidade dos solos 19
- Quadro 2. Vantagens e desvantagens de algumas metodologias baseadas em biologia molecular para estudo da diversidade dos solos..... 20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição do ecossistema Manguezal no mundo	4
Tabela 2.	Sumário dos grupos das sequências genéticas contidos nas lâminas de microarranjos de DNA utilizadas nesse trabalho.....	39
Tabela 3.	Localização e perfil abiótico de amostras de solos coletadas na região Norte da Baía de Todos os Santos (BA).. ..	45
Tabela 4.	Sequências genéticas dos microarranjos de DNA hibridizadas com o DNA total de amostras de solos coletadas na Baía de Todos os Santos (BA).. ..	54
Tabela 5.	Índices ecológicos calculados para comunidades microbianas de amostras de solos coletadas na Baía de Todos os Santos (BA).....	60

RESUMO

Os manguezais são ecossistemas importantes e produtivos, encontrados ao longo da linha da costa de regiões tropicais e subtropicais. Processos importantes, como a ciclagem de nutrientes, estão diretamente conectados à atividade das comunidades microbianas desses solos. Dada sua posição estratégica, os manguezais são bastante impactados no mundo todo. No Brasil, áreas importantes como a da Baía de Todos os Santos (BA) são severamente afetadas pela presença do petróleo. Compreender as adaptações da microbiota local e sua dinâmica, frente às alterações ambientais, é essencial para que se consiga manter ou restaurar esses ecossistemas. A presente dissertação investigou a estrutura e a função de comunidades microbianas em uma área do manguezal da baía de Todos os Santos, poluída pela indústria do petróleo. Dois locais foram amostrados – um, situado na área de refinamento dessa indústria e o outro, distante desse local e usado como controle. Além dos dados abióticos medidos, dois métodos independentes de cultivo foram utilizados: T-RFLP e microarranjos de DNA. Os resultados de ambos os sítios, nos experimentos de T-RFLP, mostraram que as duas comunidades bacterianas diferem quanto à sua estrutura. Para o sítio amostrado na área da refinaria, um número maior de OTUs sugere um estímulo ambiental, na comunidade bacteriana, fato associável ao alto teor de matéria orgânica desse local. Para os microarranjos de DNA, categorias similares de genes foram detectadas, em ambos os locais, mas a especificidade de suas sequências foi distinta. Os genes que codificam para a remediação orgânica foram os mais representativos, mais de 40% do total nos dois sítios. Mesmo detectando categorias semelhantes, apenas 4% das sequências genéticas foram comuns aos sítios. Estes dados mostram que organismos diferentes são responsáveis por funções similares em cada ponto. A diferença entre os locais, observada nos experimentos, pode ser relacionada com o fato do sítio 1 situar-se numa região fortemente afetada por hidrocarbonetos. Utilizando-se índices ecológicos, os dados de T-RFLP indicaram o sítio 1 como mais diverso, enquanto os resultados dos microarranjos de DNA mostraram o oposto. Concluindo, a estrutura e função da microbiota local são afetadas pela presença da indústria do petróleo. Estudos adicionais poderão ajudar a compreender a dinâmica dessas comunidades microbianas, frente às futuras exposições ao óleo e/ou derivados.

Palavras-chaves – manguezais, diversidade microbiana, T-RFLP, microarranjos de DNA.

ABSTRACT

Mangroves are important and productive intertidal ecosystems along subtropical and tropical coastlines. Important processes such as nutrient cycling are directly connected to the activity of the microbial communities of mangrove soils. Because of their strategic location, mangroves have been widely impacted around the world. Important mangrove areas, such as Todos os Santos bay (BA), are impacted by crude oil and its derivatives. Hence, understanding the local microbiota's dynamics and adaptations to petroleum-induced environmental alterations is essential to assessing or restoring desirable ecosystem functions. I investigated the structure and function of microbial communities in a mangrove area located in the north of Todos os Santos bay. Two sites were sampled – one located inside an industry refinery area and another located outside that area in a place considered less affected by hydrocarbons. Temperature, pH, salinity and organic matter content were measured. Two culture-independent community analysis methods were used: T-RFLP and DNA microarray. The T-RFLP experiments showed two distinct community structures. The site inside the refinery area showed a higher amount of OTUs suggesting that the higher amount of organic matter may have stimulated the bacterial community. The microarray experiments showed similar functional gene categories found at both sites, but the particular sequences that hybridized were different. The genes coding for organic carbon degradation were the most frequently detected category counting for more than 40% of the total probes hybridized at both sites. Even though the hybridized categories were similar, the sites shared just 4% of the total hybridizing genes. These results show that different organisms are responsible for similar functions on each site. Using diversity index, T-RFLP data indicated that site near the refinery was more diverse than the distant site, while microarrays results showed the opposite. The former method measures bacterial populations while the latter measure sequence diversity of functional genes, which may indicate that the polluted site is selecting for more different bacteria but that they have a less diverse set of functional genes. In conclusion, the structure and function of the microbiota may be affected by the presence of the petroleum industry products. Further studies will help us understanding the dynamics of those communities following petroleum exposure.

Keywords – contaminated mangroves, microbial diversity, T-RFLP, DNA microarrays.

1 – INTRODUÇÃO

O impacto da existência e desenvolvimento das civilizações nas zonas costeiras, espalhadas pelos cinco continentes existentes na Terra, ainda que não precisamente mensurado, é mundialmente reconhecido. Uma parte desse desequilíbrio ecológico é gerada pela indústria petroquímica, cujos subprodutos representam poluentes altamente recalcitrantes. São especialmente preocupantes as áreas consideradas de alta sensibilidade, como os manguezais, pois são ecossistemas importantes, porém frágeis e de difícil recuperação. A perda anual dessas áreas estuarinas é estimada em mais de um milhão de hectares no mundo todo. Apesar do crescente empenho científico para tentar reverter este quadro, ainda são poucos os registros de resultados efetivamente bem sucedidos na remediação *in situ* de áreas de manguezais impactadas por hidrocarbonetos. Tem-se, portanto, uma demanda na produção e aplicação de conhecimento neste setor. Faz-se necessária a urgente geração de dados que ajudem a promover a inversão desta realidade.

Os manguezais, considerados a coluna vertebral dos ambientes marinhos tropicais, desempenham um papel essencial na manutenção da biodiversidade oceânica, funcionando como berçário e fontes de alimento para peixes e outros animais. O papel de exportador de nutrientes ocorre graças às altas concentrações de matéria orgânica e ao caráter anóxico, propriedades típicas das regiões de mangue. No entanto, essas mesmas condições igualmente favorecem a permanência e acúmulo de poluentes, como os derivados de petróleo, em seus solos. Esses xenobióticos podem persistir por décadas e, a longo prazo, causar desequilíbrio nos processos essenciais para a manutenção do ambiente, incluindo modificações nos ciclos biogeoquímicos e na cadeia alimentar. Ambas as situações são consequências diretas de alterações na estrutura das comunidades microbianas autóctones.

Apesar dos microrganismos serem fundamentais para a manutenção dos ecossistemas, o conhecimento acumulado sobre esses seres até recentemente foi limitado pelo uso de metodologias dependentes de cultivo. Com o advento de técnicas moleculares baseadas na análise do DNA de microrganismos retirado diretamente de amostras ambientais, avanços importantes nos estudos de ecologia microbiana têm sido registrados. Todavia, dados científicos sobre a estrutura e diversidade das comunidades microbianas de manguezais são ainda escassos, mas

podem ser úteis tanto para avaliar o grau de impactação causado pela ação antrópica nestes ecossistemas peculiares, como para promover ações eficazes da remediação destes impactos.

O Brasil vive um momento de crescimento econômico no setor petroquímico, mas, em algumas regiões do país, como no caso da baía de Todos os Santos, no estado da Bahia, a exploração do petróleo data mais de 50 anos. Ao longo dessa consolidada exploração, muitos eventos foram ou são responsáveis pelo impacto ambiental ali gerado. Atualmente, pesquisadores de vários ramos da ciência têm trabalhado em conjunto para o desenvolvimento de soluções eficazes para o problema.

Inserido nesse contexto e procurando acrescentar preciosas informações ao estudo dos manguezais no Brasil, o presente trabalho se propõe a contribuir estudando, através do uso de técnicas moleculares avançadas, as comunidades microbianas do solo desse manguezal contaminado com petróleo.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Ecossistema Manguezal

Encontrados em áreas de transição entre o ambiente terrestre e marinho, característicos de regiões costeiras tropicais e subtropicais, os manguezais desempenham um papel essencial na manutenção da biodiversidade marinha. Estão associados às margens de baías, enseadas, barras, desembocaduras de rios, lagunas e reentrâncias costeiras, podendo também ser encontrados em exposição direta à linha da costa (Quartel et al., 2006; Dittmar et al., 2001; Shriadah, 1998; Walsh, 1974). Este ecossistema está sujeito ao regime das marés, gerador de um gradiente de salinidade típico, e seu solo é predominantemente lamoso, com baixos teores de oxigênio. Além disso, apresenta uma vegetação especializada e altamente típica de plantas lenhosas, comumente chamadas de Mangue (Jennerjahn & Ittekkot, 2002; Schaeffer-Novelli, 1995). Em todo o mundo, estão sujeitos a impactos naturais e/ou antrópicos associados às atividades das civilizações nas zonas costeiras (NOAA, 2002). No Grande Dicionário Aurélio da Língua Portuguesa, *Manguezal* é definido como um ambiente de solos pantanosos à margem de lagoas e estuários; margens pantanosas de rios e portos; florestas ao longo de rios até o limite superior atingido pela água do mar.

Os manguezais ocorrem em 122 países e cobrem aproximadamente 18 milhões de hectares, ocupando cerca de um quarto das regiões costeiras dos cinco continentes do planeta, como mostrado na Tabela 1 (Kathiresan & Qasim, 2005; Spalding et al., 1997). Distribuído entre os trópicos de Câncer e de Capricórnio, é o ecossistema predominante das margens continentais dessa região do globo, ocupando entre 60 a 75% da costa intertropical (Spalding et al., 1997). Brasil, Indonésia, e Austrália são os países que possuem a maior abundância de áreas de manguezais (Aksornkoae et al., 1984). Na América Latina, os mangues cobrem uma área pouco inferior a 4 milhões de hectares na costa de ambos os oceanos, Atlântico e Pacífico (Lacerda et al., 1993). No Brasil, podem ser encontrados desde o extremo norte, no Amapá, até o sul de Santa Catarina, na foz do Rio Araranguá (Cury et al., 2002). Podem, também, ser encontrados ao longo de toda a faixa litorânea da região Nordeste, tendo maior extensão nos estados do Maranhão e da Bahia (Vannucci, 1999).

Tabela 1 – Distribuição do ecossistema Manguezal no mundo.

Região	Área (km²)	Proporção global
Sul e Sudeste da Ásia	75.173	41,5 %
Australasia	18.789	10,4 %
Américas	49.096	27,1 %
Oeste da África	27.995	15,5 %
Leste da África e Oriente Médio	10.024	5,5 %
Total	181.077	100 %

FONTE: Adaptado de Spalding et al., 1997

Dentre as principais características ambientais condicionantes da ocorrência, estrutura e funcionamento do manguezal, destacam-se: temperaturas tropicais, substratos aluviais, proteção contra ondas, presença de água salgada e considerável amplitude de marés. A formação do ecossistema é ainda diretamente vinculada ao aporte de materiais sedimentares tanto marinho quanto continental, o que torna estes ambientes de transição altamente produtivos (Cury et al., 2002; Walsh, 1974).

No tocante à temperatura, toda a biota típica de manguezal é, por definição, sensível ao frio, por isso a ocorrência do ecossistema, em ambos os hemisférios, é limitada pela temperatura mínima de 15 °C. Este é o principal aspecto que justifica a localização predominante de manguezais na costa oeste dos continentes entre os 30° de latitude norte e 30° de latitude sul. Além disso, os manguezais têm um desenvolvimento muito escasso nas regiões com ventos fortes, que provocam ressecamento e desenraizamento (Van Santen et al., 2007; Fruehauf, 2005; Mastaller, 1990). A dependência por um abastecimento periódico de água doce, por sua vez, explica a falta dessa vegetação nos litorais com clima desértico. De fato, as áreas passíveis de ocupação por florestas de mangue apresentam algum aporte de água doce, qual seja de rios, chuvas ou ainda da proximidade de corpos de água, cuja massa líquida atua controlando o excesso de sal marinho (Dittmar et al., 2001; Schaeffer-Novelli et al., 2000; Vannucci, 1999).

Fruehauf (2005) cita em seu trabalho que o ecossistema manguezal geralmente ocorre em estuários protegidos e lagoas rasas. De fato, a proteção contra a ação das ondas em áreas litorâneas planas e calmas, favorece a permanência da vegetação típica, que possui raízes pouco profundas. Nessas áreas aluviais, outras vantagens ambientais viabilizam a ocorrência de mangues, quais sejam: troca regular de matéria orgânica proporcionada pelas águas das marés e aportes pluviais e/ou fluviais; larga amplitude da maré e existência de água salobra, formada pela mistura de água doce do rio com água salgada do mar (Schaeffer-Novelli, 1995; Ceará, 1992).

Dada a peculiaridade das condições ambientais observadas na ocorrência dos manguezais e as bruscas mudanças que ocorrem, naturalmente, nesse ecossistema, todo e qualquer organismo nele vivente deve estar adaptado para reproduzir-se e desenvolver-se naquele ambiente. A vegetação dos manguezais é uma ótima figuração da paisagem descrita. Os mangues são altamente especializados e representados por poucas espécies geralmente abundantes, como *Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa*, *Avicennia tormentosa* e *Avicennia schaueriana*, altamente adaptadas às condições de solos alagados, com baixas concentrações de oxigênio e salinidade variável. Entre as adaptações podemos citar as raízes escora, responsáveis pela sustentação das árvores sobre o sedimento, e glândulas excretoras de sais que conferem tolerância à salinidade típica do ambiente (Rossi & Mattos, 2002). A distribuição de cada uma dessas espécies nos manguezais ocorre em zonas bem definidas e é determinada principalmente pelos fatores abióticos anteriormente descritos.

Com relação à fauna, os manguezais abrigam grande variedade de animais residentes, semi-resistentes, visitantes constantes ou esporádicos. A maior parte provém do ambiente marinho como moluscos, crustáceos e peixes, mas a água doce também contribui com algumas espécies. Do ambiente terrestre provêm aves, répteis, anfíbios, mamíferos e insetos. Entre esses animais, merecem destaque os crustáceos decápodos, característicos desse ecossistema e que desempenham papel importante na manutenção da dinâmica do ambiente. Eles fragmentam folhas que caem das árvores, facilitando sua utilização por microrganismos e, ao construírem suas tocas, reviram a lama, trazendo à superfície grande quantidade de matéria orgânica. Entre os caranguejos mais conhecidos destacam-se *Goniopsis cruentata* (aratu), *Cardisoma guaiamuni* (guaiamum), *Ucides cordatus* (caranguejo-uçá) e os pequenos chama-marés do gênero *Uca*

(Fruehauf, 2005; Ceará, 1992).

Nos manguezais, bactérias, arqueas e fungos constituem cerca de 91% da biomassa microbiana, enquanto microalgas e protozoários representam apenas 7% e 2% respectivamente (Alongi, 1988). Apesar de existir um número menor de estudos reportados na literatura sobre a composição da microbiota desse ecossistema, quando comparado aos aspectos abióticos e fauna e flora associada, sabe-se que a microbiota é essencial para manutenção do manguezal, sendo sua vasta diversidade filogenética e funcional a chave que governa o fluxo de energia e a ciclagem de nutrientes. De acordo com Alongi (1994), os ecossistemas marinhos tropicais, aquáticos ou terrestres, são bem mais dependentes da atividade microbiana que os ecossistemas de zonas temperadas. Nos trópicos, a formação do húmus e a reciclagem de nutrientes por comunidades microbianas é um processo bastante eficiente, sendo as bactérias responsáveis por grande parte do fluxo de carbono nos sedimentos dos manguezais (Holguin et al., 2001). Vê-se, portanto, a íntima relação entre a microbiota das florestas de mangue e os solos que habitam.

Os solos dos manguezais são formados pela deposição de partículas de origem continental e marinha, orgânicas e inorgânicas, que estão em suspensão na água, e se movimentam em função das correntes de fluxo e refluxo das marés (Stralher & Stralher, 2000). No geral, estes solos apresentam granulometria caracteristicamente fina, com dominância das frações de tamanho menor que 0,05 mm, ou seja, silte-argila. Possuem muita matéria orgânica, alto conteúdo de sal, baixa consistência e cor cinza escuro. Também apresentam amplas variações nos valores de potencial hidrogeniônico (pH), capacidade de troca catiônica (CTC), capacidade de retenção de água, potencial redox (Eh), salinidade, nitrogênio e fósforo extraível (Rossi & Mattos, 2002; Cardona & Botero, 1998), além de variações na composição mineralógica.

Um aspecto importante desses solos é a presença de pirita (FeS_2), comum nos manguezais. Sua formação se dá em ambientes redutores, com presença de matéria orgânica, ferro, enxofre proveniente do mar e microrganismos como, por exemplo, a bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* que reduzem os íons sulfato (SO_4^{-2}) a sulfito (SO_3^{-2}) e os íons férrico (Fe^{+3}) a ferroso (Fe^{+2}), estável nessas condições; porém, quando os solos são drenados, ocorre a oxidação da pirita e a produção de ácido sulfúrico (H_2SO_4), causando uma redução dos valores de pH, podendo formar solos sulfato-ácidos em áreas mais elevadas, caso a

quantidade de ácido produzida seja maior que a capacidade de neutralização do solo (Vannucci, 1999).

O equilíbrio das condições ambientais próprias do manguezal pode facilmente ser perturbado por impactos antrópicos, revertendo os processos fundamentais do funcionamento desse ambiente. Os danos causados pelo homem durante o desenvolvimento das civilizações em zonas costeiras é atualmente reconhecido em nível mundial. No Brasil, as relações entre o homem e os manguezais é antiga. Populações indígenas já utilizavam essas áreas antes da chegada dos colonizadores europeus. No período colonial, além de fonte de alimento, o manguezal era utilizado para retirada de madeira, lenha e tanino usado em curtumes. Em pleno século XIX, no estado do Rio de Janeiro, descobriu-se que a cinza mineral do manguê apresentava carbonato e cloreto de sódio, servindo na fabricação de sabão sólido. Historicamente, uma ocupação mais massiva dos manguezais não ocorreu até a metade desse século, porque a idéia da época era que as florestas de manguê constituíam-se de áreas com pouca salubridade, sem muita utilidade para a agricultura e fonte potencial de doenças transmitidas pelos insetos locais. Por conta disso, a atitude frente a esse ecossistema era drenar e aterrar, para posterior uso. A partir da década de 1950, nas áreas estuarinas e de manguezal, começaram a implantar-se indústrias e empreendimentos imobiliários, afetando tanto o ambiente, como as populações tradicionais que sobreviviam dos recursos do manguezal (Fruehauf, 2005; Vannucci, 1999).

Atualmente, a importância ecológica e econômica do manguezal são bem estabelecidas, sendo repetidamente citadas na literatura (Van Santen et al., 2007; Kathiresan & Qasim, 2005; Vannucci, 1999; Ceara, 1992), tais como:

- Ser fonte de matéria orgânica e nutrientes para as águas costeiras adjacentes, contribuindo para a produção primária da zona costeira;
- Atuar como local de abrigo, reprodução, desenvolvimento e alimentação de espécies marinhas, estuarinas, terrestres e límnicas, contribuindo para a manutenção da diversidade biológica costeira;
- Proteger a linha da costa, evitando erosão e assoreamento dos corpos d'água adjacentes;
- Agir como barreira para a contaminação marinha, retendo produtos químicos, como metais e hidrocarbonetos provenientes da ação antrópica nos continentes;

- Ser fonte de produtos para comunidades humanas costeiras, principalmente no tocante à pesca.

Apesar da clara valia do ecossistema manguezal, nos últimos 50 anos, aproximadamente um terço das florestas de mangue, em todo o mundo, vêm sendo perdidas e, em paralelo, têm ocorrido o desaparecimento de espécies biológicas (Kathiresan & Qasim, 2005). O desenvolvimento não ecologicamente planejado de atividades portuárias, pesqueiras, de agricultura e aquicultura, industriais, de exploração mineral, turísticas, dentre outras, mantém sob constante risco os estuários e ecossistemas associados, como os manguezais. As florestas de mangue são especialmente preocupantes, por se tratar de áreas consideradas de alta sensibilidade, em razão da importância, fragilidade e dificuldade de recuperação (SQA/MMA, 2002).

Com uma perda anual estimada em mais de um milhão de hectares no mundo todo (Moscatelli, 1999), os manguezais têm sido levados em conta cada vez maior no tocante à implementação de leis de proteção ambiental. Embora menosprezados no passado, entende-se, hoje, que a perda das áreas de manguezais implica diretamente na não execução do importante papel que exercem nos setores ecológicos e econômicos, como nos casos previamente citados. O desflorestamento do mangue, por exemplo, é apontado como uma das principais razões para a diminuição da produção pesqueira em muitos países tropicais e subtropicais (Kathiresan & Qasim, 2005).

A preservação deste ecossistema é regida por leis federais e estaduais. Referidos instrumentos legais impõem restrições ao uso das áreas de florestas de mangues. De acordo com Cunha-Lignon (2001) a legislação federal que discorre sobre o ecossistema Manguezal transpõe sobre as seguintes citações: Art. 225 da Constituição Federal do Brasil (1988); Lei nº 4.771/65 do Código Florestal; Res. CONAMA nº 4 de 18/09/85, Lei nº 9.605/98 de crimes ambientais, Res. CONAMA 005/97 e Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro (PNGC) no art. 3º, §1º.

Embora protegido por lei, a falta de fiscalização e a dificuldade de gerenciar o avanço industrial e tecnológico fazem com que esse ecossistema seja constantemente impactado. O desenvolvimento de alternativas de manejo e de ferramentas biotecnológicas, capazes de remediar as alterações antrópicas ocorrentes no ambiente, são alternativas promissoras que vêm

sendo cada vez mais estudadas. No sentido de auxiliar este processo, o levantamento do inventário vivo e o entendimento de como os organismos respondem às mudanças ambientais contemporâneas torna-se artigo de primeira necessidade para o gerenciamento dos diferentes ecossistemas do globo, incluindo as florestas de mangue e demais regiões costeiras.

2.2. Impactos Causados pelo Petróleo no Ambiente

O petróleo é um recurso natural consideravelmente abundante, cuja exploração representou um marco no desenvolvimento da nossa civilização. Atualmente, é a principal fonte de energia de diversos setores industriais e de bens de consumo. Serve como base para fabricação dos mais variados produtos, dentre os quais se destacam: óleo diesel, gasolina, alcatrão, polímeros plásticos e até mesmo medicamentos. Este recurso tem grande peso na economia mundial e já motivou muitas guerras, sendo hoje a principal fonte de renda de muitos países, sobretudo no Oriente Médio (Gomes, 2004).

Do latim *petroleum*, *petrus*, pedra e *oleum*, óleo, a palavra petróleo significa óleo da pedra. É uma substância oleosa, inflamável, menos densa que a água, com cheiro característico e coloração que varia do castanho claro ao preto, passando por verde e castanho escuro. Originado da transformação de grandes deposições fósseis, é uma mistura complexa de compostos orgânicos, com alto conteúdo energético. Contém hidrocarbonetos que variam de moléculas simples, como metano, a moléculas com alta massa molecular. A fração saturada do petróleo compreende os n-alcanos, considerados os mais facilmente degradáveis. Já a degradação de compostos aromáticos e poliaromáticos é mais complexa. Também pode conter quantidades pequenas de nitrogênio, oxigênio, compostos de enxofre e íons metálicos, principalmente de níquel e vanádio (Mille et al., 2007; Bamforth & Singleton, 2005; Atlas, 1981). De acordo com Gomes (2004), uma amostra de petróleo considerada padrão apresenta 14% de parafinas normais, 16% de parafinas ramificadas, 30% de naftênicos, 30% de aromáticos e 10% de resinas e asfaltenos.

A utilização de energia é fundamental para o mundo contemporâneo e, nesse cenário, o petróleo ocupa a liderança da matriz energética, com participação em torno de 35%. No Brasil, a indústria do petróleo tem apresentado um crescimento intenso, sendo responsável por

aproximadamente 10% do PIB nacional e com uma produção que se aproxima da auto-suficiência (ANP, 2007). Todavia, ela é igualmente uma importante fonte de poluição ambiental. Inúmeros acidentes envolvendo vazamento ou derramamento de petróleo já foram reportados, tendo causado prejuízos a curto e longo prazo (NRC, 2003).

Os grandes derramamentos de petróleo podem ocorrer durante atividades de exploração ou produção tais como: acidentes com tanques marinhos, perfuração de leitos marinhos complexos, frotas marítimas, refinarias costeiras e urbanas, e vazamentos associados (Mille et al., 2007; El-Tarabily, 2002). Os derramamentos mais catastróficos ocorrem geralmente na região costeira, afetando o ecossistema marinho e litorâneo, principalmente os manguezais (Mille et al., 2007).

Dada a grande movimentação de petróleo por transporte marítimo, registrou-se em 1967, o primeiro grande desastre ambiental pelo encalhamento do petroleiro Torrey Canyon, entre a zona costeira da Inglaterra e da França, liberando 123.000 toneladas de óleo. Outro acidente marcante na história da indústria petroquímica foi o que ocorreu nos EUA, com o Exxon Valdez em 1989, quando 38 milhões de litros de petróleo vazaram no Alasca. Desde então, outros casos ocorreram envolvendo navios, portos, terminais, oleodutos e refinarias entre outras fontes, motivando a necessidade de investimentos na prevenção, no combate a essas ocorrências e nas atividades de limpeza e remediação das áreas afetadas (Van Hamme et al., 2003; Sloan, 1999; Atlas, 1981).

No Brasil, de acordo com o Sindicato dos Petroleiros, o SINDIPETRO, (2007), o primeiro grande acidente petrolífero ocorreu em 1967 num terminal localizado na ilha de Madre de Deus, baía de Todos os Santos. Outros acidentes de grande relevância também foram registrados pelo SINDIPETRO, no decorrer das sucessivas décadas nos estados do Rio de Janeiro (1972; 1984; 1988; 1991; 2001), Bahia (1982; 1992), São Paulo (1982; 1984), Minas Gerais (1998) e Paraná (2000). Em adição, acidentes de menor porte ou não oficialmente registrados pelo sindicato, bem como a contaminação diária e cumulativa das atividades petroquímicas são igualmente danosos ao ecossistema. De acordo com Mille et al. (2007), quantidades de hidrocarbonetos de aproximadamente 3×10^6 toneladas são introduzidas a cada ano nos ambientes marinhos.

As zonas costeiras são as áreas primeiramente expostas à poluição com petróleo. Em escala mundial, a contaminação dessas áreas é relativamente bem conhecida, mas no nível local existe ainda uma considerável falta de dados em muitos pontos, onde múltiplas fontes de hidrocarbonetos estão estabelecidas, particularmente no caso dos manguezais. Assim como outros ecossistemas costeiros, os manguezais estão expostos à contaminação por hidrocarbonetos via águas de rios, esgotos urbanos e industriais, exaustores de veículos, tráfego de embarcações etc. Sendo áreas caracterizadas por alta produtividade primária, possuindo altas concentrações de matéria orgânica com abundância de detritos e condições de anoxia e potencial redox, os manguezais representam um ambiente bastante favorável para a conservação e acúmulo de hidrocarbonetos no solo (Mille et al., 2007; Zhang et al., 2004; Zheng et al., 2002; Tam et al., 2001). Além disso, as condições de inundação e as características da vegetação, com raízes abundantes, formam uma malha superficial, dificultando o acesso às regiões contaminadas, fato que impede a descontaminação imediata em casos, por exemplo, de acidentes com petróleo e derivados (NOAA, 1996).

Estabelecido no ambiente, o petróleo sofre alterações de suas características originais, em razão de fatores físicos e biológicos como evaporação, dissolução, dispersão, oxidação fotoquímica, adsorção às partículas e biodegradação. Essas transformações são reguladas pelas características específicas do derramamento e do ambiente atingido. Geralmente, a persistência desses hidrocarbonetos no ambiente dependerá de vários fatores, dentre os quais: estrutura química, concentração e dispersão do contaminante no ambiente (Sloan, 1999). No caso dos manguezais, estipula-se uma persistência igual ou superior a 20 anos (Michel, 2001; Cury et al., 2002). Esse tempo prolongado é explicado pela lenta biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo, devido à limitação de oxigenação do meio e lenta ciclagem dos nutrientes, essenciais para a atividade microbiana aeróbia (Bamforth & Singleton, 2005; Scherrer & Mille, 1989).

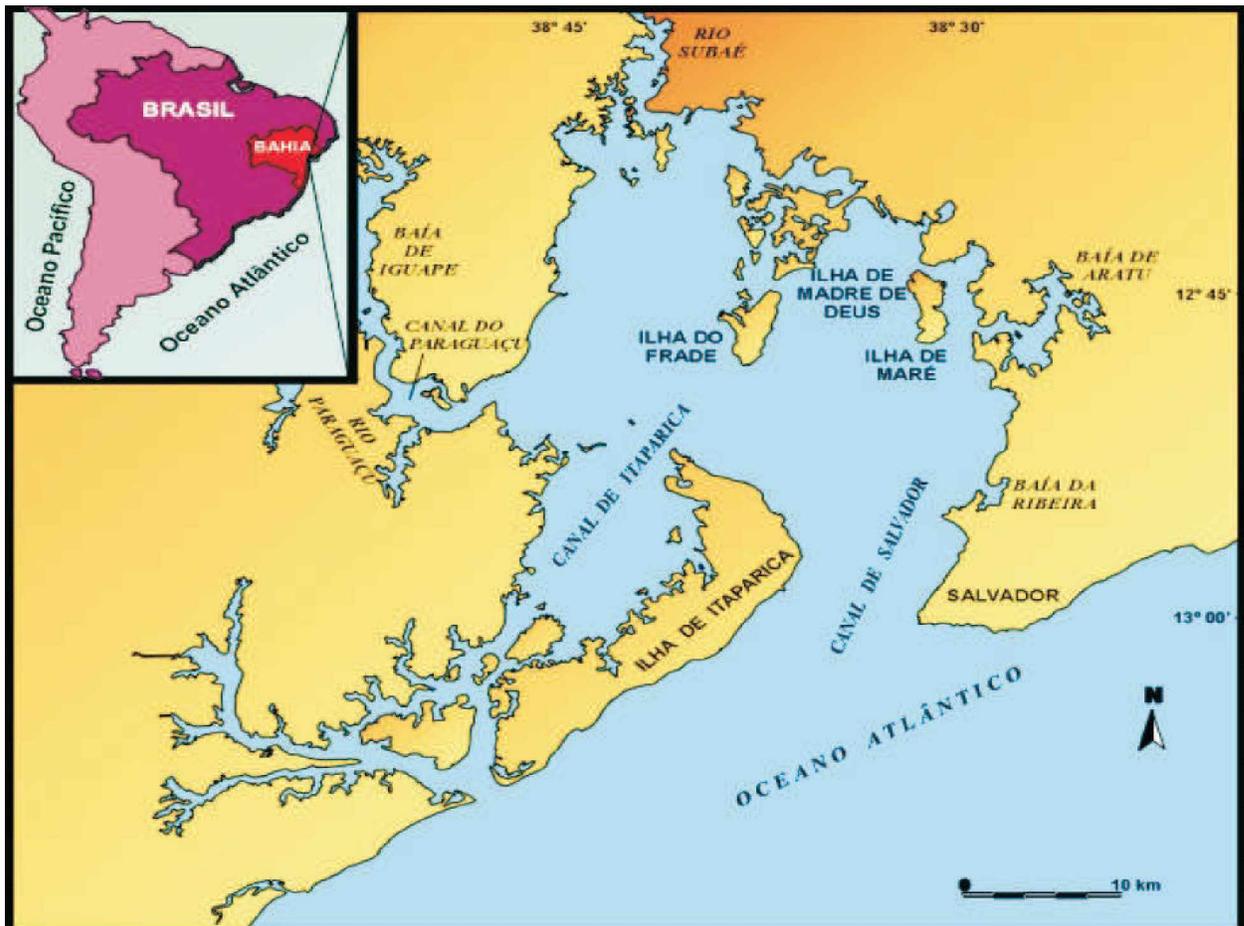
A existência de microrganismos capazes de degradar os hidrocarbonetos do petróleo utilizando-os como fonte de carbono foi demonstrada primeiramente por Zobell (1964), que observou que esses organismos eram amplamente distribuídos na natureza. Atualmente, sabe-se que parte são degradadores de alcanos, outros de aromáticos e alguns conseguem metabolizar ambos (Atlas & Bartha, 1992). Grande parte desses microrganismos estão distribuídos pelos oceanos. A exposição desses ambientes ao petróleo ocasiona um aumento na atividade e

abundância de organismos degradadores, com dominância de populações de bactérias que contêm plasmídeos com genes para a degradação de hidrocarbonetos. Assim, ocorre a diminuição da diversidade microbiana, alterando-se a estrutura das comunidades, podendo afetar a função e a integridade do ecossistema (El-Tarabily, 2002; Braddock et al., 1996; Atlas, 1995). De acordo com Atlas (1981), a proporção de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos do petróleo aumenta de menos de 1%, em ambientes marinhos não contaminados, para mais de 10%, em ambientes marinhos contaminados. Mesmo com a dominância de organismos degradadores num dado ambiente contaminado, o petróleo cru nunca é completamente degradado, sempre persistindo resíduos mais complexos e geralmente contendo compostos asfálticos, os quais são mais inertes e possuem baixa disponibilidade (Atlas, 1995).

Diante da problemática gerada pelos grandes acidentes da indústria petroquímica e o inestimável valor econômico e ecológico das áreas afetadas, muito se tem investido no desenvolvimento de ferramentas capazes de remediar o impacto gerado por petróleo nos ecossistemas. Atualmente, vários processos físico-químicos e biológicos têm sido utilizados na remoção de hidrocarbonetos de petróleo em solos e águas, sendo a biorremediação a técnica mais pesquisada e incentivada (Corseuil & Marins, 1997). Essa tecnologia consiste no uso de microrganismos ou de seus metabólitos para a limpeza dos ambientes contaminados, mas seu uso, bem como o uso de agentes químicos, pede um estudo prévio minucioso dos aspectos bióticos e abióticos da área afetada (Ron & Rosenberg, 2002; White et al., 1996). Em outros termos, qualquer tentativa de remediação ambiental, via agentes químicos ou biorremediação, deve começar conhecendo-se a comunidade microbiana local, bem como as condições ambientais prevalentes na área contaminada (Mills et al., 2003; Dowty et al., 2001; Iwamoto & Nasu, 2001). Até o presente momento, a maioria das áreas potencialmente problemáticas, ou seja, altamente suscetíveis à exposição por petróleo, em caso de acidentes durante atividades de exploração ou processamento do óleo bruto, não possuem informação suficiente sobre os efeitos desses contaminantes para as comunidades biológicas locais, no entanto esses dados são indispensáveis para uma implementação bem sucedida das técnicas de remediação (Van Hamme et al., 2003).

2.3. A indústria do Petróleo na Baía de Todos os Santos

A baía de Todos os Santos, berço da indústria petrolífera no estado da Bahia, localiza-se no Recôncavo Baiano e é a maior baía navegável do Brasil (Figura 1). Com aproximadamente 450 km de extensão, sua orla é recoberta por um extenso manguezal que se desenvolve sobre um substrato úmido, rico em minerais argilosos e matéria orgânica. Com relação à geomorfologia, pode ser considerada como uma baía de maré, sendo as suas características claramente marinhas. O volume de água doce, oriundo dos diversos cursos fluviais que desaguam ali, é duas ordens de grandeza inferior ao aporte de água salgada que entra pela abertura da baía (Leão & Dominguez, 2000; Lessa et al., 2001).



FONTE: Costa, 2006.

Figura 1 – Mapa da região da baía de Todos os Santos.

A textura dos sedimentos superficiais de fundo da baía de Todos os Santos varia desde argila a areia muito grossa (Lessa et al., 2001), com distribuição espacial diferenciada. Enquanto os sedimentos argilosos predominam na porção norte da baía, ao sul verifica-se que as areias médias e grossas são mais expressivas. Sedimentos carbonáticos e bioclastos ocorrem em diversas áreas, tendo sido alvo da exploração para fabricação de cimento. Franjas estreitas, mais ou menos contínuas, de recifes de corais bordejam as ilhas da baía de Todos os Santos (Leão & Dominguez, 2000).

Nessa região, assistiu-se à implantação das primeiras unidades de exploração, produção e refino de petróleo em território brasileiro. Como consequência desse pioneirismo, a baía, em particular na sua porção norte, apresenta sérios problemas de impactação antrópica via indústria petroquímica. Este grande problema ambiental faz-se sentir pela biota local e está registrado nos sedimentos superficiais dos manguezais, sob a forma de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo, aportados ao meio graças a derrames acidentais durante as operações de exploração, produção e refino (Veiga, 2003).

O início da história da indústria petrolífera brasileira ocorreu nessa mesma região costeira. O descobrimento do petróleo no estado da Bahia e o início de sua exploração datam de 1939. Desde então foram perfurados 634 poços, dos quais sete ainda estão em funcionamento. Até 1998, a região havia produzido 89 milhões de barris de óleo (ANP, 2002). A primeira refinaria moderna de petróleo do Brasil foi inaugurada em 17 de setembro de 1950, sob o nome de Refinaria Nacional de Petróleo S.A., tendo sido depois renomeada de Refinaria Landulpho Alves – Mataripe (RLAM). Funcionando desde então, ela está localizada a 56 Km de Salvador, no município de São Francisco do Conde, inserida no continente às margens da baía de Todos os Santos e dentro de uma região de manguezal, ocupando uma área de 6,4 km². Só em ICMS, a refinaria paga R\$ 750 milhões por ano (Veiga, 2003). A capacidade instalada chega a 307 mil barris por dia, sendo a segunda maior refinaria do país. Possui 26 unidades de refino e produz 38 derivados dentre os quais propano, iso-butano, gás de cozinha, gasolina, querosene de aviação, parafinas, óleos combustíveis e asfalto, abastecendo as regiões norte e nordeste do país (Uderman, 2000).

O transporte marítimo de óleo e derivados provenientes da baía de Todos os Santos é feito por meio do Terminal Almirante Alves Câmara (TEMADRE), segundo terminal portuário

mais importante da indústria petroquímica brasileira, localizado na Ilha de Madre Deus, logo a frente do continente, a 10 km da RLAM. Este terminal foi construído em 1958 e ocupa cerca de 50% da ilha movimentando um volume de $1,5 \times 10^9$ litros/mês de petróleo e derivados em operações de carga e descarga. Ainda na ilha Madre Deus, encontra-se em operação uma fábrica de asfalto, localizada nas proximidades da região portuária e às margens de uma zona de manguezal (Veiga, 2003). A baía de Todos os Santos abriga, também, o mais antigo parque de tancagem, com capacidade para armazenar 320 milhões de litros de combustível (ANP, 2002) e o Parque de Maria Quitéria, onde são guardados tanques com 28×10^6 Kg de GLP (gás liquefeito de petróleo), também transportado por dutos.

Segundo observações de campo realizadas por Veiga (2003), o manguezal da porção norte da baía de Todos os Santos encontra-se completamente degradado, sendo atravessado por sistema de dutos, além de sofrer a ação direta dos diversos derrames ocorrentes na região. A qualidade do ar local também é comprometida, como registrou Tavares (1997). A autora afirma que o conjunto formado pelo complexo RLAM – TEMADRE constitui-se na maior fonte de n-alcanos, principalmente os compostos de baixo peso molecular, na atmosfera do Recôncavo Baiano, seja devido às atividades rotineiras ou em consequência de incêndios acidentais.

Um levantamento importante para que se dimensione a gravidade da impactação na zona costeira baiana foi o feito por Veiga (2003), onde a autora citou todas as ocorrências de acidentes ambientais noticiados no jornal diário A TARDE, veículo impresso consagrado do estado da Bahia, entre os anos de 1992 e 2002. O estudo totalizou 16 grandes acidentes da indústria petroquímica local, tendo sido o ano de 2000 o mais danoso, com cinco graves ocorrências. Dado o longo tempo de permanência dos hidrocarbonetos de petróleo em áreas de mangue, o qual, de acordo com Michel (2001) é de até 20 anos, a baía de Todos os Santos consagra-se uma região altamente contaminada.

O governo do estado da Bahia, detendo conhecimento sobre a gravidade do problema, criou a Área de Proteção Ambiental (APA) da baía de Todos os Santos, pelo Decreto Estadual nº 7.595, de 05/06/1999. A ação foi tomada com o objetivo de tentar garantir a proteção das ilhas da baía, através da ordenação das atividades sócioeconômicas e a preservação de locais de grande significado ecológico e cultural. A APA, incluindo as águas e as ilhas, tem uma superfície de 800 km² e abrange os municípios de Cachoeira, Candeias, Itaparica, Jaguaripe, Madre Deus,

Maragogipe, Salinas da Margarida, Salvador, Santo Amaro, São Francisco do Conde, Saubara, Simões Filho e Vera Cruz (Venturini & Tommasi, 2004).

A empresa Petróleo Brasileiro S/A (PETROBRAS) é apontada como a maior responsável pela emissão de efluentes nas águas da baía de Todos os Santos e na sua atmosfera. Depois de mais de 50 anos de exploração do recurso na baía, um prejuízo incomensurável cai sobre a responsabilidade dessa empresa. Ciente disso, a PETROBRAS tem investido, mais recentemente, na melhoria da qualidade de suas instalações, tanto na área de meio ambiente quanto na segurança industrial, o que levou a RLAM a ser nomeada a primeira refinaria brasileira a receber os certificados ISO 9000 (qualidade de produção), ISO 14000 (meio ambiente) e BS 8800 (segurança industrial). Além disso, a empresa tem apoiado, desde 1994, estudos científicos para que seja entendida, mensurada e finalmente modificada a impactação gerada pela exploração do petróleo (Veiga, 2003). Como primeiros trabalhos apoiados pela empresa, em 1996, Tavares (1997) desenvolveu um programa de monitoramento dos ecossistemas ao norte da baía de Todos os Santos durante o período de 1994/1995, medindo as concentrações de hidrocarbonetos por cromatografia gasosa. Martins et al. (2005) avaliaram a ocorrência de impacto ambiental crônico na região norte da baía de Todos os Santos pelos níveis de hidrocarbonetos em sedimentos e as respostas induzidas pela toxicidade em moluscos.

Atualmente, uma importante parceria foi selada com financiamento da FINEP – CTPETRO – CNPq. A criação da Rede RECUPETRO – Rede Corporativa em recuperação de áreas contaminadas por atividades petrolíferas, tem possibilitado estudos sobre a biota, sedimento e água dos manguezais da região norte da baía de Todos os Santos, objetivando o levantamento de dados e a elaboração de protocolos ambientais aplicáveis à recuperação de áreas impactadas pela indústria do petróleo. Entre as universidades envolvidas estão a Universidade Federal da Bahia (UFBA), Universidade Católica de Salvador (UCSal), Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Universidade Federal do Ceará (UFC), Universidade Federal Tiradentes (UNIT), Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e a Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF / LENEP). Inserido nessa importante rede de conhecimento, o presente trabalho goza do apoio da PETROBRAS para sua execução. O levantamento de dados da microbiota de solos contaminados da baía de Todos os

Santos, utilizando-se de técnicas avançadas de Biologia Molecular, é um elemento chave para o progresso das pesquisas na região.

2.4. Técnicas Moleculares Aplicadas a Estudos de Ecologia Microbiana

Os microrganismos representam as formas de vidas mais abundantes no planeta e sua diversidade global excede, em muito, a dos demais organismos vivos. Adaptados a praticamente todos os ambientes existentes na Terra, apresentam uma vasta diversidade metabólica. São capazes de decompor todos os químicos sintetizados por organismos vivos e os principais responsáveis pela decomposição e detoxificação de muitos contaminantes ambientais (Ovreas, 2000). Exercem, portanto, papéis essenciais para a funcionalidade dos ecossistemas.

O solo é um ambiente bastante propício ao desenvolvimento microbiano, apresentando uma diversidade extremamente elevada. Estima-se que um grama de solo pode conter até 10 bilhões de microrganismos incluídos em cerca de 4 mil espécies diferentes (Torvisk & Ovreas, 2002; Mello & Azevedo, 1998; Pace, 1997). Nesse ambiente complexo, os microrganismos são responsáveis por transformações importantes nos ciclos biogeoquímicos, como reciclagem da matéria orgânica, degradação dos xenobióticos, fixação de nitrogênio atmosférico e produção de gases relacionados ao efeito estufa, entre outros processos conhecidos ou ainda por se descobrir (Hughes et al., 2001). A microbiota dos solos também está associada à formação e manutenção da estabilidade de agregados e pode ser fator determinante no controle da diversidade da flora e fauna que vivem no solo ou acima dele (Dabert et al., 2002; Burlage et al., 1998). Assim, a diversidade microbiana exerce papel fundamental na manutenção da qualidade dos solos. A vasta biodiversidade, fenotípica e genotípica, todavia, faz com que o solo seja um dos ecossistemas mais difíceis de investigar (Ovreas et al., 1998).

Caracterizar a diversidade microbiana presente nos solos torna-se de fundamental importância pois possibilita: aumentar o conhecimento das fontes de diversidade genética em uma comunidade; entender os padrões estruturais de distribuição relativa dos microrganismos; aumentar o conhecimento do papel funcional dessa diversidade em diferentes situações, dentre elas a presença de contaminantes; entender a regulação da biodiversidade; entender o

envolvimento da biodiversidade no funcionamento e na sustentabilidade dos ecossistemas (Ogram, 2000; Ovreas, 2000; Tiedje et al., 1999).

Trabalhos que abordam estudos relacionados à microbiologia de solos são encontrados, com abundância, nas bases de dados científicas, porém limitações metodológicas restringiam, até recentemente, o alcance de resultados verdadeiramente representativos (Rondon et al., 2000; Kennedy & Smith, 1995). Isso é devido ao uso exclusivo de técnicas tradicionais, dependentes do cultivo prévio dos microrganismos, que selecionava metabolicamente a diversidade a ser acessada. A partir da década de 80, houve grande avanço nos estudos de ecologia microbiana, com o advento de técnicas moleculares, baseadas na análise do DNA de microrganismos retirados diretamente dos ambientes naturais, sem a necessidade de multiplicação prévia das células (Amann et al., 1995; Benlloch et al., 1995). Com a publicação dos primeiros trabalhos utilizando metodologias de biologia molecular, pôde-se estimar que o uso das técnicas dependentes de cultivo proporcionava apenas uma quantificação de no máximo 1% dos microrganismos existentes no planeta (Torvisk & Ovreas 2002; Torvisk et al., 1990). Diante desse cenário, Kirk et al. (2004) organizaram de forma didática os métodos atuais mais utilizados para estudar a estrutura das comunidades microbianas e medir sua diversidade em solos. Assim, as técnicas são divididas em duas categorias: metodologias baseadas na bioquímica dos organismos (Quadro 1), geralmente utilizando-se do cultivo prévio dos microrganismos, e métodos baseados em biologia molecular (Quadro 2).

Quadro 1 – Vantagens e desvantagens das metodologias baseadas na bioquímica dos microrganismos para estudo da diversidade dos solos.

Método	Vantagens	Desvantagens
Contagem em placas	Rápido; Baixo custo.	Microrganismos não cultiváveis não são detectados; Favorecimento de indivíduos com taxa rápida de crescimento; Favorecimento de fungos com maiores índices de produção de esporos.
Nível fisiológico do perfil das comunidades (CLPP)	Rápido; Altamente reproduzível; Baixo custo; Detecta diferença entre comunidades microbianas; Gera grandes quantidades de dados; Opções comerciais específicas para fungos e bactérias ou fontes de carbono específicas (Biolog).	Representa apenas a porção cultivável da comunidade; Favorecimento de organismos com taxa de crescimento rápida; Representa apenas a fração da comunidade capaz de utilizar as fontes de carbono disponíveis; Mostra a potencial diversidade metabólica, mas não é diversidade existente <i>in situ</i> ; Sensível a densidade do inóculo.
Análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME)	Não necessita do cultivo dos microrganismos; Extração direta dos solos; Detecta comunidades específicas.	Para estudos com esporos de fungos, muito material é necessário; Pode ser facilmente influenciado por fatores externos; Resultados podem ser confundidos por outros microrganismos.

FONTE: Adaptado de Kirk et al., 2004

Quadro 2 – Vantagens e desvantagens de algumas metodologias baseadas em biologia molecular para estudo da diversidade dos solos.

Método	Vantagens	Desvantagens
Guanina+Citosina (G+C)	<p>Não é influenciado pelo enviesamento de PCR;</p> <p>Inclui todo o DNA extraído;</p> <p>Quantitativo;</p> <p>Inclui os membros raros das comunidades.</p>	<p>Requer grandes quantidades de DNA;</p> <p>Depende da eficiência da lise das células e da extração;</p> <p>Baixa resolução.</p>
Re-associação de ácidos nucleicos e hibridização	<p>Utiliza o DNA total extraído;</p> <p>Não é influenciado pelo enviesamento de PCR;</p> <p>Estuda DNA ou RNA;</p> <p>Pode ser realizado <i>in situ</i>.</p>	<p>Baixa sensibilidade;</p> <p>Grandes quantidades de cópias das sequências são requeridas para que ocorra a detecção;</p> <p>Depende da eficiência da lise das células e da extração.</p>
Microarranjos de DNA e hibridização de DNA	<p>Semelhante à hidridização de ácidos nucleicos;</p> <p>Grandes quantidades de genes podem ser analisadas simultaneamente;</p> <p>Se utilizando fragmentos de DNA, a especificidade é aumentada.</p>	<p>Detecta apenas as espécies mais abundantes;</p> <p>Custo elevado.</p>
Eletroforese visualizada em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) e eletroforese visualizada em gel com gradiente de Temperatura (TGGE)	<p>Grandes quantidades de amostras podem ser analisadas simultaneamente;</p> <p>Alta reprodutibilidade e rapidez.</p>	<p>Influenciado pelo enviesamento de PCR;</p> <p>Depende da eficiência da lise das células e da extração;</p> <p>Manipulação das amostras pode alterar estrutura das comunidades (ex.: longos períodos de estocagem);</p> <p>Uma banda pode representar mais de uma espécie (co- migração);</p>

Continua Quadro 2 – Vantagens e desvantagens de algumas metodologias baseadas em biologia molecular para estudo da diversidade dos solos.

		Detecta apenas espécies dominantes.
Polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP)	Semelhante a DGGE/TGGE; Ausência de Gradiente.	Influenciado pelo enviesamento de PCR; Algumas ssDNA podem formar mais de um tipo de conformação.
Análise de restrição de rRNA amplificado (ARDRA) ou polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP)	Detecta mudanças estruturais nas comunidades microbianas.	Influenciado pelo enviesamento de PCR; Padrões de bandas geralmente são muito complexos.
Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminais (T-RFLP)	Padrões de bandas mais simples que RFLP; Pode ser automatizado; Análise de um grande número de amostras; Altamente reprodutível; Compara diferença entre comunidades microbianas;	Depende da eficiência da lise das células e da extração; Influenciado pelo enviesamento de PCR; O tipo de Taq pode aumentar a variabilidade; A escolha dos iniciadores universais e das enzimas de restrição pode influenciar no <i>fingerprinting</i> das comunidades.
Análises de espaçadores intergênicos ribossômicos (RISA)	Altamente reprodutível; Pode ser automatizado (ARISA).	Requer grandes quantidades de DNA; Baixa resolução por conta do enviesamento de PCR.

FONTE: Adaptado de Kirk et al., 2004.

Tradicionalmente, os métodos dependentes de cultivo incluem o cultivo de amostras em meios ricos ou seletivos com contagem direta e isolamento de células viáveis (Roling et al., 2003). Referidos métodos são rápidos, de baixo custo e podem fornecer informações úteis a respeito de células heterotróficas ativas, dentro da complexa população do solo (Orphan et al., 2000). Um problema, porém, é a seleção metabólica feita pelo meio de cultura e condições de crescimento como luminosidade, temperatura e pH, que acaba por não retratar a real estrutura das populações microbianas. Diante disso, três grandes pontos devem ser analisados quando se trata de metodologias dependentes de cultivo: primeiro, o nosso conhecimento microbiológico limita-se ao número de espécies bacterianas e fúngicas capazes de crescer nos meios de cultura atuais; segundo, a potencial inibição entre colônias diferentes pode alterar os resultados obtidos, e, por último, a utilização de métodos dependentes de cultivo tende a favorecer organismos com taxa de crescimento rápida (Kirk et al., 2004; Roling et al., 2003). Tem-se, como consequência, uma subestimação dos dados reais.

A incorporação das primeiras técnicas moleculares aos estudos de ecologia microbiana na segunda metade do século XX abriu, para a Ciência, as portas da diversidade microbiológica. Nos últimos 25 anos, reconhecido número de métodos foram desenvolvidos para o estudo molecular dessa biodiversidade, como já enumerado na Quadro 2. Atualmente, a biologia molecular é uma faceta indispensável da pesquisa em Microbiologia (Burlage et al., 1998). Entre as técnicas moleculares mais citadas podemos enumerar: SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*, polimorfismo de conformação de fita simples) (Tiedje et al., 1999), ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analyses*, análise de restrição de rRNA amplificado (Liu et al., 1997), T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*, polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminais) (Osborn et al., 2000), RISA (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*, análises de espaçadores intergênicos ribossômicos), Bibliotecas metagenômicas com o sequenciamento dos clones (Lee et al., 2004), Hibridização em Microarranjos de DNA (*DNA Microarrays*) (Cho & Tiedje, 2001), PCR-DGGE e PCR-TGGE (*Polimerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* e *Polimerase Chain Reaction-Temperature Gradient Gel Electrophoresis*, reação em cadeia da polimerase – eletroforese visualizada em gel com gradiente de desnaturação e reação em cadeia da polimerase – eletroforese visualizada em gel com gradiente de temperatura) (Roling et al., 2003), RT-PCR (*Real time Polimerase Chain Reaction*, reação em cadeia da polimerase em tempo real) (Fierer et

al., 2005) e, mais recentemente, o pirosequenciamento pela técnica 4-5-4 (Edwards et al., 2006). A informação gerada por essas técnicas é relevante e usualmente tratada por programas de bioinformática, onde os dados são normalizados e as análises estatísticas e filogenéticas são feitas (Ovreas, 2000).

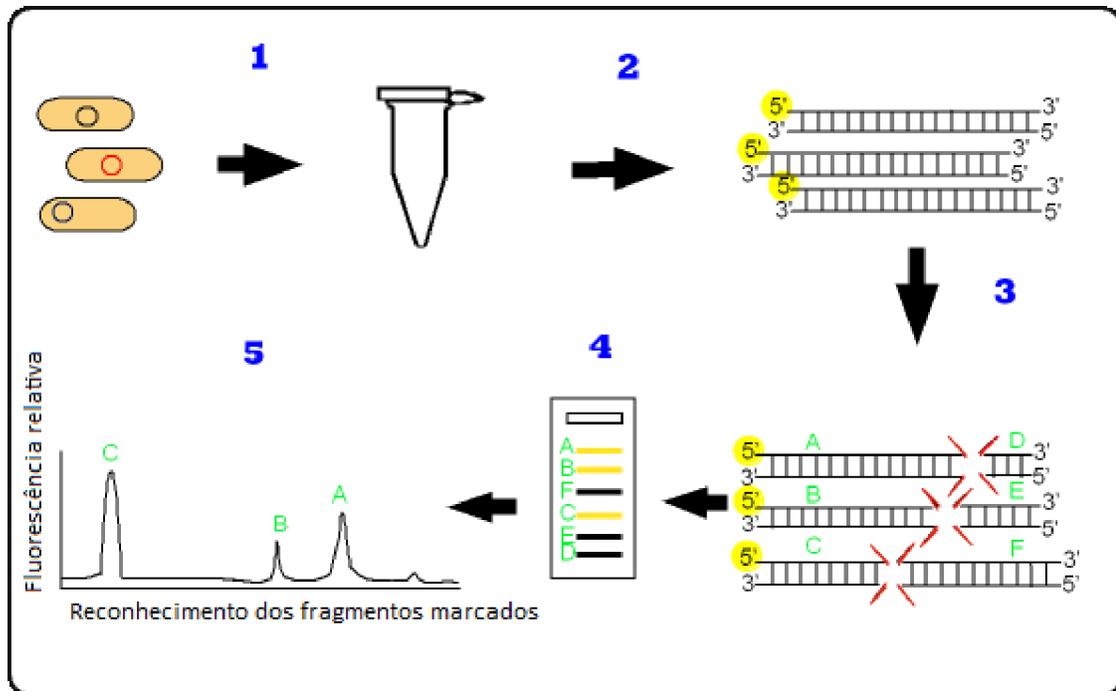
Com a evolução da aplicação das técnicas moleculares para os estudos em ecologia microbiana, passou a existir crescente interesse científico e industrial no desenvolvimento de tecnologias que viabilizem uma extração de qualidade do DNA de amostras ambientais, haja vista que esse ponto é fundamental para obtenção de sucesso desse tipo de estudo. A partir do primeiro trabalho publicado sobre o assunto por Torvick (1980), inúmeros métodos de extração de DNA foram aperfeiçoados (Osborn & Smith, 2005). No entanto, para amostras de solo, um grande problema enfrentado é a co-extração de ácidos húmicos, fração mais estável da matéria orgânica e comum nesses ambientes. Essas substâncias orgânicas, ao serem extraídas juntamente com o material genético, atuam de forma inibitória nas reações da cadeia da polimerase (PCR). As grandes empresas que desenvolvem materiais de laboratório como a Invitrogen (California, USA), Promega (Wisconsin, USA), Mobio (California, USA), etc, oferecem, atualmente, modernos Kits de extração de DNA capazes de contornar a co-extração de ácidos húmicos (Kirk et al., 2004; Ogram, 2000).

O material genético extraído das amostras ambientais pode ser diretamente aplicado às técnicas moleculares, caso se tenha a concentração requerida, ou amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR) mediante a utilização de iniciadores universais para os genes de interesse, como por exemplo, o 16S rRNA (Roling et al., 2003; Orphan et al., 2000). A reação pode amplificar todo o DNA metagenômico (mDNA) pela utilização de iniciadores randômicos (*random primers*) (Dennis et al., 2003; He et al., 2005). Quando o objetivo de um estudo é focado em análises estruturais de comunidades específicas ou inferências às relações filogenéticas, produtos de PCR, tendo como alvo a região 16S rRNA, são geralmente utilizados em técnicas como o T-RFLP (Osborn et al., 2000) e o sequenciamento de genes (Santos & Ochman, 2004). Enquanto isso, grandes quantidades de mDNA são utilizados em experimentos envolvendo o uso de microarranjos para a análise funcional das comunidades microbianas (Tiedje et al., 2001).

Para acessar a estrutura de comunidades microbianas, o conteúdo genético de amostras ambientais, amplificado por PCR, pode ser separado por diferentes métodos, dentre as quais o T-

RFLP (Marsh et al., 2000; Osborn et al., 2000). Nessa técnica, a porção terminal de um dos iniciadores, 5' ou 3', utilizados na PCR, é marcada com fluorescência, permitindo separação por tamanho dos fragmentos de restrição terminais (T-RFs) depois que os produtos dessa PCR forem tratados com endonucleases de restrição e produzindo um perfil característico da comunidade que é analisado (Thies, 2007; Marsh, 1999). Quando sequências altamente conservadas são amplificadas, por exemplo, o gene 16S rRNA, os produtos de PCR terão tamanhos similares. Para separá-los e obter-se um perfil distinto da comunidade microbiana em estudo é que o produto da PCR é hidrolizado por enzimas de restrição.

DNAs amplificados de diferentes organismos possuidores de diferentes sítios de restrição vão apresentar fragmentos marcados de diferentes tamanhos (Thies, 2007; Moeseneder et al., 2000; Marsh, 1999). Como a porção terminal, marcada com a fluorescência, será detectada pelo sequenciador automático de DNA, cada fragmento detectado representa uma unidade taxonômica operacional (OTU) (Singh et al., 2006; Osborn et al., 2000). Esse método foi descrito pela primeira vez, da forma como é utilizada atualmente, por Liu et al. (1997) e diferentes autores a utilizaram para estudo de diversas comunidades microbianas, dentre as quais populações de biofilmes (Wuertz et al., 2004), água (Dorigo et al., 2005), solos agrícolas (Tiedje et al., 1999) e de florestas (Leckie, 2005), cavidade oral humana (Sakamoto et al., 2003), etc. No trabalho de Marsh (2005), o autor apresenta protocolos detalhados para a execução de análises com a técnica do T-RFLP. Um esquema geral, adaptado de Gruntzig et al. (2002), é apresentado a seguir na Figura 2.



FONTE: Adaptado de Gruntzig et al., 2002.

Figura 2 – Esquema geral da técnica do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminais (T-RFLP). 1- Extração do DNA; 2- PCR com um dos iniciadores marcado com fluorescência; 3- Digestão com enzimas de restrição; 4- Separação dos fragmentos; 5- Detecção dos fragmentos por laser.

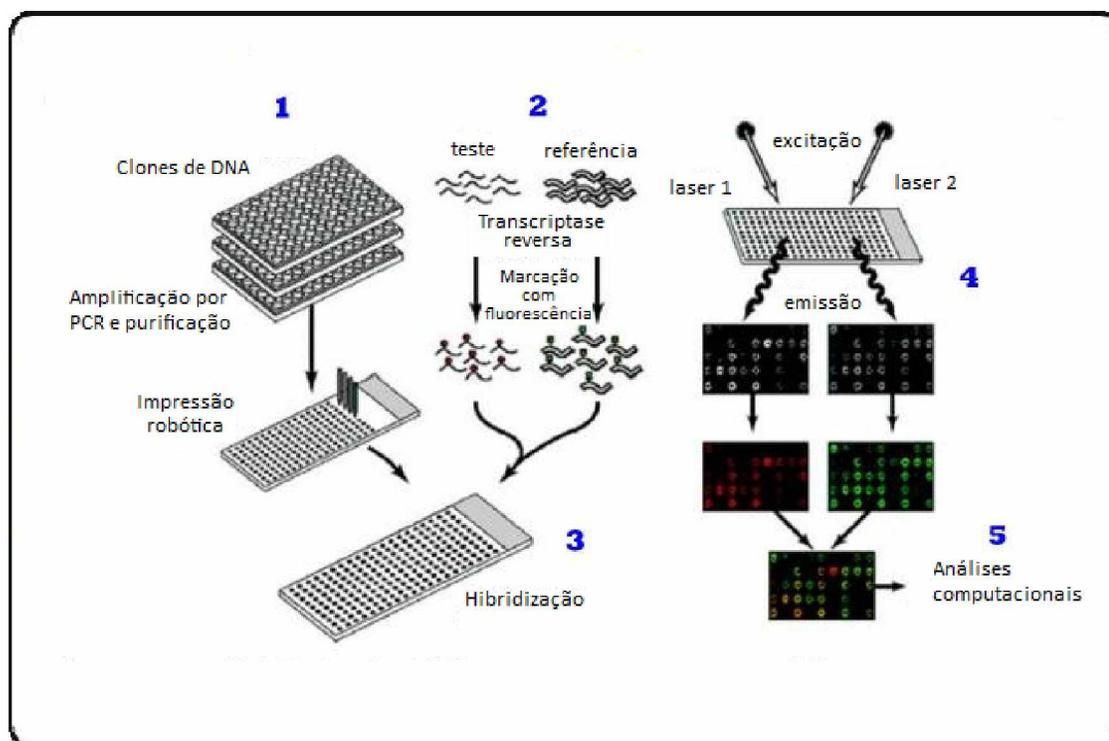
No tocante a estudos relacionados com a detecção funcional em comunidades microbianas, uma tecnologia de crescente uso e constante amadurecimento é a de microarranjos de DNA (tradução direta do termo DNA *microarrays*), também denominados Chips de DNA (Nuber, 2005). Com quase 13 anos completos, desde a primeira menção dos microarranjos de DNA em artigo científico publicado por Schena et al. (1995), a idéia de anexar sequências de DNA a suportes sólidos, como vidro ou filtro de *nylon*, já havia sido concebida 12 anos antes por Ed Southern na técnica *Southern Blot*. O diferencial da organização em arranjo de muitas sequências com a possibilidade de uma análise paralela de muitos genes simultaneamente impulsionou a estabilização dos microarranjos de DNA (Baldi & Hatfield, 2002). Os primeiros estudos desenvolvidos com este método e que impulsionaram seu refinamento concentravam-se na área médica, especialmente para a diagnose de câncer (Cheung et al., 1999). Em ecologia microbiana, os microarranjos de DNA sustentam a promessa de detectar diferentes genes

envolvidos em ciclos biogeoquímicos, biodegradação e patogenicidade, de forma bastante precisa (Dubey et al., 2006; Cho & Tiedje, 2001).

A técnica baseia-se no importante conceito bioquímico da hibridização específica: o fato de que sequências complementares de nucleotídeos ligam-se de modo estável, ao passo que as não complementares não o fazem (Lehninger, 2000). Assim, em termos gerais, podemos dividir a técnica em cinco etapas. Primeiramente, os microarranjos de DNA são preparados. Para experimentos acadêmicos utiliza-se a tecnologia desenvolvida por Patrick Brown da Universidade de Stanford: um robô imprime, ordenadamente, em uma lâmina milhares de fragmentos de DNA correspondente à sequência de genes, onde cada ponto (*spot*) corresponde a uma sequência de DNA única (Baldi & Hatfield, 2002). Segundo, o material genético a ser estudado é marcado com fluorescência (direta ou indireta) através de transcrição reversa, em presença de nucleotídeos marcados com substâncias fluorescentes. Terceiro, o microarranjo de DNA e a amostra marcada são hibridizados, sob condições específicas, e, posteriormente, os suportes sólidos são lavados de forma especial para que apenas as sequências marcadas que hibridizaram permaneçam no chip. Em cada lâmina de DNA, uma ou duas amostras podem ser testadas (hibridizadas), desde que, cada amostra tenha sido marcada com uma fluorescência diferente. Quarto, os microarranjos de DNA, hibridizados e lavados, são escaneados para a geração de uma imagem. Por último, análises computacionais são então minuciosamente executadas. Cada lâmina ou chip de DNA pode conter milhares de genes, possibilitando, assim uma análise simultânea em larga escala (Ehrenreich, 2006; Zhou, 2003; Duggan et al., 1999). Dependendo do tipo de investigação que se planeje fazer, a amostra a ser testada, mRNA, DNA genômico ou produtos de PCR, bem como a escolha do tipo de chip de DNA que será utilizado, é de extrema importância (Avarre et al., 2007).

Em microbiologia, os microarranjos de DNA foram primariamente desenvolvidos e utilizados para perfis da expressão genética de culturas puras de organismos individuais, mas alguns avanços foram recentemente obtidos na sua aplicação para amostras ambientais (Gentry et al., 2006). No caso da análise funcional de comunidades microbianas, recentemente, Zhou (2003) desenvolveu protótipos de microarranjos de DNA para serem utilizados na detecção de genes funcionais para amostras ambientais, contendo genes que codificam para diversas enzimas envolvidas nos ciclos biogeoquímicos. Investigações metodológicas e otimização das técnicas são necessárias antes dos microarranjos de DNA serem usados como ferramentas rápidas simples

e eficientes, para a avaliação das comunidades microbianas (Dubey et al., 2006). Um esquema geral da experimentação com microarranjos de DNA está representado na Figura 3.



FONTE: Adaptado de Duggan et al., 1999.

Figura 3 – Esquema geral da técnica de microarranjos de DNA (*DNA microarrays*). 1- Fabricação dos microarranjos de DNA; 2- Síntese para a marcação das amostras com fluorescência; 3- Hibridização da amostras com as sequências imobilizadas nos microarranjos; 4- Geração dos dados pelo escaneamento das lâminas hibridizadas; 5- Análise da imagem obtida para posterior tratamento dos dados.

Desde a publicação do trabalho de Watson e Crick (1953) revelando a estrutura do ácido desoxirribonucléico, muito se avançou sobre o conhecimento genético dos organismos vivos. Com o desenvolvimento de técnicas capazes de extrair esse mesmo ácido desoxirribonucléico diretamente das amostras ambientais, a microbiologia pode adentrar dimensões antes intocáveis da biodiversidade microbiana. Atualmente, muitas são as possibilidades metodológicas desenvolvidas ou em desenvolvimento para que se acesse o mundo microbiano de forma mais acurada. Ainda assim, mesmo com tantas técnicas disponíveis, é difícil estudar a verdadeira

diversidade microbiana. Além de não sabermos a precisão efetiva dos métodos empregados, cada técnica apresenta vantagens e desvantagens, como mostrado na Quadro 2. A escolha do melhor método a ser aplicado em cada estudo deve ser feita de acordo com a hipótese levantada e a disponibilidade das amostras e dos recursos laboratoriais (Kirk et al., 2004). Seja qual for o método empregado para se estudar os microrganismos, o fundamental, hoje, é que dados sejam gerados para que possamos melhor compreender esses organismos e os processos naturais nos quais eles estão envolvidos.

3 – OBJETIVOS

3.1. Gerais

Este trabalho teve por objetivo avaliar a microbiota de amostras de solos de áreas do manguezal da baía de Todos os Santos (BA), através do uso de métodos moleculares. Com isso, o presente estudo almeja gerar os primeiros dados moleculares sobre as comunidades microbianas da região. Assim, os resultados obtidos no presente estudo poderão tanto servir de alicerce para futuras ações de monitoramento dessa área considerada bastante sensível, como embasar o conhecimento básico requerido para implementações de ações de biorremediação nesse local severamente afetado pela presença de hidrocarbonetos.

3.2. Específicos

- Aplicar as técnicas de PCR e T-RFLP, para verificar a estrutura das comunidades bacterianas de amostras de solo da baía de Todos os Santos, avaliando-as;
- Verificar o perfil funcional das comunidades microbianas de amostras de solo da baía de Todos os Santos, pelo uso da técnica de microarranjos de DNA e compará-los entre si;
- Analisar a diversidade genética das comunidades microbianas das amostras de solo da baía de Todos os Santos a partir dos dados biológicos gerados utilizando índices de diversidade.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Sítios de Amostragem, Coleta e Variáveis Físico-químicas

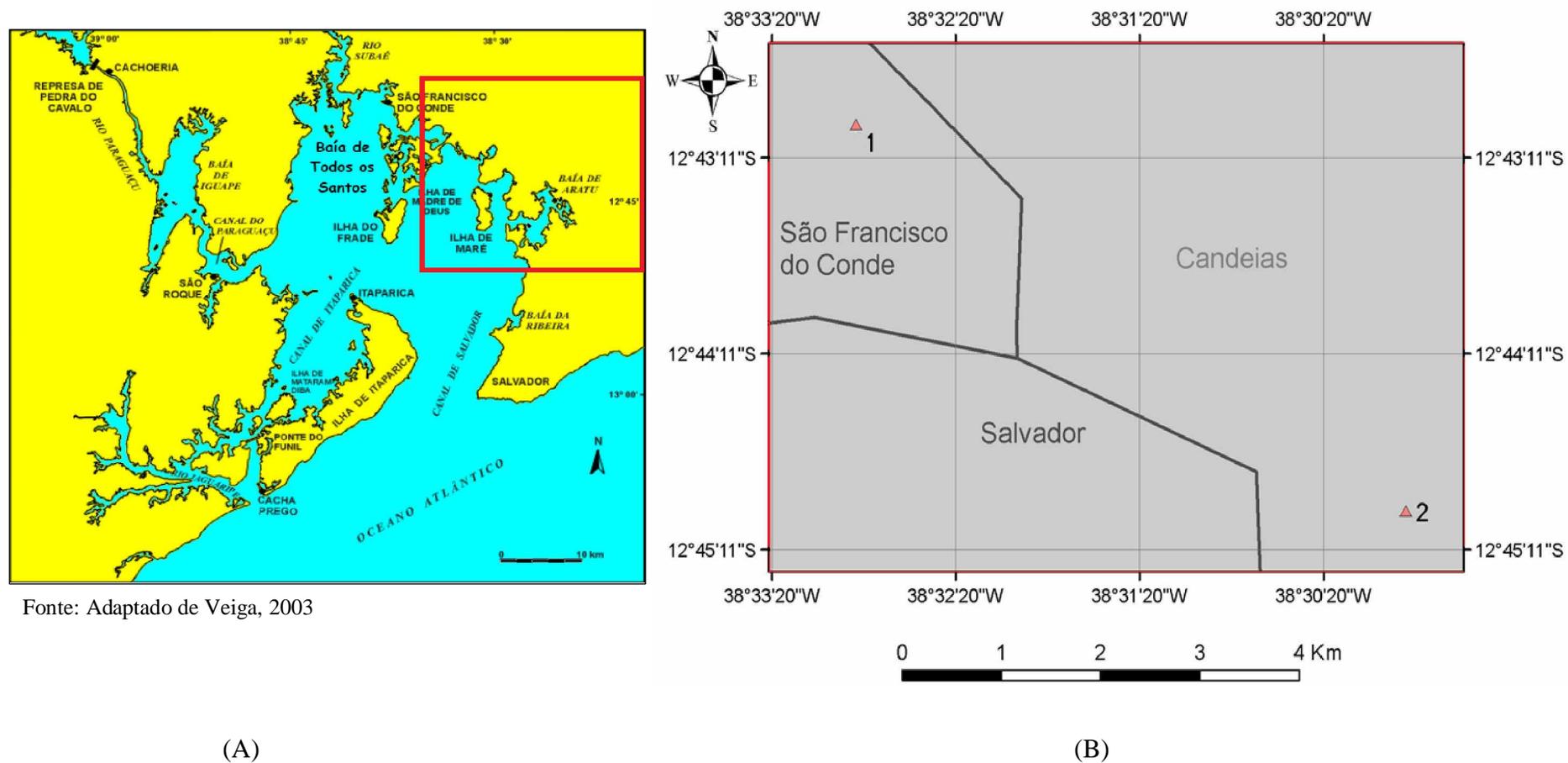
A área estudada neste trabalho localiza-se na porção norte da baía de Todos os Santos, entre os pontos 12°42' - 12°45' S e 38°29' - 38°33' W, como mostrado na Figura 4. Trata-se de uma região recoberta por manguezal, com substrato úmido, rico em minerais argilosos e matéria orgânica. Como discorrido no tópico 2.3 dessa dissertação, grande parte da região tem sido afetada pela indústria do petróleo ao longo de mais de 50 anos de atividades. Assim, visando uma possível comparação de dados, a amostragem foi realizada em dois sítios: o primeiro, localizado no município São Francisco do Conde, próximo à Refinaria Landulpho Alves – Mataripe (RLAM), onde há uma impactação petrolífera crônica, e o outro sítio localizado na praia do Caboto, município de Candeias, uma porção mais afastada do manguezal, e considerada isenta ou pouco afetada pela atividade petrolífera. Para facilitar a identificação dos sítios estudados durante os tópicos seguintes deste trabalho, chamaremos de sítio 1 (S1) o sítio de coleta localizado dentro da região do complexo petrolífero, mais especificamente na região de refino, e de sítio 2 (S2) o sítio de amostragem localizado fora do complexo petrolífero e, dessa forma, considerado como não ou pouco contaminada por petróleo.

A coleta ocorreu em setembro de 2006, durante maré baixa, de acordo com o seguinte procedimento para cada sítio de amostragem: foi realizada uma coleta em um ponto central e quatro coletas numa distância de 4 a 5 metros em relação ao ponto central, formando um quadrado. Coletou-se aproximadamente 200 g de solo da camada de 10 a 15 cm de cada ponto. Para tanto, fêz-se uso de coletor de aço inoxidável e pás estéreis. A localização dos sítios e os respectivos valores de temperatura, pH e salinidade foram medidos *in situ* utilizando-se GPS e sonda portátil.

Os solos coletados foram armazenados em vasilhames plásticos estéreis e mantidos em caixas térmicas, com gelo, sendo levados imediatamente ao laboratório para estocagem a -20 °C. Essa condição de congelamento foi mantida durante todo o transporte até o Centro de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Michigan (USA), onde todos os experimentos descritos neste estudo foram realizados. Para a execução das etapas que seguem, as 5 amostras coletadas em cada sítio de amostragem foram reunidas e homogeneizadas, gerando uma amostra composta

única para cada um dos dois sítios a serem estudados, como proposto na metodologia de Pereira (2003).

Além dos valores de temperatura, pH e salinidade da água de percolação dos solos medidos em campo, foi feita, em laboratório, a quantificação da matéria orgânica das amostras coletadas na região norte da baía de Todos os Santos. Para tanto seguiu-se o método da perda de peso por ignição descrita em Schulte e Hopkins (1996). Essa etapa foi realizada por técnicos do laboratório de Solos e Nutrientes de Plantas do Departamento de Ciências Agrícolas da Universidade Estadual de Michigan.



Fonte: Adaptado de Veiga, 2003

Figura 4 – Mapa da baía de Todos os Santos (A) com localização dos sítios de amostragem (B). 1) Sítio localizado dentro da região do complexo petrolífero e 2) Sítio localizado fora do complexo petrolífero, considerado como não ou pouco contaminado por petróleo.

4.2. Extração de DNA Total do Solo

A extração do DNA total das duas amostras compostas de solos foi realizada utilizando-se o kit comercial *PowerSoil™ DNA Isolation kit Sample* (MoBio, Catálogo n° 12888-50), seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. A escolha pela utilização deste kit específico deveu-se à sua comprovada eficiência na remoção de ácidos húmicos, geralmente um problema para estudos com solos. Em linhas gerais, amostras de aproximadamente 0,5 g de solo foram adicionadas a microtubos contendo *beads* em solução e homogeneizados. A lise celular ocorreu por mecanismos físicos e químicos. Nas etapas que seguiram, o DNA genômico total de cada amostra foi capturado por uma membrana de sílica contida em uma coluna do tipo *spin*. O DNA foi lavado e, então, eluído da membrana utilizando-se 100 µL de água estéril ausente de DNase. A quantificação do DNA extraído foi feita através de um espectrofotômetro tipo *Nanodrop* (NanoDrop Technologies, USA). No final, as amostras foram mantidas a -20 °C.

4.3. T-RFLP

A metodologia seguida nesse trabalho é descrita por Marsh (2005) e todas as etapas executadas serão detalhadas a seguir. Um esquema do protocolo experimental pode ser visualizado na Figura 5 (ver também Figura 2, tópico 2.4).



Figura 5 – Protocolo experimental da técnica do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminais (T-RFLP).

4.3.1. PCR

Para a amplificação de fragmentos específicos do rRNA 16S de Bactéria das amostras, utilizou-se o seguinte conjunto de iniciadores: 63F (5'-CAGGCCTAACACATGC AAGTC-3') marcado com 6-FAM (6-carboxifluoresceína) (63F-FAM) e 1389R (5'-ACGGG CGGTGTGTACAAG-3') (Marsh, 2005; Osborn et al., 2000).

A amplificação foi feita em solução contendo: 5,0 µL de tampão para PCR 10 X; 2,0 µL de MgCl₂ 50mM; 1,0 µL de dNTPs 10mM; 2 µL de cada iniciador numa concentração de 10 µM cada; 2U de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen, USA, Catálogo n° 18038-018); 20 ng de DNA genômico; água estéril ausente de DNase para um volume final de 50 µL. Em um termociclador, as reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: 94 °C por 3 min; 25 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 2 min; 72 °C por 10 min. Essas condições ótimas de PCR haviam sido definidas em um estudo realizado por Melo et al. (dados não publicados) utilizando mesmas amostras e foram confirmadas neste trabalho, através de PCRs piloto. Em todas as PCRs, controles positivos e negativos foram utilizados.

Os produtos de PCR gerados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1%, marcado com *SYBR® Safe DNA* em 0,5X TBE (Invitrogen, Catálogo n° S33100), utilizando-se um fotodocumentador. Como padrão de tamanho de DNA, foi utilizado um marcador de massa molecular de DNA de 1 Kb (Invitrogen, Catálogo n° 15615-016). Para a região amplificada, o tamanho de fragmentos de DNA esperados para as amostras era em torno de 1,3 Kb.

4.3.2. Purificação do DNA

O DNA total dos sítios 1 e 2 amplificados para fragmentos específicos do rRNA 16S de bactérias, gerados sob as condições acima descritas, foram purificados utilizando-se o kit comercial *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, USA, Catálogo n° 28104) seguindo-se as recomendações do fabricante. Seguinte à purificação, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro tipo *Nanodrop*.

4.3.3. Digestão Enzimática

Para digestão do material amplificado e purificado duas enzimas de restrição foram selecionadas: *HhaI* (5'-G[^]C G C-3') e *MspI* (5'-C[^]C G G-3') (New England Labs, USA, Catálogo n° R0139L e n° R0106L respectivamente).

Reações de 15 µL foram executadas de acordo com a recomendação dos fabricantes, utilizando-se os seguintes reagentes e concentrações:

Reação	HhaI	MspI
DNA 200 ng	x µL	x µL
Tampão 10X	1,5 µL	1,5 µL
Albumina Bovina Sérica (BSA) 10X	1,5 µL	-
Enzima 10U	0,5 µL	0,5 µL
Água qsp	11,5 - x µL	13 - x µL
Total	15 µL	15 µL

As reações de digestão com as endonucleases de restrição HhaI e MspI foram executadas em termociclador a 37 °C, por 3 h, e paradas elevando a temperatura para 65°C por 20 min, seguindo-se resfriamento em gelo.

4.3.4. Geração dos padrões de T-RFLP

Os padrões de T-RFLP para as amostras de DNA amplificadas, marcadas com fluorescência e digeridas com as enzimas de restrição HhaI e MspI, foram gerados no Laboratório de Suporte Tecnológico para Pesquisas do Departamento de Biologia de Plantas da Universidade Estadual de Michigan. Para tanto, utilizou-se a tecnologia da eletroforese de capilaridade do sequenciador automatizado *ABI 3100 Prism Genetic Analyser* (Applied Biosystems, USA). O programa *GeneScan Analysis* (Applied Biosystems), funcionando juntamente com o sequenciador, viabilizou a medição do tamanho de fragmentos desconhecidos, detectados nas amostras, por comparação da mobilidade eletroforética desses fragmentos com um padrão interno. A análise de cada amostra foi realizada usando-se 2 µL de solução de DNA digerido e 8 µL de uma solução contendo o padrão interno MapMaker™ 1000 (Bioventures Inc., USA) marcado com ROX (6-carboxi-X-rodamina) e o tampão de corrida (formamida deionizada). O tempo de injeção foi de 30 seg com um sinal mínimo detectável de 5 unidades de fluorescência.

4.3.5. Análises dos Dados

Os resultados gerados pela eletroforese de capilaridade foram visualizados com o programa *GeneScan* e exportados como arquivos texto, contendo informações relacionadas aos fragmentos encontrados (marcador, altura do pico, área do pico e dados referentes a corrida da eletroforese). Esses arquivos foram analisados com ferramentas do IBEST (<http://www.ibest.uidaho.edu/tools/index.php>) usando-se um *cutoff* de 5 unidades de fluorescência e filtrados no programa R (<http://www.r-project.org>) pelo algoritmo *Gfiltering* com um desvio padrão de 3. Dois fragmentos, com diferença de até 1 par de base entre si, foram considerados como fragmentos de mesmo tamanho. Os arquivos foram exportados do IBEST para o T-align (<http://inismor.ucd.ie/~talign>) e as matrizes geradas foram, então, analisadas.

Além disso, fêz-se um confronto das matrizes geradas com as bases de dados existentes através do *Microbial communities Analysis III*, MICA (<http://mica.ibest.uidaho.edu/trflp.php>).

4.4. Microarranjos de DNA

Os ensaios relacionados com a detecção de genes funcionais das amostras em estudo foram feitos pelo uso de microarranjos de DNA. Um esquema geral das etapas seguidas neste trabalho é apresentado na Figura 6 (ver também Figura 3, tópico 2.4). Protocolos experimentais como os executados no presente estudo, e detalhados a seguir, são descritos por He et al. (2005), Deneff et al. (2003) e Wu et al. (2001).

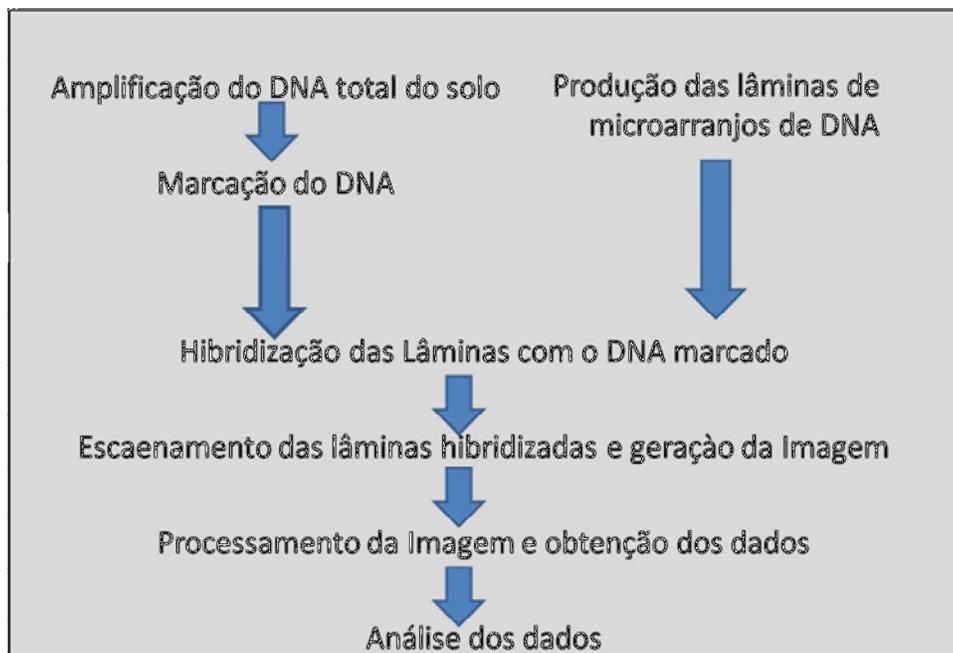


Figura 6 - Protocolo experimental da técnica de microarranjos de DNA.

4.4.1. Preparação das Lâminas de Microarranjos de DNA

As lâminas de microarranjos de DNA utilizadas no presente estudo foram disponibilizadas pela equipe do Dr. Zihoung Zhou, através de uma parceria entre o Instituto de Genômica Ambiental da Universidade de Oklahoma (USA), dirigido pelo mesmo, e o grupo liderado pelo Dr. James Tiedje no Centro de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Michigan. Esses microarranjos de DNA foram descritos por He et al. (2005) e tratam-se de lâminas desenvolvidas para serem usadas em amostras ambientais diversas para a investigação de genes envolvidos em processos biogeoquímicos-chaves mediados por microrganismos, incluindo etapas dos ciclos de carbono, nitrogênio e enxofre, utilização de fósforo, degradação de compostos orgânicos, resistência e redução de metais. Um sumário do total de *spots* em cada categoria de genes utilizadas na fabricação das lâminas é mostrado na Tabela 2. Cada lâmina continha um pouco mais de 8.000 genes impressos em até três réplicas, totalizando um valor final de 24.098 *spots* a serem testados, juntamente com 960 *spots* de sequências de genes eucarióticos (seis de humanos e quatro de plantas) e 192 *spots* com sequências altamente conservadas de 16S rRNA que serviram de controles negativos e positivos, respectivamente. Para cada amostra testada, três lâminas foram utilizadas.

Tabela 2 – Sumário dos grupos das sequências genéticas contidos nas lâminas de microarranjos de DNA utilizadas nesse trabalho.

Categoria de Genes	Sigla	Total de spots
Degradação de Carbono	CDEG	2808
Fixação de Carbono	CFIX	1018
Redução de Sulfato	DSR	1615
Redução de/Resistência a Metais	MET	4546
Metano (outros)	Metano	29
Geração de Metano	Metano_gen	440
Oxidação de Metano	Metano_ox	304
Fixação de Nitrogênio	NFIX	1225
Nitrificação	NIT	1764
Redução de Nitrogênio	NRED	2321
Remediação Orgânica	ORG	8007
Remediação de Perclorato	PER	21
Total		24098

4.4.2. Amplificação com Indicadores Randômicos

O DNA total das amostras de solo em estudo, extraídos pelo kit comercial da Mobio como descrito acima, foram amplificados utilizando-se o kit comercial *Templiphi Amplification Kit* (GE Healthcare, USA, Catálogo n°25-6400-10), modificando-se o protocolo como descrito a seguir. Alíquotas de 10 ul do tampão de amostra fornecido pelo *kit* foram transferidas para tubos de PCR onde 1ul de cada amostra de DNA foi então adicionado. A concentração das amostras de DNA puderam variar de 1 a 100 ng/ul. Após agitação em *vortex* os tubos foram deixados em descanso na temperatura ambiente por 10 minutos. Em paralelo uma mistura contendo 10 ul do tampão de reação fornecido pelo *kit* e 1 ul da solução que continha a enzima foi preparada para cada amostra a ser amplificada. Os 11 ul da mistura de reação preparados foram então

adicionado em cada amostra e a reação ocorreu durante 4 h a 30 °C, sendo interrompida com o aumento da temperatura para 65 °C por 10 minutos. A amplificação exponencial do DNA através desse kit ocorreu utilizando-se a DNA polimerase phi29 e iniciadores randômicos, o que garantiu a amplificação de múltiplos sítios do DNA de interesse. O funcionamento desse sistema é ilustrado na Figura 7. Iniciadores randômicos anelam em múltiplos sítios. A DNA polimerase phi29 estende cada um desses iniciadores. Quando a DNA polimerase alcança a extremidade final de um iniciador estendido, ocorre um deslocamento da síntese da fita. Essa porção não sintetizada fica disponível para que outro iniciador possa alinhar. O processo continua resultando em uma amplificação exponencial e isotérmica. Após a amplificação, o DNA é fragmentado utilizando-se um sonicador para que se obtenham tamanhos de DNA entre 0,5 e 5 kb. A eficiência dessa etapa é confirmada através da visualização de um rastro ao longo da corrida da amostra em eletroforese em gel de agarose 1%.

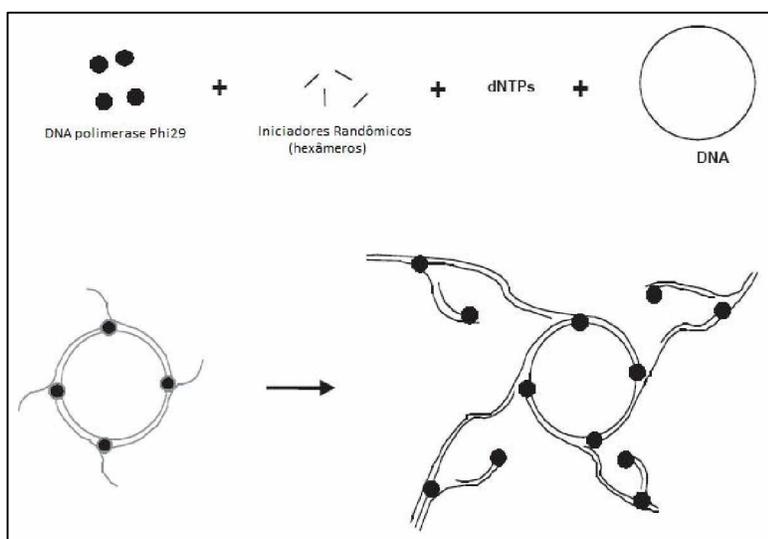


Figura 7 – Esquema de funcionamento do kit comercial *Templphi Amplification Kit*.

4.4.3. Marcação das Amostras

A marcação das amostras amplificadas de DNA foi feita através da síntese de fitas complementares, via iniciadores randômicos pela ação do fragmento Klenow da DNA polimerase, tendo um dos tipos de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) marcados com fluorocromo cianina 5 (Cy5-dUTP), como descrito por HE et al. (2005). Para tanto, utilizou-se o

kit comercial Bioprime® *Array CGH Genomic Labeling System* (Invitrogen, Catálogo n° 18095-011), dNTPs individuais (Invitrogen, Catálogo n° 10297018) e o nucleotídeo marcado *CyDye™ labeled nucleotides* – Cy5-dUTP (Amersham, USA, Catálogo n° PA55022).

Uma alíquota de 35 µL de uma mistura I, contendo 500 ng de DNA genômico e 20 µL de iniciadores randômicos (3 mg/mL) foi aquecida a 98°C por 5 min, rapidamente resfriada em gelo e então centrifugada. Uma quantia de 15 µL de uma mistura II, contendo 2,5 µL de uma solução composta por 5 mM dATP, 5 mM dGTP, 5 mM dCTP, e 2,5 mM dTTP; 2 µL do fragmento Klenow (40 U/ µL) e 1 µL do marcador fluorescente Cy5-dUTP (25 nM) foi adicionada a mistura I. O volume total de 50 µL de solução foi, então, incubado por 3 h a 37 °C. Essa reação foi parada aquecendo-se a solução 95 °C por 3 min, seguindo-se o resfriamento em gelo.

O DNA marcado foi purificado utilizando-se o kit comercial *QIAquick PCR Purification Kit*, seguindo-se as recomendações do fabricante. Após essa etapa, a incorporação do marcador ao DNA foi verificada pela leitura de 1 µL de cada amostra em espectrofotômetro tipo *Nanodrop*, onde dados referentes a absorbância do marcador (A_{650}) e do DNA (A_{260}) foram coletados para o cálculo da média de nucleotídeo marcado (Cy5-dUTP) / total de DNA sintetizado. Uma média considerada boa deve ficar entre um intervalo de 1/50 a 1/100. As amostras marcadas são secadas em um evaporador centrífugo, tipo *Speed-Vac®* (GMI, USA), e mantidas a -20 °C até o momento da hibridização.

4.4.4. Hibridização

Uma importante etapa do processo experimental é a hibridização das lâminas de microarranjos de DNA com as amostras. Além das condições ideais para essa reação, a preparação das lâminas e das amostras, individualmente, são passos fundamentais.

Antes de proceder a hibridização com as amostras a serem testadas, as lâminas de microarranjos de DNA foram submetidas a uma imersão de 1h a 50 °C, em uma solução de pré-hibridização composta por formamida 50%, 5X solução citrato salina padrão (SSC), 0.1% Sódio dodecil sulfato (SDS) e BSA 0,1 mg/ml, seguida de lavagem seriada com água Milli-Q (3 vezes) e 1 lavagem com isopropanol, quando as lâminas foram secadas por centrifugação, a 1600 rpm por 3 min (Deneff et al., 2003). As lâminas e lamínulas utilizadas foram montadas nas devidas

câmaras de hibridização (Telechem, USA) e mantidas a 60 °C, até o momento da montagem do experimento.

Para a hibridização, as amostras marcadas e conservadas secas a -20 °C foram primeiramente ressuspensas em 38,4 µL de uma solução de hibridização, contendo 20 µL de formamida; 10 µL de 20X SSC; 0,4 µL de SDS 10%; 0,4 µL de DNA de esperma de salmão (10 µg/ µL) (Invitrogen, Catálogo n° 15634-017); 0,33 µL de Ditioneitol (DTT) e 7,27 µL de água livre de DNase. Essa solução contendo o DNA ressuspenso foi incubada a 98 °C por 3min e mantida a 65 °C, quando se adicionou 1,6 µL de recA. Uma solução final de 40 µL para cada uma das amostras foi mantida nessa temperatura até a aplicação na lâmina.

Para a montagem do experimento, pipetou-se 15 µL de 5X SSC em cada lado de cada câmara de hibridização utilizada, contendo uma lâmina de microarranjo de DNA previamente montado com uma lâminula. Os 40 µL da solução final de cada amostra foi injetada entre a lâmina e a lamínula e preencheu todo o espaço através da ação da capilaridade. As câmaras foram então seladas, cobertas com papel alumínio e submetidas a hibridização por 12 h a 45 °C, como sugerido por Wu et al. (2001). Cada amostra foi testada em triplicata, ou seja, 6 lâminas foram preparadas nesse estudo.

4.4.5. Lavagem das Lâminas

Após o período de hibridização, os microarranjos de DNA foram lavados de forma serial utilizando-se de três tampões distintos:

	Tampão de lavagem I	Tampão de lavagem II	Tampão de lavagem III
20X SSC	50 mL	5 mL	5 mL
SDS 20%	5 mL	5 mL	-
água Milli-Q	945 mL	990 mL	995 mL

Cada lâmina hibridizada foi lavada individualmente em tubos do tipo *Falcon*TM (BD Biosciences, USA, Catálogo n°352070) contendo aproximadamente 50 mL de cada tampão de lavagem. O tampão de lavagem I foi mantido a 50 °C e cada lâmina foi lavada 3 vezes neste tampão (cada imersão durou 5 min). O tampão de lavagem II foi utilizado em temperatura

ambiente de 25° C, duas vezes por 10 min cada imersão, e o tampão de lavagem III, utilizado cinco vezes na mesma temperatura ambiente por 1 min de imersão cada. Após o processo de lavagem, as lâminas foram secadas por centrifugação a 1600 rpm por 3min.

4.4.6. Escaneamento, Geração e Tratamento da Imagem

As lâminas secadas por centrifugação foram imediatamente escaneadas para a geração da imagem da hibridização dos *spots* de DNA utilizando-se o aparelho *GenePix 4000 laser scanner* (Axon Instruments, USA) com um tubo fotomultiplicador (PMT) numa voltagem ótima de 600 V para Cy5 (laser de 635 nm). Primeiramente, uma imagem rascunho de baixa resolução foi gerada para verificar a qualidade da lâmina e definir as condições ótimas para a geração da imagem definitiva. Em geral, utilizou-se um poder de laser entre 95 a 100% e 70 a 90% da eficiência do PMT. As imagens foram salvas em formato *.TIFF e analisadas no programa *Genepix 5.0* (Molecular Devices, USA).

Para o tratamento da imagem, utilizando o programa *Genepix 5.0*, uma grade de círculos individuais, definindo a localização de cada *spot* de DNA, foi sobreposta à imagem obtida para modelar a qualidade individual da hibridização. *Spots* mal formados, ou de intensidade baixa, ou excessivamente fortes, foram descartados. Um índice relacionando a média da intensidade de pixels dos *spots* e do *background* foi calculado (SNR). Dessa forma, os ruídos de fundo (*background*) e a intensidade dos *spots* dos controles negativos foram subtraídos dos sinais de hibridização. Ao final do tratamento da imagem, apenas os *spots* que apresentaram pelo menos 85% de sua área total com um SNR superior a 3,0 foram considerados válidos. Para cada lâmina analisada, o programa de imagens gerou um arquivo do Excel (Microsoft, USA), que foi exportado e analisado posteriormente.

4.4.7. Análises dos dados

Para comparar os resultados obtidos nas diferentes réplicas e entre as distintas amostras, o sinal de cada *spot* de DNA foi normalizado e a significância e o erro padrão dos sinais absolutos foram calculados. Uma matriz contendo a identidade e descrição de cada sequência de gene hibridizada, a quantidade total e hibridizada dos *spots*, os dados normalizados, a

significância e o erro padrão foi obtida e os resultados analisados entre si. As análises descritas acima e a construção do diagrama de Venn foram realizadas utilizando-se a plataforma desenvolvida pelo Instituto de Genômica Ambiental da Universidade de Oklahoma (<http://ieg.ou.edu/>) através de algoritmos do programa R.

4.5. Análise da Diversidade Genética

Utilizando-se as matrizes geradas com os resultados dos experimentos de T-RFLP e de microarranjos de DNA, os índices de riqueza de Margalef, dominância de Simpson, equitabilidade de Pielou e a diversidade de Shannon-Weaver foram calculados utilizando-se o programa estatístico *Primer* 6.0 (PRIMER-E Ltd, Reino Unido).

5 – RESULTADOS

DADOS PROTEGIDOS PARA PUBLICAÇÃO

6 – DISCUSSÃO

DADOS PROTEGIDOS PARA PUBLICAÇÃO

7 – CONCLUSÃO

DADOS PROTEGIDOS PARA PUBLICAÇÃO

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aksornkoe, S.; Arroyo C.; Blasco F.; Burbridge P. R.; Tuck C. H.; Cintron G.; Davie J. D. S.; Dixon J. A.; Hamilton L.S.; Heald E.; Hegerl E.; Lal P.; Luna L. A.; Pannier F.; Ramdial B.; Saenger P.; Schaeffer-Novelli Y.; Schweithelm J.; Snedaker S. C.; Srivastava P. D. L.; Weidenbach R.; Yokel B, Dixon R. G.; Eong O. J.; Saifullah S. M. **Handbook for mangrove area management**. United Nations Environment Program and East-West Center, Environment and Policy Institute, Honolulu, Hawaii 1984, 123 p.

Alongi, D.M. Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. **Microbial Ecology** v. 15, 59-79 p., 1988.

Alongi, D.M. Zonation and seasonality of benthic primary production and community respiration in tropical mangrove forests. **Oecologia** v.98, 320-327 p., 1994.

Al-Saleh, E. S.; Obuekwe, C. Inhibition of hydrocarbon bioremediation by lead in a crude oil-contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation** v. 56, 1–7 p., 2005.

Amann, R. I.; Ludwig, W.; Schleifer, K. H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v. 59, 143-169 p., 1995.

Andreoni, V.; Gianfreda, L. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. **Applied and Environmental Microbiology** v. 76, 287-308 p., 2007

ANP (Agência Nacional do Petróleo) **Anuário estatístico brasileiro do petróleo e do gás natural**. 135 p., 2002.

ANP (Agência Nacional do Petróleo) **Anuário estatístico brasileiro do petróleo e do gás natural**. 190 p., 2007.

Atlas, R.M. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. **Microbiological Reviews** v. 45, 180-209 p., 1981.

Atlas, R. M. Petroleum Biodegradation and oil spill Bioremediation. **Marine Pollution Bulletin** v. 31(4-12), 178-182 p., 1995.

Atlas, R. M.; Bartha R. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. **Advanced Microbial Ecology** v. 12, 287-338 p., 1992.

Atlas, R. M.; Bartha, R. **Microbial Ecology: Fundamentals and Applications** 4^a ed. Benjamin/Cummings, Redwood City, California, 1998, 254 p.

Avarre, J. C.; Lajudie, P.; Bena, G. Hybridization of genomic DNA to microarrays: a challenge for the analysis of environmental samples. **Journal of Microbiological Methods** v. 69, 242-248 p., 2007.

Baldi, P.; Hatfield, G. W. **DNA Microarrays and Gene Expression: From Experiments to Data Analysis and Modeling** Cambridge University Press, New York, New York 2002, 214 p.

Bamforth, S.; Singleton, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** v.80, 723-736 p., 2005.

Benlloch, S.; Martinez-Murcia, A. J.; Rodriguez-Valera, F. Sequencing of bacterial and archaeal 16S rRNA genes directly amplified from a hypersaline environment. **Systemic and Applied Microbiology** v.18, 574-581 p., 1995.

Borges, A. C.; Dias, J. C.; Machado, W.; Patchineelam, S. R. Distribuição espacial de ferro, cobre e chumbo em sedimentos de manguezal em um gradiente de degradação na baía de Guanabara (Estado do Rio de Janeiro) **Química Nova** v.30, 66-69 p., 2007.

Boschker, H. T. S.; Wielemaker, A.; Schaub, B. E. M.; Holmer, M. Limited coupling of macrophyte production and bacterial carbon cycling in the sediments of *Zostera* spp. meadows **Marine Ecology Progress Series** v. 203, 181–189 p., 2000.

Bouillon, S.; Connolly, R.; Lee, S. Y. Organic matter exchange and cycling in mangrove ecosystems: recent insights from stable isotope studies. **Journal of Sea Research** , v. 59, 44-58 p., 2007.

Braddock, J. F.; Lindstrom, J. E.; Yeager, T. R.; Rasley, B. T.; Brown, E. J. Patterns of microbial activity in oiled and unoiled sediments in Prince William Sound EXXON VALDEZ. **Proceedings of the Exxon Valdez oil spill symposium**. Bethesda: American Fisheries Society, v.18, 94-108 p., 1996.

Brito, E. M.; Guyoneaud, R.; Goni-Urriza, M.; Ranchou-Peyruse, A.; Verbaere, A.; Crapez, M.; Wasserman, A. J. C.; Duran, R. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. **Research in Microbiology** v. 157, 752-762 p., 2006.

Bodrossy, L.; Stralis-Pavese, N.; Murrell, J. C.; Radajewski, S.; Weilharter, A.; Sessitsch, A. Development and validation of a diagnostic microbial microarray for methanotrophs. **Environmental Microbiology** v.5(7), 566-582p., 2003.

Burlage, R. S.; Atlas, R.; Stahl, D.; Geesey, G.; Sayler, G. (eds.) **Techniques in Microbial Ecology** Oxford University Press, New York, New York, 1998, 480 p.

Cardona, P.; Botero, L. Soil characteristics and vegetation structure in a heavily deteriorated mangrove forest in the Caribbean coast of Colombia. **Biotropica** v.30, 24–34 p., 1998.

Ceará. Secretaria de Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. **Que é manguezal**. Fortaleza, Ceará, 1992, 25p.

Celino, J. J.; Queiroz, A. F. S. Fonte e grau da contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de baixa massa molecular em sedimentos da baía de Todos os Santos, Bahia.

Rem: Revista da Escola de Minas, v. 59, 265-270 p., 2006.

Celino, J. J.; Queiroz, A. F. S.; Triguís, J. A.; Oliveira, O. M. C.; Santiago, J. S. Assessment of oil extraction waste in sediments adjacent to Pedra Branca Station, Todos os Santos Bay, Northeastern, Brazil. **Proceedings of ALAGO Congress on Organic Geochemistry** v. 1, 247-250 p., 2006.

Cheung, V.G.; Morley, M.; Aguilar, F.; Massimi, A.; Kucherlapati, R.; Childs, G. Making and reading microarrays. **Nature Genetics Supplement** v.21, 15-19 p., 1999.

Cho, J. C.; Tiedje, J. M. Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. **Applied and Environmental Microbiology** v. 67, 3677-3682 p., 2001.

Corseuil, H. X.; Marins, M. D. M. Contaminação de água subterrânea por derramamento de gasolina: O problema é grave? **Engenharia Sanitária** v. 2, 50-54 p., 1997.

Costa, A. B. **Caracterização Molecular e Isotópica de Material Orgânico em Sedimentos da Baía de Todos os Santos (BA)**. Tese (Doutorado) Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 109 p., 2006.

Cunha-Lignon, M. **Dinâmica do manguezal no Sistema de Cananéia-Iguape, Estado de São Paulo - Brasil. São Paulo**. Dissertação (Mestrado) Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 57 p., 2001.

Cury, J. C.; Torrado, P. V.; Lambais, M. R. Impacto da poluição por petróleo na diversidade genética e funcional da microbiota de solos de mangue. **Anais do Simpósio de Química e Meio Ambiente** v. 1, 29-29 p., 2002.

Dabert, P.; Delgenes, J.P.; Moletta, R.; Godon, J. J.; Contribution of molecular microbiology to the study in water pollution removal of microbial community dynamics **Reviews in Environmental Science and Biotechnology** v.1, 39-49 p., 2002.

Denef, V. J.; Park, J.; Rodrigues, J. L. M.; Tsoi, T. V.; Hashsham, S. A.; Tiedje, J. M. Validation of a more sensitive method for using spotted oligonucleotide DNA microarrays for functional genomics studies on bacterial communities. **Environmental Microbiology** v. 5, 933-943 p., 2003.

Dennis, P.; Edwards, E. A.; Liss, S. N.; Fulthorpe, R. Monitoring gene expression in mixed microbial communities by using DNA microarrays. **Applied and Environmental Microbiology** v. 69, 769–778 p., 2003.

Dittmar, T.; Lara, R. J.; Kattner, G. River or mangrove? Tracing major organic matter sources in tropical Brazilian coastal waters. **Marine Chemistry** v. 73, 253–271 p., 2001.

Dorigo, U.; Volatier, L.; Humbert, J F. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. **Water Research** v.39, 2207–2218 p., 2005.

Dowty, R. A.; Shaffer, G. P. Hester, M. W.; Childers, G. W.; Campo, F. M.; Greene, M. C. Phytoremediation of small-scale oil spills in fresh marsh environments: a mesocosm simulation. **Marine Environmental Research** v. 52, 195–211 p., 2001.

Dubey, S. K.; Tripathi, A. K.; Upadhyay, S. N. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource. **Bioresource Technology** v. 97, 2217–2224 p., 2006.

Duggan, D. J.; Bittner, M.; Chen, Y; Meltzer, P.; Trent, J. M. Expression profiling using cDNA microarrays. **Nature** v.21, 10-14 p., 1999.

Dunbar, J.; Ticknor, L. O.; Kuske, C. R. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. **Applied and Environmental Microbiology** v. 66, 2943–2950 p., 2000.

Edwards, R.A.; Rodriguez-Brito, B.; Wegley, L.; Haynes, M.; Breitbart, M.; Peterson, D.M., Saar, M.O.; Alexander, S.; Alexander, E.C. Jr.; Rohwer, F. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. **BMC Genomics**, v.7, 57-69 p., 2006

Ehrenreich, A. DNA microarray technology for the microbiologist: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology** v.73, 255-273 p., 2006.

El-Tarabily, K.A. Total microbial activity composition of a mangrove sediment are reduced by oil pollution at a site in the Arabian Gulf. **Canadian Journal of Microbiology** v. 48, 176–182 p., 2002.

Eyers, L.; George, I.; Schuler, L.; Stenuit, B.; Agathos, S. N.; Fantroussi, S. E. Environmental genomics: exploring the unmined richness of microbes to degrade xenobiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 66, 123–130 p., 2004.

Felske, A.; Akkermans, A. D. L. Spatial homogeneity of abundant bacterial 16S rRNA molecules in grassland soils. **Microbiology Ecology** v. 36, 31-36 p., 1998.

Fierer, N.; Jackson, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v.103, 626-631 p., 2006.

Fierer, N.; Jackson, J. A.; Vilgalys, R.; Jackson, R. B. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. **Applied and Environmental Microbiology** v.71, 4117-4120 p., 2005.

Fruehauf, S. P. ***Rhizophora mangle* (Mangue vermelho) em áreas contaminadas de manguezal na Baixada Santista.** Tese (doutorado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 223 p., 2005.

Gattuso, J. P.; Frankignoulle, M.; Wollast, R. Carbon and carbonate metabolism in coastal aquatic ecosystems. **Annual Review of Ecology and Systematics** v.29, 405-434 p., 1998.

Gentry, T. J.; Wickham, G. S.; Schadt, C. W.; He, Z.; Zhou, J. Microarray applications in microbial ecology research. **Microbial Ecology** v.52, 159-175 p., 2006.

Ghilarov, A. What does “biodiversity” mean: scientific problem or convenient myth? **Trends in Ecology and Evolution** v.11, 304–306 p., 1996.

Giani, L.; Bashan, Y.; Holguin, G.; Strangmann, A. Characteristics and methanogenesis of the Balandra lagoon mangrove soils, Baja California Sur, Mexico. **Geoderma** v.72, 149-160 p., 1996.

Gomes, R. V. **Isolamento e Caracterização da Microbiota Presente em Amostras de Petróleo Pesado e Estudo da Produção de Biossurfactantes por uma Cepa de *Staphylococcus aureus* Seleccionada.** Monografia (Bacharelado), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 83 p., 2004.

Gruntzig, B.; Stres, H. L.; del Río, A.; Tiedje, J. M. **Improved protocol for T-RFLP by capillary electrophoresis.** 2002. Disponível em <http://rdp8.cme.msu.edu/html/trflp_jul02.html>. Acesso em: 15 de novembro de 2007.

Guo, C. L.; Zhou, H. W.; Wong, Y. S.; Tam, N. F. Y. Isolation of PAH-degrading Bacteria from Mangrove Sediments and their Biodegradation Potential. **Marine Pollution Bulletin** v. 51, 1054-1061 p., 2005.

He, Z.; Wu, L.; Fields, M. W.; Zhou, J Comparison of microarrays with different probe sizes for monitoring gene expression. **Applied and Environmental Microbiology** v.71, 5154–5162 p., 2005.

Holguin, G.; Vazquez, P.; Bashan, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and habilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology Fertility of Soils** v. 33, 265–278 p., 2001.

Hughes, J. B.; Hellmann, J. J.; Ricketts, T. H.; Bohannon, B. J. M. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology** v. 67, 4399–4406 p., 2001.

Iwamoto, T.; Nasu, M. Review: current bioremediation practice and perspective. **Journal of Bioscience and Bioengineering** v. 92, p. 1-8, 2001.

Jacques, R. J. S.; Okeke, B. C.; Bento, F. M. ; Peralba, M. C. R.; Camargo, F. A. O. Characterization of a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Microbial Consortium from a Petrochemical Sludge Landfarming Site. **Bioremediation Journal** v. 11, 1-11 p., 2007.

Jahnke, R. A.; Craven, D. B. Quantifying the Role of Heterotrophic Bacteria in the Carbon Cycle: A Need for Respiration Rate Measurements. **Limnology and Oceanography** v. 40, 436-441 p., 1995.

Jennerjahn, T.C.; Ittekkot, V. Relevance of mangroves for the production and deposition of organic matter along tropical continental margins. **Naturwissenschaften** v. 89, 23-30 p., 2002.

Juhanson, J.; Truu, J.; Heinaru, E.; Heinaru, A. Temporal dynamics of microbial community in soil during phytoremediation field experiment. **Journal of Environmental Engineering and Landscape Management** v. 15, 213-220 p., 2007.

Kathiresan, K.; Qasim, S. Z.. **Biodiversity of Mangrove Ecosystems**. Hindustan Publishing Corporation, New Delhi, Delhi, 2005, 251 pp.

Kennedy, A. C.; Smith, K. L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and Soil**, v.170, 75-86 p., 1995.

Kirk, J. L.; Beaudette, L. A.; Hart, M.; Moutoglis, P.; Klironomoms, J. N.; Lee, H.; Trevors, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods** v. 58, 169–188 p., 2004.

Lacerda, L. D.; Carvalho, C. E. V.; Tanizaki, K. F.; Ovalle, A. R.; Rezende, C. E. The biogeochemistry and trace metals distribution of mangrove rhizospheres. **Biotropica** v.25, 252-257 p., 1993.

Leão, Z. M. A. N.; Dominguez, J. M. L. Tropical coast of Brazil. **Marine Pollution Bulletin** v. 41, 112-122 p., 2000.

Leckie, S.E. Methods of microbial community profiling and their application to forest soils. **Forest Ecology and Management** v. 220, 88–106 p., 2005.

Lee, S.W.; Won, K.; Lim, H. K.; Kim, J.C.; Choi, G. J.; Cho, K. Y. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 65, 720–726 p., 2004.

Lehninger, A. L. **Principles of Biochemistry** 4^a ed. Worth Publishers, New York, New York, 2000, 1100 p.

Lessa, G. C; Dominguez, J. M. L.; Bittencourt, A. C. S. P.; Britcha, A. The Tides and Tidal Circulation of Todos os Santos Bay, Northeast Brazil: a general characterization. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** v.73, 245-261 p., 2001.

Liang, Y.; Tse, M. F.; Young, L.; Wong, M. H. Distribution patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sediments and fish at Mai Po Marshes Nature Reserve, Hong Kong **Water Research** v. 41, 1303 – 1311 p., 2007.

Liu, W. T.; Marsh, T. L.; Cheng, H.; Forney, L. J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology** v.63, 4516–4522 p., 1997.

Liu, W.; Wu, J.; Li, E. S.; Selamat, E. S. Emission Characteristics of Fluorescent Labels with Respect to Temperature Changes and Subsequent Effects on DNA Microchip Studies. **Applied and Environmental Microbiology** v.71, 6453–6457 p., 2005.

Loring, J. Evolution of microarray analysis. **Neurobiology of Aging** v. 27, 1084-1086 p., 2006.

Loy, A.; Kirsten, K.; Lehner, A.; Drake, H. L.; Wagner, M. Microarray and functional gene analyses of sulfate-reducing prokaryotes in low-sulfate, acidic fens reveal cooccurrence of recognized genera and novel lineages. **Applied and Environmental Microbiology** v.70, 6998–7009 p., 2004.

Ludemann, H.; Arth, I.; Liesack, W. Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores. **Applied and Environmental Microbiology** v. 66, 754–762 p., 2000.

Lukow, T.; Dunfield, P. F.; Liesack, W. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. **FEMS Microbiology Ecology** v. 32, 241-247 p., 2000.

Marsh, T. L. Terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. **Current Opinions in Microbiology** v. 2, 323-7 p., 1999.

Marsh, T.L. Culture-independent microbial community analysis with terminal restriction fragment length polymorphism. **Methods in Enzymology** v. 397, 308–329 p., 2005.

Marsh, T.L.; Liu, W.; Forney, L. J.; Cheng, H. Beginning a molecular analysis of the eukaryal community in activated sludge. **Water Science Technology** v. 37, 455-460 p., 1998.

Marsh, T.L.; Saxman, P.; Cole, J.; Tiedje, J. M. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology** v. 66, 3616- 21 p., 2000.

Martins, L. K. P.; Nascimento, I. A.; Fillman, G.; King, R.; Evangelista, A. J. A.; Readman, J.W.; Depledge, M. H. Lysosomal responses as diagnostic tool for the detection of oil chronic petroleum pollution at Todos os Santos Bay. **Brazil Environmental Research** v.99, 387-396 p., 2005.

Mastaller, M. **Resumo da literatura sobre conceitos do uso de áreas de mangue, com referência especial para a aquicultura artesanal.** Brasília: IBAMA, 1990, 79 p.

Mello, I. S.; Azevedo, J. L. **Ecologia Microbiana.** Jaguariúna: Embrapa, CNPMA, 1998, 488 p.

Michel, J. **Mangrove habitat injury assessment and scaling protocols.** Report to NOAA Damage Assessment Center, Silver Spring, Maryland, 2001, 68 p.

Mille, G.; Asiaa, L.; Guilianoa, M.; Mallereta, L.; Doumenqa, P. Hydrocarbons in coastal sediments from the Mediterranean sea (Gulf of Fos area, France) **Marine Pollution Bulletin** v. 54, 566-575 p., 2007

Mills, D. K.; Fitzgerald, K.; Litchfield, C. D.; Gillevet, P. M. A comparison of DNA profiling techniques for monitoring nutrient impact on microbial community composition during

bioremediation of petroleum-contaminated soils. **Journal of Microbiological Methods** v. 54, 57-74 p., 2003.

Moeseneder, M. M.; Winter, C.; Arrieta, J.M.; Herndl, G.J. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) screening of a marine archaeal clone library to determine the different phylotypes. **Journal of Microbiological Methods** v. 44, 159-172 p., 2001.

Moscatelli, M. Salvando o Manguezal. **Revista Brasileira de Ecologia do Século 21 – ECO** v.41, 41-42 p., 1999.

Mummey, D. L.; Stahl, P. D. Spatial and temporal variability of bacterial 16S rRNA-based T-RFLP patterns derived from soil of two Wyoming grassland ecosystems. **FEMS Microbiology Ecology** v. 46, 113-120 p., 2003.

NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) **Primary Restoration: Guidance Document for Natural Resource Damage Assessment under the Oil Pollution Act of 1990**. Damage Assessment and Restoration Program, Silver Spring, Maryland 1996, 762 p.

NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration). **Oil Spills in Mangroves**. Office of Response and Restoration Administration, Lafayette, Louisiana, 2002, 72 p.

NRC (National Research Council) **Oil in the sea III: inputs, fates and effects**. National Academy Press, Washington D. C., 2003, 128 p.

Nuber, U. A. **DNA microarrays**. Taylor & Francis, New York, New York, 2005, 299 p.

Nunes, L. S. S.; Tavares, T. M. ; Dippels, J ; Jaeschke, W. Measurements of Atmospheric Concentrations of Reduced Sulphur Compounds in the All Saints Bay Area in Bahia, Brazil. **Journal Of Atmospheric Chemistry** v. 50, 79-100 p., 2005.

Ogram, A. Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future, **Soil Biology and Biochemistry** v.32, 1499–1505 p., 2000.

Orphan, V. J.; Haffenbradl, D.; Taylor, L. T.; Delong, E. F. Culture-Dependent and Culture-independent characterization of Microbial Assemblages associated with high temperature petroleum reservoirs. **Applied and Environmental Microbiology** v.66, 700-711 p., 2000.

Osborn, A. M.; Moore, E. R.; Timmis, K. N. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. **Environmental Microbiology** v.2, 39-50 p., 2000.

Osborn, A. M.; Smith, C. J. (Eds) **Molecular Microbial Ecology**. Taylor and Francis, Abingdon, Oxfordshire, 2005, 381 p.

Osterreicher-Cunha, P.; Guimaraes, J. R. D.; Vargas J. R.; Silva, M. I. P. Study of biodegradation processes of btex-ethanol mixture in tropical soil. **Water, Air and Soil Pollution** v. 181, 303-317 p., 2007.

Ovreas, L. Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. **Ecology Letters** v. 3, 236–251 p., 2000.

Ovreas, L.; Jensen, S.; Daae, F. L.; Torsvik, V. Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. **Applied and Environmental Microbiology** v. 64, 2739–2742 p., 1998.

Ovreas, L.; Torsvik, V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. **Microbiology Ecology** v. 36, 303–315 p., 1998.

Pace, N. R. A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. **Nature** v. 276, 734-740 p., 1997.

Pereira, R. M. **Diversidade Bacteriana de um latossolo sob cultivo intensivo e floresta através da análise metagenômica**. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil, 75 p., 2003.

Prada-Gamero, R. M.; Vidal-Torrado, P.; Ferreira, T. O. Mineralogia e físico-química dos solos de mangue do rio Iriri no canal de Bertioaga (Santos, SP). **Revista Brasileira de Ciências do Solo** v. 28, 233-243 p., 2004.

Quartel, S.; Kroon, A.; Augustinus, P. G. E. F.; Van Santen, P.; Tri, N. Wave attenuation in coastal mangroves in the Red River Delta. **Vietnam Journal of Asian Earth Sciences** v. 29, 576-584 p., 2006.

Ramsay, M.A.; Swannell, R. P. J.; Shipton, W. A.; Duke, N. C.; Hill, R. T. Effect of bioremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin** v. 41, 413–419 p., 2000.

Rhee, S. K.; Liu, X.; Wu, L.; Chong, S. C.; Wan, X.; Zhou, J. Detection of biodegradation and biotransformation genes in microbial communities using 50-mer oligonucleotide microarrays. **Applied and Environmental Microbiology** v. 70, 4303–4317 p., 2004.

Roling, W. F. M.; Larter, S. R.; Head, I. M. The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. **Research in Microbiology** v. 154, 321–328 p., 2003.

Ron, E. Z.; Rosenberg, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology** v.13, 249-252 p., 2002.

Rondon, M. R.; August, P. R.; Bettermann, A. D.; Brady, S. F.; Grossman, T. H.; Liles, M. R.; Loiacono, K. A.; Lynch, B. A.; MacNeil, I. A.; Minor, C.; Tiong, C. L.; Gilman, M.; Osburne, M. S.; Clardy, J.; Handelsman, J.; Goodman, R. M. Cloning the soil metagenome: a strategy for

accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology** v. 66, 2541-2547 p., 2000.

Rossi, M.; Mattos, I. F. A. Solos de mangue do Estado de São Paulo: Caracterização química e física. **Revista do Departamento de Geografia** v.15, 101-113 p., 2002.

Sakamoto, M.; Takeuchi, Y.; Umeda, M.; Ishikawa, I.; Benno, Y. Application of terminal RFLP analysis to characterize oral bacterial flora in saliva of healthy subjects and patients with periodontitis. **Journal of Medical Microbiology** v. 52, 79–89 p., 2003.

Saleh-Lakha, S.; Miller, M.; Campbell, R. G.; Schneider, K.; Elahimanesh, P.; Hart, M. M.; Trevors, J. T. Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges. **Journal Microbiol Methods** v. 63, 1–19 p., 2005.

Santos, S. R.; Ochman, H. Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. **Environmental Microbiology** v. 6, 754–759 p., 2004.

Santos, J. B.; Celino, J. J.; Queiroz, A. F. S.; Argolo, J. L.; Santiago, J. S. Análise Estatística Multivariada da Distribuição de Metais em Sedimentos Superficiais de manguezais na Porção Norte da baía de Todos os Santos, Bahia. **Anais do XI Congresso Brasileiro de Geoquímica** v. 1, 1-5 p., 2007.

Schaeffer-Novelli, Y. **Manguezal: ecossistema entre terra e o mar**. Caribbean Ecological Research, São Paulo, São Paulo, 1995, 62 p.

Schaeffer-Novelli, Y.; Cintrón-Molero, G.; Soares, M.L.G.; de-Rosa, T. Brazilian Mangroves. **Aquatic ecosystem health and management** v.3, 561 – 570 p., 2000.

Schena, M.; Shalon, D.; Davis, R. W.; Brown, P. O. Quantitative monitoring of gene-expression patterns with complementary-DNA microarray. **Science** v. 270, 467–470 p., 1995.

Scherrer, P.; Mille, G. Biodegradation of crude oil in an experimentally polluted peaty mangrove soil. **Marine Pollution Bulletin** v. 20, 430-432 p., 1989.

Schulte, E. E.; Hopkins, B.G. Estimation of soil organic matter by weight by weight Loss-On-Ignition. In: **Soil Organic matter: Analysis and Interpretation**. (ed.) Magdoff, F. R.; Tabatabai, M. A.; Hanlon, E. A. Jr. Special publication n.46. Soil Sci. Soc. Amer. Madison, Wisconsin, 1996, 21-32 p.

Shriadah, M. M. A. Heavy metals in mangrove sediments of the United Arab Emirates shoreline (Arabian Gulf). **Water, Air and Soil Pollution** v.116, 523-534 p., 1998.

Silva, R. M. P.; Rodríguez, A. A.; Oca, J. M. G. M.; Moreno, D. M. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* AT18 strain. **Tecnologia Química** v. 26, 70-77 p., 2006.

SINDIPETRO (Sindicato dos Petroleiros) **Acidentes ocorridos na indústria do petróleo**. Diretoria Executiva do SINDIPETRO–ES Espírito Santo, Disponível em < <http://www.sindipetro-es.org.br/?inc=materia&IDcat=50&IDdados=558>>. Acesso em: 12 de dezembro de 2007.

Singh, B.K.; Munro, S.; Reid, E.; Ord, B.; Potts, J.M.; Paterson, E.; Millard, P. Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. **European Journal of Soil Science** v. 57, 72–82 p., 2006.

Siripong, S; Kelly, J. J.; Stahl, D. A.; Rittmann, B. E. Impact of prehybridization PCR amplification on microarray detection of nitrifying bacteria in wastewater treatment plant samples. **Environmental Microbiology** v.8(9), 1564–1574 p., 2006.

Sloan, N. A. Oil impacts on Cold-water Marine Resources: a Review relevant to Parks Canada's Evolving Marine Mandate. **Parks Canada National Parks**, Ocassional Paper No. 11, 1999.

Small, J.; Call, D.R.; Brockman, F.J.; Straub, T.M.; Chandler, D.P. Direct detection of 16S rRNA in soil extracts by using oligonucleotide microarrays. **Applied and Environmental Microbiology** v. 67, 4708-4716 p., 2001.

Stralis-Pavese, N.; Sessitsch, A.; Weilharter, A.; Reichenauer, T.; Riesing, J.; Csontos, J.; Murrell, J. C.; Bodrossy, L Optimization of diagnostic microarray for application in analyzing landfill methanotroph communities under different plant covers. **Environmental Microbiology** v.6, 347–363 p., 2004.

Sousa, O. V.; Macrae, A.; Menezes, F.G.R.; Gomes, N.C.M.; Vieira, R.H.S.F.; Mendonça-Hagler, L.C.S. The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceara', Brazil **Marine Pollution Bulletin** v. 52, 1725–1734 p., 2006.

Spalding, M.; Blasco, F.; Field, C. (Eds.) **World Mangrove Atlas**. The International Society for Mangrove, Okinawa, Japan, 1997, 178 p.

SQA/MMA (Secretaria de qualidade ambiental, Ministério do meio ambiente, Brasil) **Especificações e Normas Técnicas para Elaboração de Cartas de Sensibilidade Ambiental para Derramamentos de Óleo/ Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Qualidade Ambiental nos Assentamentos Humanos**. Programa de Gerenciamento Ambiental Territorial. Projeto de Gestão Integrada dos Ambientes Costeiros e Marinhos. Brasília, D. F., 2002, 107p.

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

Tam, N. F. Y.; Ke, L.; Xang, X. H.; Wong, Y. S. Contamination of PAH in surface sediments of mangroves swamps **Environmental Pollution** v. 114, 255 – 263 p., 2001.

Tavares, T. M. **Contaminação química no ambiente marinho in baía de Todos os Santos: diagnóstico sócio - ambiental e subsídios para a gestão**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 164 p., 1997.

Thies, J. E. Soil microbial community analysis using terminal. restriction fragment length polymorphisms. **Soil Science Society of America Journal** v. 71, 579-591 p., 2007.

Thompson, I. P.; Bailey, M. J.; Ellis, R. J.; Maguire, N.; Meharg, A. A. Response of soil microbial communities to single and multiple doses of an organic pollutant. **Soil Biology and Biochemistry** v. 31, 95-105 p., 1999.

Tiedje, J. M.; Asuming-Brempong, S.; Nusslein, K.; Marsh, T. L.; Flynn, S. J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology** v.13, 109–122 p., 1999.

Tiedje, J. M.; Cho, J. C.; Murray, A.; Treves, D.; Xia, B.; Zhou, J. Soil teeming with life: new frontiers for soil science. In: **Sustainable Management of Soil Organic Matter**. (ed.) Rees, R.M.; Ball, B.C.; Campbell C.D.; Watson, C.A., CABI Int'l, Wallingford, Oxfordshire, 2001, 393-412 p.

Tom-Petersen, A.; Leser, T. D.; Marsh, T. L.; Nybroe, O. Effects of copper amendment on the bacterial community in agricultural soil analyzed by the T-RFLP technique. **FEMS Microbiology Ecology** v. 46, 53–62 p., 2003.

Torsvik, V. L. Isolation of bacterial DNA from soil. **Soil Biology and Biochememistry** v. 12, 15-21 p., 1980.

Torsvik, V.; Gokdoyr, J.; Daae, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology** v.56, 782-787 p., 1990.

Torsvik, V.; Ovreas, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology** v. 5, 240–245 p., 2002.

Uderman, S. Perspectivas industriais. In: **Tendências da Economia Baiana**. Seplantec, Salvador, Bahia, 93–176 p., 2000.

Van Hamme, J. D.; Singh, A.; Ward, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v. 67(4), 503-549 p., 2003.

Vannucci, M. **Os manguezais e nós: uma síntese de percepções**. Edusp, São Paulo, São Paulo, 1999, 233 p.

Van Santen, P.; Augustinus, P. G. E. F.; Janssen-Stelder, B. M.; Quartel, S.; Tri, N.H. Sedimentation in an estuarine mangrove system. **Journal of Asian Earth Sciences** v. 29, 566–575 p., 2007.

Veiga, I. G. **Avaliação da origem dos hidrocarbonetos em sedimentos superficiais de manguezais da região norte da baía de Todos os Santos/Bahia**. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual do Norte Fluminense, Macaé, Rio de Janeiro, 224 p., 2003.

Venturini, N.; Tommasi, L. R. Polycyclic aromatic hydrocarbons and changes in the trophic structure of polychaete assemblages in sediments of Todos os Santos Bay, Northeastern, Brazil., **Marine Pollution Bulletin** v. 48, 97-107 p., 2004.

Walsh, G.E. Mangrove forests: a review. In: **Ecology of Halophytes** Reinold, R.J.; Queen, W. H. (eds.) Academic Press, New York, New York, 51-174 p., 1974.

Watson, J. D.; Crick, F. H. C. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature** v. 171, 737-738 p., 1953.

White, L.G.; Greer, C.W.; Inniss, W. E. Assessment of the biodegradation potential of psychrotrophic microorganisms. **Canadian Journal of Microbiology** v.42, 99-106 p., 1996.

Wu, L.; Thompson, D. K.; Li, G.; Hurt, R. A.; Tiedje, J. M.; Zhou, J. Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. **Applied and Environmental Microbiology** v. 67, 5780–5790 p., 2001.

Wuertz, S.; Okabe, S.; Hausner, M. Microbial communities and their interactions in biofilm systems: An overview. **Water Science Technology** v. 49, 327–336 p., 2004.

Zhang, J.; Cai, L. Z.; Yuan, D. X.; Chen, M. Distribution and sources of polynuclear aromatic hydro-carbons in Mangrove surficial sediments of Deep Bay, China **Marine Pollution Bulletin** v. 49, 479–486 p., 2004.

Zhang, Y.; Zhang, X.; Liu, X.; Xiao, Y.; Qu, L.; Wu, L.; Zhou, J. Microarray-based analysis of changes in diversity of microbial genes involved in organic carbon decomposition following land use/cover changes. **FEMS Microbiology Letters** v. 266, 144–151 p., 2007.

Zheng, G. J.; Man, B. K. W.; Lam, J. C. W.; Lam, M. H. W. e Lam, P. K. S. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediment of a sub-tropical coastal wetland, **Water Research**, v.36, 1457-1468 p., 2002.

Zhou, J. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. **Current Opinion in Microbiology** v. 6, 288-294 p., 2003.

Zobell, C. T. The occurrence, effect and fate of oil polluting the sea. **Advances in Water Pollution Research** v. 3, 85-118 p., 1964.

ANEXOS

DADOS PROTEGIDOS PARA PUBLICAÇÃO