

Quando o petróleo empobrece: perda microbiana de sedimento de manguezal da Floresta Atlântica exposta à perturbação

Mahysa Ferreira Costa^{1*}, Eddy José Francisco de Oliveira²

¹Mestra em Ecologia e Evolução, Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil. (e-mail:mahysaferreiracosta@yahoo.com.br)

²Doutor em Ciências Biológicas (Genética), Professor da Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil.

Histórico do Artigo: Submetido em: 05/09/2023 – Revisado em: 21/11/2023 – Aceito em: 20/04/2024

RESUMO

O presente estudo visou avaliar as alterações ocorridas na estrutura e diversidade da comunidade microbiana autóctone de sedimentos de manguezal da Floresta Atlântica, exposta a condição de estresse sob efeito do petróleo da bacia do Recôncavo, em análise laboratorial *in vitro*. Foi realizada a amplificação da região V4 do gene 16S rRNA utilizando a plataforma NGS Illumina, para as avaliações do efeito do petróleo frente aos grupos microbianos após a perturbação. A partir dos resultados gerados, demonstrou-se um relevante peso nos estudos ecológicos mediante a criação de estratégias para recuperação de áreas estuarinas degradadas, principalmente porque a área do estudo em questão recebe influência do estuário da Baía de Camamu e sua localização geográfica chama a atenção sobre sua vulnerabilidade para a ocorrência de impactos provocados pelo derramamento de petróleo, além de ser uma Área de Proteção Ambiental (APA). O resultado do ambiente pós-perturbação, da comunidade microbiana, por meio da nova geração de sequenciamento massivo, demonstrou a abundância expressiva do filo *Proteobacteria*, seguido do filo *Chloroflexi*, sendo tais grupos indicadores da presença de microrganismos que possuem função metabólica para biorremediação, além de demonstrar uma redução acentuada das células bacterianas ao final dos 30 dias, sendo avaliado em períodos de 7, 15 e 30 dias, em contato com o petróleo. Diante do que foi observado através desse estudo, a estrutura e a diversidade da comunidade microbiana autóctone do sedimento de manguezal da Floresta Atlântica foram afetadas negativamente e, quase que completamente, na presença do contaminante.

Palavras-Chaves: Petróleo da Bacia do Recôncavo; diversidade bacteriana; estuário.

When oil depletes: microbial loss of mangrove sediment from the atlantic forest exposed to disturbance

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the changes that occurred in the structure and diversity of the autochthonous microbial community of mangrove sediments from the Atlantic Forest, exposed to stress conditions under the effect of oil from the Recôncavo basin, in *in vitro* laboratory analysis. Amplification of the V4 region of the 16S rRNA gene was carried out using the NGS Illumina platform, to evaluate the effect of oil on microbial groups after disturbance. From the results generated, a relevant weight in ecological studies was demonstrated through the creation of strategies for the recovery of degraded estuarine areas, mainly because the study area in question is influenced by the Camamu Bay estuary and its geographical location draws attention. about its vulnerability to impacts caused by oil spills, in addition to being an Environmental Protection Area (APA). The result of the post-disturbance environment, of the microbial community, through the new generation of massive sequencing, demonstrated the significant abundance of the phylum *Proteobacteria*, followed by the phylum *Chloroflexi*, with such groups being indicators of the presence of microorganisms that have a metabolic function for bioremediation, in addition to demonstrate a marked reduction in bacterial cells at the end of 30 days, being evaluated in periods of 7, 15 and 30 days, in contact with oil. Given what was observed through this study, the structure and diversity of the autochthonous microbial community of the Atlantic Forest mangrove sediment were negatively affected, almost completely, in the presence of the contaminant.

Keywords: Oil from the Recôncavo Basin; bacterial diversity; estuary.

Costa, M.F., de Oliveira, E.J.F (2024). Quando o petróleo empobrece: perda microbiana de sedimento de manguezal da Floresta Atlântica exposta à perturbação. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v.12, n.2, p.02-18.



1. Introdução

Danos ambientais causados pela contaminação antrópica é uma preocupação global persistente, sendo a maioria desses impactos caracterizados pela presença de poluentes complexos, incluindo compostos inorgânicos, a exemplo dos metais pesados gerados por atividades de mineração e indústrias metalúrgicas, e orgânicos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) liberados no derramamento de petróleo (Jiao et al., 2016; Zhang et al., 2018; Magris; Giarrizzo, 2020; Soares; Teixeira; Bezerra; Paiva et al., 2020). Logo, os danos ambientais ocasionados por falha humana no vazamento de poluentes complexos provocam distúrbios preocupantes nos ambientes e organismos.

Com o passar dos anos o conceito de perturbação passou a ser entendido como uma desestabilização no equilíbrio da estrutura e composição de comunidades ou ecossistemas, provocados por eventos de caráter natural ou antropogênico (Wilkinson 2002; Laurance et al. 2002). Dessa forma, tais eventos propiciam a remoção dos organismos, ou interfere nas relações entre os mesmos, pelo processo de competição ou ainda por mudanças químicas, físicas e biológicas do ambiente (Liu et al., 2019; Zhang et al., 2018; Zhang et al., 2017). Dessa forma, as perturbações podem provocar alterações (diminuição ou perda) na estrutura e composição das comunidades.

Atualmente, diversas formas microbianas são encontradas em diferentes nichos ecológicos, especialmente nos solos, onde estão presentes as maiores reservas dessa diversidade (Palit et al., 2022). Além de apresentarem uma vasta diversidade genética, os microrganismos desempenham papéis imprescindíveis nos ciclos biogeoquímicos (Rosa et al, 2003) e em diversas funções ecológicas indispensáveis no ambiente, sendo os de principal interesse no trabalho aqueles que funcionam como destruidores de poluentes no processo de biorremediação. Tal processo tem como principal foco a recuperação de ambientes contaminados por acidentais derramamentos de compostos indesejáveis, que participam como reagentes das vias metabólicas de determinadas espécies microbianas, espécies essas que auxiliam na redução ou remoção do caráter tóxico desses compostos (Muteca, 2012; Ron and Rosenberg, 2014; Lea-Smith et al., 2015). Logo, a ampla diversidade microbiana desempenha papéis fundamentais na manutenção e funcionamento dos ecossistemas que podem controlar o destino de substâncias poluentes após o distúrbio, portanto desenvolvem atividades essenciais na produtividade, conservação e recuperação em ecossistemas de manguezais.

Diante do contexto abordado, nosso estudo buscou avaliar as mudanças na estrutura da comunidade microbiana autóctone de manguezal, situado em região de Floresta Atlântica em decorrência da condição de estresse sob efeito do petróleo após a perturbação. Estudos ecológicos demonstram relevante interesse mediante a criação de estratégias para recuperação de áreas estuarinas degradadas, em virtude da suscetibilidade às perturbações provocadas por derramamentos de petróleo. Assim, o estudo objetivou prognosticar como futuros distúrbios ambientais em áreas impactadas pelo petróleo podem provocar significativas alterações microbianas.

2. Material e Métodos

2.1 Caracterização do ambiente de coleta e a coleta das amostras

O trabalho foi desenvolvido com amostras de sedimento coletados em um ecossistema manguezal do rio Santarém, localizado no Ecopolo III da Área de Proteção Ambiental (APA) do Pratigi (-13.721829 e -39.033586), área de Mata Atlântica (Figura 1).

O Ecopolo III se caracteriza por extensas remanescentes florestais contínuas da Bahia, com predominância dos estuários com restingas e manguezais (OCT, 2012). É o Ecopolo mais influenciado pela maré e, portanto, mais suscetível aos impactos ambientais que podem ser ocasionados pelo derramamento de hidrocarbonetos.

As amostras de sedimentos coletadas em Setembro de 2018 foram submetidas ao experimento de

perturbação microbiana. Foram retiradas amostras superficiais com 0-10 cm (top) e a área foi amostrada em dois sítios caracterizados como: alagado (P1) e sem interferência marinha (P2). Os sítios de coleta foram amostrados em 3 subamostras com distância máxima de 3 m entre elas e, posteriormente agrupados (Figura 2).

Figura 1. Imagens do google maps representando a área de coleta
Figure 1. Google maps images representing the collection area



Fonte: Costa (2018)

Source: Costa (2018)

Figura 2. Foto representando os dois pontos de coleta
Figure 2. Photo representing the two collection points



Fonte: Costa (2018)

Source: Costa (2018)

2.2 Coleta do Inóculo

A coleta das amostras de sedimentos foi realizada com auxílio de um GPS (Sistema de Posicionamento Global), nos pontos definidos retirava-se a camada superficial que continha restos orgânicos presentes e que pudessem comprometer a qualidade das amostras. Com a ajuda de uma cavadeira manual, o trado holandês com 1,5 polegadas, foi realizada a coleta das camadas superficiais com profundidade de 0-10 cm (superficial = T) e subsuperficiais a uma profundidade de 30-35 cm (subsuperficial = B).

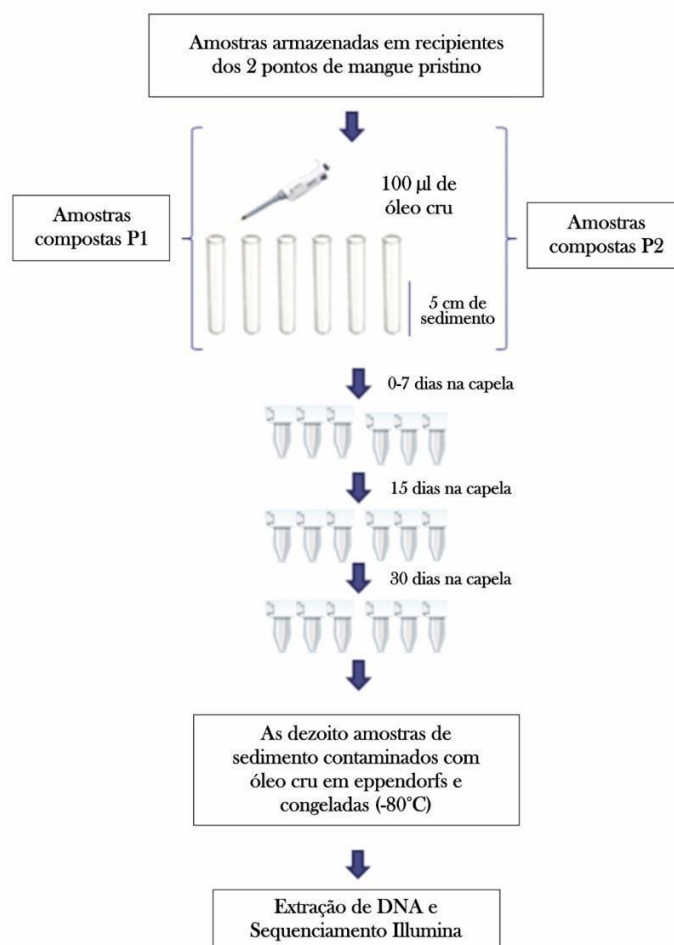
Após a retirada do trado contendo a amostra do sedimento foram armazenadas em recipientes de alumínio (marmitex 1200ml), esterilizados de fábrica, e aos mesmos foram adicionados 5 mL de tampão dess preservante (Dimetilsulfóxido + EDTA + Sal Saturado) para ajudar a manter o DNA extraível intacto, sem degradá-lo. Em seguida, todas as amostras identificadas foram acondicionadas em isopor e mantidas sob refrigeração durante todo o período de coleta e transporte até o laboratório, onde lá foram congeladas em freezer (- 80°C) até o momento da extração do DNA total.

Experimento de Perturbação Microbiana

A análise laboratorial foi realizada no dia seguinte após a coleta, no Laboratório de Entomologia, localizado no prédio do Labio, na Universidade Estadual de Feira de Santana, por meio de sistema de triplicata. Os tubos de ensaio, médios e estéreis, foram preenchidos com uma parcela central de sedimento, referente a cada amostra coletada, e aos mesmos adicionados 100 µl de óleo, também utilizado nessa proporção por Rytkonen *et al.* 1997. O óleo utilizado no experimento foi coletado em Miranga, pertencente à Bacia do Recôncavo - Brasil, datado de 2017 e doado pelo Laboratório de Estudo do Petróleo (Lepetro/ UFBA).

Após montagem, o experimento foi mantido em ambiente fechado para evitar contaminação durante o período de 30 dias e foi avaliado como essa comunidade microbiana responderia aos diferentes tempos de exposição ao contaminante: 7, 15 e 30 dias (t1; t2 e t3, respectivamente) de cada tubo (Figura 3).

Figura 3. Delineamento amostral
Figure 3. Sampling design



Fonte: Costa (2018)
Source: Costa (2018)

2.3 Análises Genômicas da Diversidade Microbiana

A extração do DNA genômico total de sedimento do ambiente estuarino e a purificação foram realizadas com o Miniprep Quick-DNA fecal/ Soil Microbe [®]Kit – Zymo Research, de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e quantificação do DNA extraído foram avaliadas por espectrofotometria usando Nanodrop 2000 (Thermo), utilizados 20ng de DNA como modelo para 18 ciclos de amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores da região V4 (515F - GTGCCAGCMGCCGCGGTAA e 806R – GGACTACHVGGGTWTCTAAT) do gene 16S ribossomal (Caporaso et al., 2012) e GoTaq Master Mix (Promega).

Os produtos da PCR foram quantificados através do kit Qschr dsDNA HS (Invitrogen) e sequenciados no Kit de Sequenciamento 300V2 (Illumina) em uma Illumina MiSeq (Illumina). As análises das comunidades, representadas pela abundância relativa dos principais grupos no nível de filo da comunidade microbiana, e as análises das coordenadas principais (PCoA), para encontrar o conjunto de distâncias euclidianas que represente um conjunto de distâncias não euclidianas sugerindo espécies mais raras e comuns, foram desenvolvidas segundo o pipeline QIIME2 e as análises funcionais foram feitas a partir do software PICRUST2 com algumas modificações e considerando 97% de similaridade com o banco de dados 16S SILVA (Quast et al., 2013).

Para a realização da análise funcional foram utilizadas as listas constantes na base de dados KEGG referentes às rotas metabólicas de degradação de hidrocarbonetos. Para a confecção do heatmap foram considerados os KOs que apresentaram crescimento ou decréscimo estatisticamente significativos em relação à amostra pré-tratamento.

3. Resultados

As sequências efetivas foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) considerando 97% de similaridade através do banco de dados SILVA. Diante do número de OTUs das amostras representadas nos diferentes períodos analisados (t1= 7 dias; t2= 15 dias e t3= 30 dias) observou-se menor número de OTUs na amostra P2t1, enquanto a amostra P1t2 o maior. A P1t2 apresentou a maior riqueza e diversidade em relação às demais amostras, confirmando esse resultado com o valor revelado no índice de diversidade chao1 e Shannon, já a amostra P2t1 obteve os menores índices de diversidade em relação aos demais tempos (Tabela 1).

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

Tabela 1. Sequências das amostras contaminadas por hidrocarbonetos e índices de diversidade do estudo. P (Ponto) e T (Tempo)

Table 1. Sequências das amostras contaminadas por hidrocarbonetos e índices de diversidade do estudo. P (Point) e t (Time)

sample id	seqs/sample	chao1 ave	observed_otus ave.	Shannon
P1t1	19500.0	9589.651	4354.000	5.22
P1t2	19500.0	9955.081	4399.300	5.34

P1t3	19500.0	6684.959	3695.400	4.71
P2t1	19500.0	2954.565	2447.800	3.01
p2t2	19500.0	5663.635	3743.000	4.77
P2t3	19500.0	6413.320	3761.900	4.77

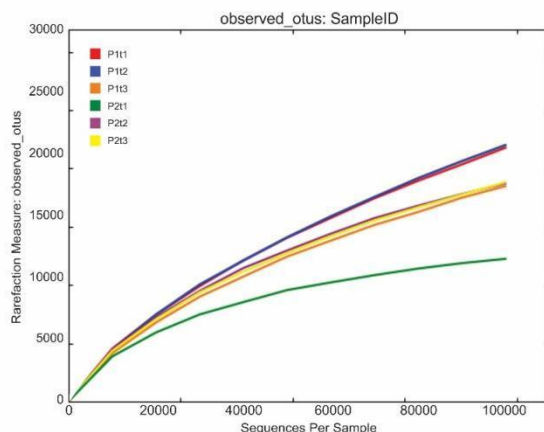
Fonte: Costa (2018)

Source: Costa (2018)

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

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

Figure 4. Rarefaction curves for OTU of the microbial community of sediment samples contaminated by hydrocarbons from the mangrove ecosystem



Fonte: Picrust2 (2019)

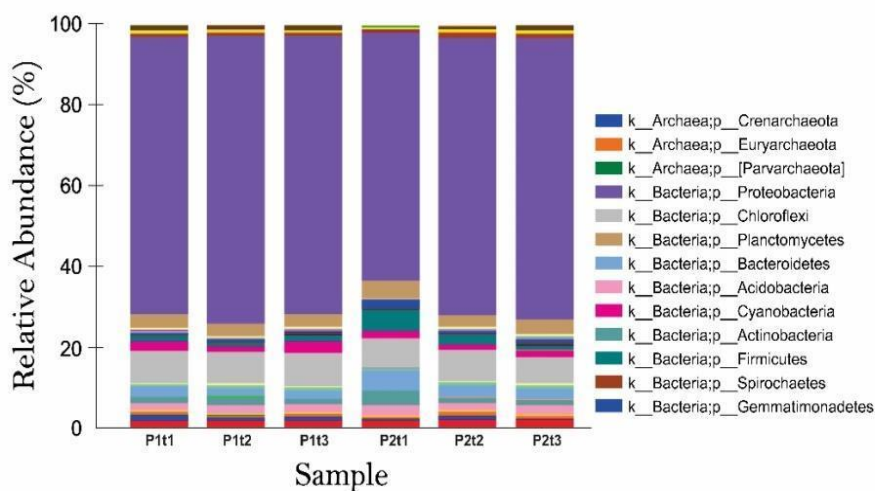
Source: Picrust2 (2019)

Os 10 filos mais representativos do Domínio bactéria foram: *Proteobacteria* (60,8%), *Chloroflexi* (9,9%), *Planctomycetes* (3,9%), *Bacteroidetes* (3,1%), *Acidobacteria* (2,3%), *Cyanobacteria* (2,2%), *Actinobacteria* (2,1%), *Firmicutes* (2,0%), *Spirochaetes* (1,3%) e *Gemmatimonadetes* (1,1%). Todavia, o filo *Proteobacteria* foi o mais predominante em todos os tempos avaliados e nos diferentes ambientes (alagado e sem interferência marinha), sendo a maior porcentagem representada na amostra P1t2 (71,6%) e menor porcentagem observada na amostra P2t1 (61,6%), porém nota-se que na área alagada o referente filo manteve-se em maior abundancia quando comparado a área sem interferência marinha, sendo os valores de 69,7%, 71,6% e 69,3%, referem-se às amostras P1t1, P1t2 e P1t3, respectivamente, enquanto que os percentuais 61,6%, 68,8% e 70% equivalem as amostras P2t1, P2t2 e P2t3, respectivamente (Figura 5). Assim, no filo *Proteobacteria*, as

três classes mais representativas foram as *Gammaproteobacteria* (29,1%), *Alphaproteobacteria* (18,5%) e a *Deltaproteobacteria* (12%), contudo as proporções variaram entre as amostras.

Figura 5. Abundância relativa dos principais grupos no nível de filo da comunidade microbiana de sedimento de manguezal contaminado por petróleo

Figure 5. Relative abundance of major groups at the phylum level of the microbial community in oil-contaminated mangrove sediment



Fonte: Picrust2 (2019)

Source: Picrust2 (2019)

A classe com maior abundância em todas as amostras, *Gammaproteobacteria*, esteve presente em maior abundância nas amostras P1t3 e P2t1 (40,2% e 42,1%, no filo Proteobacteria, respectivamente) e menor abundância na amostra P2t2 (24,7%). *Alphaproteobacteria* foi a classe que esteve presente em maior porcentagem em P2T2 (33,4%) e menor em P1t3 e P2t1 (16,5% e 15,1%, respectivamente). Já a classe *Deltaproteobacteria* apresentou maiores proporções nas amostras P1t1 e P1t2 (11,2% e 11,3%, respectivamente), além de menores proporções em P2t1 (4,2%).

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

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

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

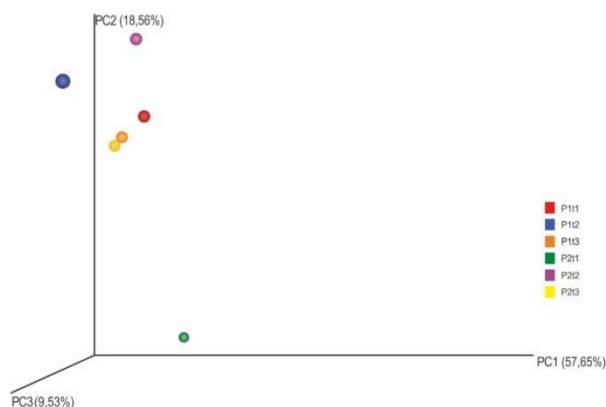
Sobre o Domínio Archaea, nas amostras de superfície e subsuperfície, a maior proporção foi do filo *Crenarchaeota* em todas as amostras (1,9%), seguido do *Euryarchaeota* (1,1%) e *Parvarchaeota* (0,1%), respectivamente. O filo *Crenarchaeota* se mostrou mais expressivo nas amostras P1t1, P1t2, P1t3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

Sobre o resultado da análise de coordenada principal (PCoA) foi gerada uma explicação de 85,74% do total da variância amostral dos sítios. Sendo que 57,65 %, 18,56% e 9,53% explicam-se na PC 1, 2 e 3, respectivamente. É importante notar essa porcentagem de variação indicada nos eixos, uma vez que o eixo vertical representa uma menor porcentagem do que o eixo horizontal (Figura 6).

Através do resultado gerado das curvas de rarefação observar-se que as amostras não conseguiram atingir o platô, o que sugere que o sequenciamento não foi suficiente para cobrir o total das espécies bacterianas presentes nas amostras coletadas. A curva de rarefação mostra a maior riqueza de espécies na amostra P1t2 (15 dias após perturbação da área alagada), sendo a menor unidade taxonômica operacional demonstrada pela amostra P2t1 (7 dias após perturbação de área sem interferência marinha).

Figura 6. Análise de coordenadas principais (PCoA) com QIIME ponderado da comunidade microbiana de sedimento de manguezal contaminado por petróleo.

Figure 6. Principal coordinate analysis (PCoA) with weighted QIIME of microbial community from oil-contaminated mangrove sediment.



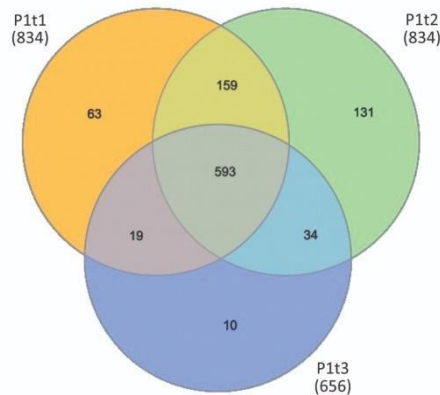
Fonte: Picrust2 (2019)
Source: Picrust2 (2019)

Os resultados dos diagramas de Venn das amostras das comunidades das amostras P1 e P2 demonstram que a cobertura e a riqueza das diversidades foram calculadas para cada conjunto de dados. Sendo que, a amostra P1t2, do sítio 1, apresentou maior riqueza comparada a representação dos outros tempos juntos, gerando 131 OTUs (13 %), a amostra P1t1 apresentou menos que o dobro do valor de OTUs geradas em 15 dias de contaminação (6,2 % - 63 OTUs), já o P1t3 obteve grande perda no número de OTUs, representando

apenas 1 % (10 OTUs) quando comparado às outras amostras ao nível de 97% de similaridade. Os resultados geraram 593 OTUs (58,8 %) compartilhadas nos três diferentes tempos de exposição ao hidrocarboneto e o número de OTUs exclusivas totalizou 204 (20,2 %) (Figura 7).

Figura 7. Diagrama de Venn das sequências do gene 16S rRNA da comunidade microbiana de sedimento de manguezal contaminado por petróleo, totalizando 1009 Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs)

Figure 7. Venn diagram of the 16S rRNA gene sequences from the microbial community of oil-contaminated mangrove sediment, totaling 1009 Taxonomic Operational Units (OTUs)



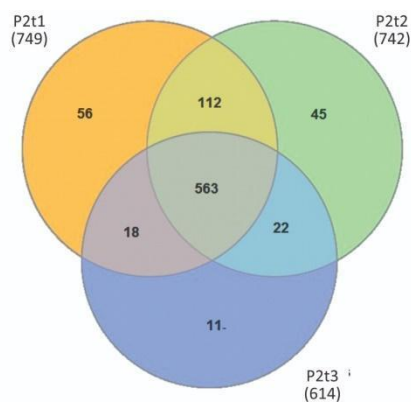
Fonte: Picrust2 (2019)

Source: Picrust2 (2019)

Contudo, a partir dos resultados obtidos pelo diagrama de Venn do sítio 2, observa-se a queda no número de OTUs, desde o t1 até o t3, sendo a cobertura e a riqueza das diversidades calculadas para cada conjunto de dados. Portanto, a amostra P2t1 representou a maior riqueza de números de OTUs específicas (56 - 6,8 %), a amostra P2t2 gerou 45 OTUs (5,4 %) comparado ao nível de 97% de similaridade das outras amostras, e na amostra P2t3 observou-se a menor quantidade de OTUs (1,3 % -11). Sendo que 563 OTUs (68,1 %) foram compartilhadas nos três diferentes tempos de exposição ao hidrocarboneto e o número de OTUs exclusivas totalizou 112 (13,6 %) (Figura 8).

Figura 8. Diagrama de Venn das sequências do gene 16S rRNA da comunidade microbiana de sedimento de manguezal contaminado por petróleo, totalizando 827 Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs)

Figure 8. Venn diagram of the 16S rRNA gene sequences from the microbial community of oil-contaminated mangrove sediment, totaling 827 Taxonomic Operational Units (OTUs)



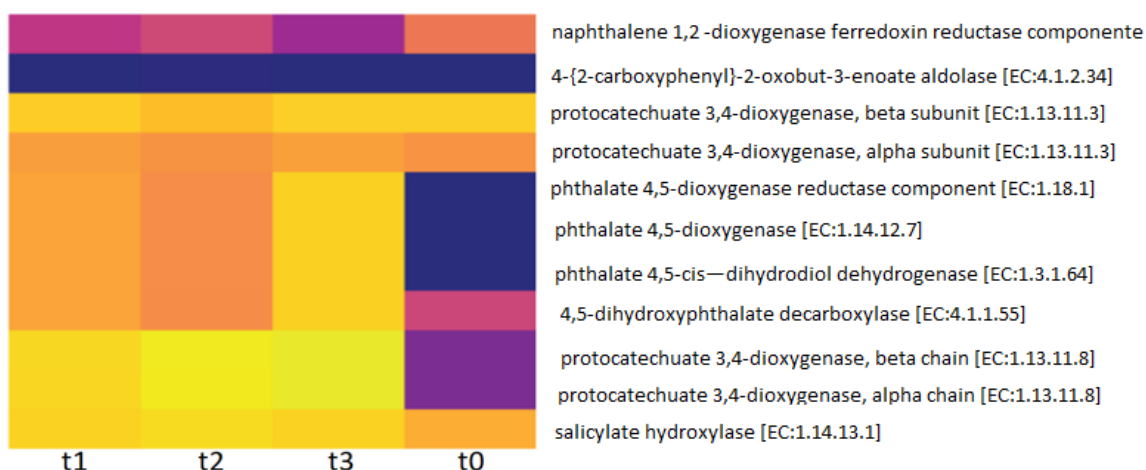
Fonte: Picrust2 (2019)

Source: Picrust2 (2019)

Diante do resultado apresentado da análise funcional foi possível identificar que a maioria dos KOs associados à degradação de HPAs apresenta crescimento relativo à exposição ao óleo e ao tempo de exposição. As rotas em vermelho são as que não apresentam valores estatisticamente diferentes entre as amostras pré e pós-tratamento e a primeira rota apresentada tem uma tendência oposta às demais, de diminuir estatisticamente em abundância com a exposição ao óleo. De um modo geral, os dados indicam que a comunidade microbiana dos sedimentos se modifica para permitir a degradação do óleo inserido no ambiente (Figura 9).

Figura 9. Heatmap da abundância de KEEG Objects (KOs) referentes a rotas metabólicas de degradação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos da comunidade microbiana de sedimento de manguezal contaminado por derivados do petróleo. Tons de roxo indicam baixa abundância e tons de amarelo indicam elevada abundância.

Figure 9. Heatmap of the abundance of KEEG Objects (KOs) referring to metabolic pathways of degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from the microbial community of mangrove sediment contaminated by petroleum derivatives. Purple tones indicate low abundance and yellow tones indicate high abundance.



Fonte: Picrust2 (2019)

Source: Picrust2 (2019)

4. Discussão

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

A partir dos resultados obtidos da estrutura e diversidade da comunidade microbiana autóctone após o experimento de contaminação por HPAs contidos em subprodutos do petróleo da Bacia do Recôncavo, nota-se a perda significativa de diversidade ao longo do tempo provocada, estritamente, pelo contato direto do contaminante sob os grupos.

O acidente ocasionado por óleo cru que se alastrou por diferentes praias ao longo da costa tropical do Brasil no início do mês de setembro de 2019 foi mais um lastimável ocorrido dentre outros sofridos e motivados por tal poluente (MAGRIS; GIARRIZZO, 2020; SOARES; TEIXEIRA; BEZERRA; PAIVA et al., 2020). Tal cenário confirma a quão sensível e exposta estão as áreas costeiras (estuários, manguezais e praias) a serem alteradas por perturbações dessa proporção, evidenciando a preocupação em compreender e estimar a

gravidade que as comunidades costeiras se encontram sob ameaça de perda de espécies e como pode ser demonstrado nesse estudo.

De acordo com o que pode ser observado em todas as amostras, há o aumento expressivo do grupo taxonômico Proteobacteria, onde esse corresponde a mais de 60 % em cada uma das amostras. Ao que tudo indica, esse grupo de microrganismos pode estar relacionado com a degradação de compostos do hidrocarboneto, já que ocorrem preferencialmente em áreas impactadas e, principalmente, por demonstrar maior destaque quando em contato com o contaminante. Tal observação já foi relatada por diferentes estudos em várias áreas de ambiente marinho e com histórico de contaminação de Santana et al. (2021), Ghanbari et al. (2019), Liu et al. (2019), Zhang et al. (2018), Zhang et al. (2017) e Nunes (2006).

No filo Proteobacteria são encontrados microrganismos aeróbicos, anaeróbicos, autotróficos ou heterotróficos, muito comuns em ambientes marinhos, o que ajuda a justificar o fato desse grupo estar presente abundantemente nesses ambientes, pois se trata de um grupo bastante diversificado (Ghanbari et al., 2019; Liu et al., 2019; Xu et al., 2018; Zhang et al., 2018; Zhang et al., 2017). A presença desse grupo em ecossistemas de manguezais também pode indicar que se encontra bem adaptado às áreas lamacentas, pois estudo sugere que alguns microrganismos, pertencentes a esse filo, têm função sulfato-redutora (Ghosh et al. 2010; Hayes e Lovely, 2002), além do grupo ser caracterizado como eficiente na degradação de hidrocarbonetos, e também de componentes aromáticos, halifáticos e estruturas moleculares (Ghosh et al. 2010). A ocorrência desses microrganismos em porcentagens significativamente abundantes e em diferentes localidades do globo terrestre levam vários estudos a acreditarem que se trata de um grupo bacteriano cosmopolita em ecossistemas manguezais, além das Proteobactérias serem representantes um dos maiores filos dentro do Domínio bacteria (Garrity et al., 2004).

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

A área amostrada sem interferência marinha, por apresentar menor riqueza, sofreu maior impacto quando exposto ao contaminante, o fato de apresentar menor riqueza pode indicar que o local apresenta condições ambientais mais extremas para o desenvolvimento de grupos bacterianos, como o menor teor de matéria orgânica, baixa quantidade de nutrientes, menor umidade. Logo, poucos grupos de microrganismos conseguem sobreviver a essas condições e ainda à exposição por óleo.

Os hidrocarbonetos do petróleo são poluentes orgânicos altamente persistentes, com características recalcitrantes e apresentam alto níveis de toxicidade (ZHANG et al., 2011; CHANDRA et al., 2013; MECKENSTOCK et al., 2016; VARJANI, 2017). No entanto, as bactérias, juntamente com os fungos, apresentam maior utilidade na remoção de locais impactados, e isso se deve a maior abundância dos grupos, a grande diversidade genética de espécies, mobilidade metabólica, assim como a capacidade de adaptação às condições adversas do meio (ALONGI, 1988; KATAOKA, 2001; HOLGUIN et al., 2001; TIAN et al., 2008; ABATENH et al., 2017).

A partir dos resultados gerados sobre as porcentagens dos Domínios Bacteria e Archaea, percebe-se que após exposição ao hidrocarboneto, às novas condições geradas são desfavoráveis para o crescimento das Archaea, enquanto as bactérias adaptam-se melhor e ocupam o espaço que antes fora preenchido pelas Archaea. As bactérias são mais eficientes na eliminação de compostos orgânicos presentes em sedimentos. Diante desse contexto, as Archaeas podem exercer papel de bioindicadoras em ambientes contaminados (MELO, 2010)

O filo Proteobacteria foi representado com maior abundância das classes Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Alphaproteobacteria no ambiente autóctone, porém em condição pós-óleo, esse cenário apresentou outra conformação, na qual as Gammaproteobacteria e Alphaproteobacteria passaram a ser mais representativas que a Deltaproteobacteria, o mesmo pode ser visto no trabalho de Ghosh et al., 2010. Isso sugere que algumas cepas do grupo Gammaproteobacteria tenham maior importância funcional para a degradação do composto, principalmente como bactérias primárias, já que se nutrem, exclusivamente, de hidrocarbonetos (RAHMAN et al. 2003; YAKIMOV et al., 2007; BROOIJMANS et al., 2009; LANG et al., 2016). Algumas bactérias têm uma frequência em trabalhos de biorremediação de HPAs contidos em subprodutos do petróleo, como é o caso das Firmicutes, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria, Betaproteobacteria e Bacteroidetes (ROY et al., 2018).

Segundo Zhang et al. (2017), o estudo comparativo da comunidade microbiana em solo, degradado e saudável, revelou no ambiente degradado maior ocorrência dos grupos Proteobacteria, Acidobacteria e Bacteroidetes. Contudo, em solo saudável estavam presentes em maior abundância os filos Actinobacteria e Firmicutes.

O filo Chloroflexi se manteve como o segundo mais abundante no ambiente após simulação da contaminação ambiental, muito embora sua expressividade tenha sido diminuída a, praticamente, menos da metade. Além disso, a classe Anaerolineae superou a abundância do grupo Dehalococcoide, classe essa que, de acordo com o trabalho de Adrian (2009), cepas de culturas mistas tinham sido utilizadas em estudos de biorremediação de locais impactados. Diante disso, as cepas do grupo Dehalococcoide presentes na área de estudo podem não ser tão eficientes para esse processo. Portanto, alterações na abundância dos grupos microbianos podem ser observadas em regiões de solos contaminados quando comparados a ambientes de solos saudáveis, já que alguns grupos que apresentem determinadas funções podem compensar a ausência ou redução de outros, para dar continuidade aos processos biológicos (Ma et al., 2020).

De acordo com o resultado apresentado pela análise de coordenadas principais (PCoA) com QIIME ponderado da comunidade microbiana de sedimento de manguezal contaminado por petróleo, nota-se que a partir do gráfico gerado é possível observar que houve diferenças entre os pontos de coleta, onde a estrutura da comunidade bacteriana da Floresta Atlântica que foram contaminadas com petróleo geraram algumas dissimilaridades entre os diferentes tempos aos quais foram submetidas, indicando que a comunidade apresentou uma dinâmica compensatória, na qual os grupos que apresentaram maior capacidade adaptativa às novas condições ambientais impostas após o petróleo, conseguiram persistir e utilizá-lo como fonte de nutrientes (BROOIJMANS et al., 2009; LANG et al., 2016).

Por meio dos resultados obtidos no diagrama de Venn, nota-se que tanto no sítio 1, como no 2, ocorre uma redução acentuada das células bacterianas ao final de 30 dias de adição do petróleo, sendo que após esse período a estrutura e diversidade das comunidades microbianas do sedimento de manguezal é afetado quase que completamente. Demonstrado que em um curto período de tempo pode haver uma dinâmica compensatória em alguns grupos e efeito negativo sobre a comunidade microbiana. Em vista disso, é notória a influência negativa das atividades antrópicas na conservação microbiana, ocasionando a redução da diversidade de espécies, sendo que são grupos pertencentes a base da cadeia trófica, associados a processos ecológicos do solo e, portanto, responsáveis pela reciclagem de materiais orgânicos objetivando a geração de nutrientes para o solo e outros organismos (Zilli et al., 2003; LANG et al., 2016). Assim, a saúde do solo está intimamente relacionada com a rica diversidade microbiana existente, contudo, os solos degradados por hidrocarbonetos tendem a ser seriamente comprometidos, onde podemos observar nos resultados da análise funcional como a comunidade microbiana se modifica para aumentar as chances de degradação do óleo e recuperação do ambiente contaminado.

Ressaltamos a importância das implicações do presente estudo na criação de estratégias para recuperação de ambientes estuarinos degradados, especialmente pelas características ambientais de vulnerabilidade aos impactos provocadas pelo derramamento de petróleo e seus derivados.

5. Conclusão

De acordo com os resultados do ambiente pós impactado, é possível perceber e avaliar o efeito negativo e de empobrecimento que o petróleo oferece ao meio ambiente, principalmente sob as comunidades microbianas e, de efeito rápido, ocorrendo mudanças logo no primeiro impacto. Portanto, os hidrocarbonetos ofereceram uma redução significativa na estrutura da comunidade microbiana autóctone.

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

6. Agradecimentos

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

7. Referências

ABATENH, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., Wassie, M. (2017). Application of microorganisms in bioremediation-review. **Journal of Environmental Microbiology**, v. 1, n. 1.

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

ALONGI, Daniel M. (1988). Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. **Microbial ecology**, v. 15, n. 1, p. 59-79.

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

BELLOTTO, Valéria R.; KUROSHIMA, Kátia Naomi; CECANHO, Fernanda. (2009). Poluentes no ambiente estuarino e efeitos da atividade de dragagem. **Estuário do Rio Itajaí-Açu, Santa Catarina: caracterização ambiental e alterações antrópicas. Itajaí: UNIVALI, Cap**, v. 7, p. 105-126.

BERGA, Mercè; SZÉKELY, Anna J.; LANGENHEDER, Silke. (2012). Effects of disturbance intensity and frequency on bacterial community composition and function. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36959.

BROOIJMANS, Rob JW; PASTINK, Margreet I.; SIEZEN, Roland J. (2009). Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew. **Microbial biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 587-594.

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

CAPORASO, J. Gregory et al. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina

- HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME journal**, v. 6, n. 8, p. 1621.
- CARRASCO, M. et al. (2003). Assessment of urban and industrial contamination levels in the bay of Cádiz, SW Spain. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 3, p. 335-345.
- COETSER, S. E.; CLOETE, T. E. (2005). Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. **Crit Rev Microbiol**, v. 3, n.4, p.213 – 32.
- COSTA, Gleyciane Machado da et al. (2023). Effects of degradation on microbial communities of an Amazonian mangrove. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1389.
- CHANDRA, Subhash et al. (2013). Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. **Annals of microbiology**, v. 63, n. 2, p. 417-431.
- DANIEL, Rolf. (2005). The metagenomics of soil. **Nature reviews microbiology**, v. 3, n. 6, p. 470.
- DE SANTANA, Carolina O. et al. (2021). Large-scale differences in diversity and functional adaptations of prokaryotic communities from conserved and anthropogenically impacted mangrove sediments in a tropical estuary. **PeerJ**, v. 9, p. e12229.
- FONTANA, N. N. (2010). **Avaliação de três diferentes meios de cultura para a quantificação de microrganismos do solo em sistema de plantio direto e convencional**. 2010. 42 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Ambiental) - Faculdade Dinâmica das Cataratas (UDC). Foz do Iguaçu – PR.
- GARRITY, George M.; BELL, Julia A.; LILBURN, Timothy G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. **Springer, New York, Berlin, Heidelberg**.
- GHANBARI, M.; Jami, M.; Moghadam, M. S.; Domig, K. J. (2019) Exploring the microbial diversity in oil-contaminated mangrove sediments using 16S rRNA metagenomics. **BioRxiv** preprint doi: <https://doi.org/10.1101/735290>
- GHOSH, A., Dey, N., Bera, A. *et al.* (2010). Culture independent molecular analysis of bacterial communities in the mangrove sediment of Sundarban, India. **Aquat. Biosyst.** 6, 1. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-6-1>
- HAYES, L. A.; LOVLEY, D. R. (2002). Specific 16S rDNA sequences associated with naphthalene degradation under sulfate-reducing conditions in harbor sediments. **Microbial ecology**, v. 43, n. 1, p. 134-145.
- HOLGUIN, Gina; VAZQUEZ, Patricia; BASHAN, Yoav. (2001). The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and fertility of soils**, v. 33, n. 4, p. 265-278.
- JIAO, Shuo et al. (2016). Microbial succession in response to pollutants in batch-enrichment culture. **Scientific reports**, v. 6, p. 21791.
- KATAOKA, Hisashi; KIYOHARA, Satoshi. (2001). Modified fish oil type material containing highly unsaturated fatty acid and/or esters thereof, and a composition containing said material. U.S. Patent n. 6,235,331.

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

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

LAURANCE, W.F., LOVEJOY, T.E., VASCONCELOS, H.L., BRUNA, E.M., DIRHAM, R.K., STOUFFER, P.C., GASCON, C., BIERREGAARD, R.O., LAURANCE, S.G. & SAMPAIO, E. (2002). Ecosystem decay of Amazonian forest fragments: a 22-year investigation. *Conservation Biology* 16:605-618.

LEA-SMITH, DJ, Biller, SJ, Davey, MP, Cotton, CA, Sepulveda, BMP, Turchyn, AV, et al. (2015). Contribuição da produção de alcanos cianobacterianos para o ciclo de hidrocarbonetos oceânicos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 13591–13596. doi: 10.1073 / pnas.1507274112

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

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

MA, J.; Zhou, T.; Xu, C.; Shen, D.; Xu, S.; Lin, C. (2020). Spatial and Temporal Variation in Microbial Diversity and Community Structure in a Contaminated Mangrove Wetland. *Appl. Sci.*, 10, 5850.

MAGRIS, R. A.; GIARRIZZO, T. (2020). Mysterious oil spill in the Atlantic Ocean threatens marine biodiversity and local people in Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, 153, p. 110961.

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

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

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

MUTECA, F. L. L. (2012). **Biorremediação de solo contaminado com óleo cru proveniente de Angola**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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

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

Palit, K., Rath, S., Chatterjee, S., & Das, S. (2022). Microbial diversity and ecological interactions of microorganisms in the mangrove ecosystem: Threats, vulnerability, and adaptations. **Environmental Science and Pollution Research**, 29(22), 32467-32512.

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

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

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

RON, EZ e Rosenberg, E. (2014). Biorremediação aprimorada de derramamentos de óleo no mar. **Curr. Opin. Biotechnol.** 27, 191–194. doi: 10.1016/j.copbio.2014.02.004

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

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

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

SOARES, M. D. O.; TEIXEIRA, C. E. P.; BEZERRA, L. E. A.; PAIVA, S. V. *et al.* (2020). Oil spill in South Atlantic (Brazil): Environmental and governmental disaster. **Marine Policy**, 115, p. 103879.

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

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

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

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

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

WILKINSON, D.M. (2002). Ecology before ecology: biogeography and ecology in Lyell's 'Principles'. **Journal of Biogeography** 29:1109-1115.

XU, X, Liu W, Tian S, Wang W, Qi Q, Jiang P, Gao X, Li F, Li H and Yu H (2018) Petroleum Hydrocarbon-

Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. **Front. Microbiol.** 9:2885. doi: 10.3389/fmicb.2018.02885

YAKIMOV, Michail M.; TIMMIS, Kenneth N.; GOLYSHIN, Peter N. (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. **Current opinion in biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 257-266.

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

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

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

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

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